

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

dr Magdalena Łuczak

**Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Pracownia Spektrometrii Mas**

Poznań, 2016

Spis treści

1. Dane wnioskodawcy	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	27

1. Dane wnioskodawcy

Imię i nazwisko: Magdalena Łuczak

Dane kontaktowe:

Pracownia Spektrometrii Mas

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

ul. Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

Tel. 616653051

e-mail: magdału@ibch.poznan.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

doktor nauk biologicznych – 23 czerwca 2006 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza proteomiczna ścian komórkowych roślin” (praca obroniona z wyróżnieniem).

Promotor: prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek. Recenzenci: prof. dr hab. Halina Augustyniak (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski (Uniwersytet Warszawski).

magister nauk biologicznych – 08 czerwca 2001 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: „Białka wybranych mieszańców międzyrodzajowych. Metoda elektroforezy dwukierunkowej”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2014 - obecnie; starszy specjalista-biolog w Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

01.10.2014 - obecnie; adiunkt w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej w Poznaniu.

01.01.2012 – 30.09.2014; adiunkt w Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

01.01.2007 – 31.12.2011; adiunkt w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

01.01.2010 – 31.12.2010; specjalista w Instytucie Informatyki Politechniki Poznańskiej w Poznaniu.

30.09.2009 – 30.06.2015; wykładowca w Wyższej Szkole Umiejętności Społecznych w Poznaniu

01.03.2006 – 31.12.2006; asystent w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. 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:

„Identyfikacja molekularnych mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek”

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **M. Luczak***, D. Formanowicz*, E. Pawliczak, M. Wanic-Kossowska, A. Wykretowicz, M. Figlerowicz (2011) „Chronic kidney disease-related atherosclerosis - proteomic studies of blood plasma” Proteome Science, 9; 25. doi: 10.1186/1477-5956-9-25. **IF 2011 = 2.328; 25 pkt. MNiSW**

* autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy

2. **M. Luczak[#]**, Ł. Marczak, M. Stobiecki (2014) “Optimization of plasma sample pretreatment for quantitative analysis using iTRAQ labeling and LC-MALDI-TOF/TOF”. PLOS One. 9; e101694. doi: 10.1371/journal.pone.0101694. **IF 2014 = 3.234; 40 pkt. MNiSW**

[#] - autor korespondencyjny

3. **M. Luczak[#]**, Ł. Marczak, D. Formanowicz, E. Pawliczak, M. Wanic-Kossowska, M. Figlerowicz, M. Stobiecki (2015) “Deeper insight into chronic kidney disease-related atherosclerosis: comparative proteomic studies of blood plasma using 2DE and mass spectrometry”. *Journal of Translational Medicine*. 13;20. doi: 10.1186/s12967-014-0378-8. **IF 2015 = 3.93; 35 pkt. MNiSW**

[#] - autor korespondencyjny

4. **M. Luczak[#]**, J. Suszynska-Zajczyk, L. Marczak, D. Formanowicz, E. Pawliczak, M. Wanic-Kossowska, M. Stobiecki (2016) “Label-Free quantitative proteomics reveals differences in molecular mechanism of atherosclerosis related and non-related to chronic kidney disease”. *International Journal of Molecular Sciences*, 17; E631. doi: 10.3390/ijms17050631. **IF 2015 = 3.257; 30 pkt. MNiSW**

[#] - autor korespondencyjny

5. **M. Luczak[#]**, J. Suszynska-Zajczyk, L. Marczak, D. Formanowicz, E. Pawliczak, M. Wanic-Kossowska, M. Stobiecki (2016a) ” iTRAQ-based proteomic analysis of plasma reveals abnormalities in lipid metabolism proteins in chronic kidney disease-related atherosclerosis”. *Scientific Reports*, 6; 32511. doi: 10.1038/srep32511. **IF 2015 = 5.228; 40 pkt. MNiSW**

[#] - autor korespondencyjny

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

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl pięciu publikacji, które powstały podczas mojej pracy początkowo w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Figlerowicza, a następnie były kontynuowane w Pracowni Spektrometrii Mas pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Stobieckiego w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Materiał badawczy stanowiły próbki osocza ludzkiego, a nadrzędnym celem było bliższe zrozumienie mechanizmów rządzących procesami miażdżycorodnymi u osób cierpiących na przewlekłą chorobę nerek (ang. chronic kidney disease; CKD) oraz chorych z klasyczną chorobą sercowo-naczyniową (ang. cardiovascular disease; CVD). Cel ten miał

zostać osiągnięty poprzez dogłębne analizy proteomów osocza oraz stworzenie profili białkowo-peptydowych obu badanych stanów patologicznych.

Od kilkunastu lat analizy proteomiczne i identyfikacja białek z wykorzystaniem spektrometrii mas stały się bardzo użytecznym narzędziem wykorzystywanym w wielu dziedzinach biologii i medycyny. Proteomika to dziedzina nauki, której celem jest ilościowe i jakościowe opisanie białek powstałych w wyniku ekspresji genów w komórce, tkance lub całym organizmie. Badania na poziomie białek umożliwiają porównania złożonych mieszanin białkowych oraz identyfikację i ocenę ilościową ich poszczególnych składników. Proteomika zajmuje się więc nie tylko badaniem określonej puli białek, lecz również oceną całych, skomplikowanych układów reakcji bądź procesów oraz określeniem ich przebiegu, mechanizmów i systemów regulacji. Jednym z najważniejszych podejść proteomicznych jest tzw. proteomika porównawcza, którą stosuje się w celu znalezienia markerów badanego procesu lub choroby. Poprzez porównanie profili białkowo-peptydowych próby kontrolnej z próbą badaną, uzyskuje się informacje o zmianach jakościowych i ilościowych wywołanych danym czynnikiem. Takie podejście znalazło zastosowanie w badaniach proteomicznych różnych jednostek chorobowych, co doprowadziło w ostatnich latach do odkrycia wielu istotnych białek uczestniczących w rozwoju tych schorzeń. Proteomika może mieć zastosowanie zarówno w diagnostyce, wyborze optymalnej metody terapii oraz monitorowaniu jej przebiegu, a także w predykcji wyników leczenia. Przede wszystkim jednak pozwala na bliższe zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw analizowanych zagadnień co zostało wykorzystane do uzyskania prezentowanego osiągnięcia naukowego.

Na przestrzeni ostatnich lat dzięki postępowi technologicznemu wynalezionych zostało wiele technik umożliwiających globalną analizę proteomu. W analizach proteomicznych stosowane są metody „screeningowe” umożliwiające porównywanie złożonych mieszanin białkowych oraz identyfikację i ocenę ilościową ich poszczególnych składników. W zależności od zastosowanej metodyki, wyróżniamy dwa główne podejścia proteomiczne. Pierwsze z podejść zakłada izolację białek, oczyszczenie uzyskanego preparatu, a następnie ich rozdział metodą elektroforezy dwukierunkowej (ang. two-dimensional electrophoresis, 2DE). Elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakrylamidowym, dzięki połączeniu techniki ogniskowania izoelektrycznego oraz standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących, zapewnia dość dobry rozdział mieszaniny białek. Po przeprowadzonym rozdziale uzyskane żele wizualizuje się z użyciem

odpowiednich barwników, a następnie przeprowadzona zostaje analiza komputerowa powstałych obrazów w celu znalezienia plamek białek wykazujących zróżnicowaną akumulację pomiędzy próbą kontrolną a badaną. Plamki białek różniące się ilościowo wycina się z żelu, trawi enzymatycznie na peptydy, a uzyskaną mieszaninę peptydów analizuje się w spektrometrze masowym w celu identyfikacji tego białka. Główną wadą tego podejścia jest czasochłonność oraz wymóg stosowania relatywnie dużych ilości białka, ponadto istotnym ograniczeniem jest niska liczba zidentyfikowanych białek, niezwykle trudno również analizować białka o dużych masach cząsteczkowych, białka błonowe oraz o właściwościach silnie hydrofobowych. Z drugiej strony przeprowadzanie ogniskowania w handlowo dostępnych paskach żelowych z immobilizowanym gradientem pH wyeliminowało problem z powtarzalnością tego typu analiz co było zasadniczym problemem jeszcze kilkanaście lat temu. Drugie podejście zwane „shotgun” zakłada trawienie enzymatyczne wszystkich białek zawartych w próbce bez ich uprzedniego rozdziału z wykorzystaniem 2DE. Uzyskana w ten sposób skomplikowana mieszanina peptydów jest rozdzielana z użyciem chromatografu cieczowego (ang. liquid chromatography, LC), a następnie analizowana z wykorzystaniem spektrometru masowego (ang. mass spectrometry, MS). Do rozdzielania uzyskanych po strawieniu białek -peptydów, obecnie używa się głównie ultrawysokosprawnych chromatografów cieczowych (ang. ultra pressure liquid chromatography; UPLC) wyposażonych w nanokolumny o średnicy ziaren 2-3 μm . Systemy UPLC pracując pod bardzo dużymi ciśnieniami (rzędu 20-50MPa), pozwalają na osiągnięcie olbrzymiej zdolności rozdzielczej, co jest optymalnym rozwiązaniem do rozdziału skomplikowanych mieszanin, jakimi są peptydy powstałe po trawieniu białek. Dzięki możliwości sprzężenia kolumn chromatograficznych bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru (połączenie typu „on-line”), możliwa jest automatyzacja procesu i osiągnięcie wysokiej przepustowości rozdziału analizowanych peptydów. W „screeningowych” analizach proteomicznych głównie znajdują zastosowanie dwa rodzaje jonizacji zachodzącej w źródle jonów: elektrozpylanie (ang. electrospray ionization; ESI) oraz desorpcja laserowa wspomagana matrycą (ang. matrix-assisted laser-desorption ionization; MALDI). Z kolei do analizy rozdzielanych jonów najczęściej stosowane są analizatory czasu przelotu (ang. time of flight; TOF) oraz hybrydowe analizatory typu Orbitrap™. Opisane powyżej podejścia proteomiczne oraz układy LC-MS zostały wykorzystane do uzyskania rezultatów w ramach osiągnięcia naukowego.

Identyfikację białek metodami spektrometrii mas można prowadzić z wykorzystaniem metody peptydowego odcisku palca, PMF (ang. peptide mass fingerprinting). W metodzie PMF otrzymuje się widmo masowe, które ukazuje masy poszczególnych peptydów powstałe po trawieniu danego białka. Jest to tzw. mapa peptydowa, unikalna dla każdego białka, dzięki specyfice substratowej enzymu używanego do trawienia. Następnie porównuje się masy peptydów uzyskanych na widmach MS do teoretycznych mas peptydów zdeponowanych w bazach danych i na tej podstawie dokonuje się identyfikacji białka. Metoda ta jednak sprawdza się tylko w stosunku do białek poznanych wcześniej i obecnych w bazach danych. Ponadto jest zupełnie nieprzydatna, gdy mamy do czynienia ze skomplikowaną mieszaniną peptydów powstałych w wyniku trawienia wielu białek jednocześnie. Z tego względu stosuje się ją głównie do identyfikacji pojedynczych białek wyciętych z żelu np. po rozdzielach metodą 2DE. W przypadku podejścia „shotgun”, gdzie trawimy jednocześnie wszystkie białka zawarte w złożonej próbce, konieczne jest stosowanie metod tandemowej spektrometrii masowej (ang. tandem mass spectrometry; MS/MS) sprzężonej z chromatografią cieczą. Metoda MS/MS poprzez zastosowanie technik fragmentacyjnych analizowanych peptydów i w oparciu o masę jonów potomnych uzyskanych po fragmentacji, umożliwia ustalenie składu aminokwasowego danego peptydu i tym samym identyfikację białek poprzez poznanie ich sekwencji. Tandemowy spektrometr wyposażony jest w dwa analizatory, w pierwszym analizatorze selekcjonuje się wybrany jon molekularny pochodzący od peptydu, a w drugim analizuje się masy uzyskanych po fragmentacji jonów potomnych. Fragmentacja może następować między innymi wskutek zderzeń zjonizowanych peptydów z atomami wprowadzonego gazu szlachetnego (collision-induced dissociation; CID) lub następować, jako efekt działania lasera (laser-induced dissociation; LID).

Stosując metodę „shotgun” możemy oprócz analizy jakościowej (identyfikacja białek) przeprowadzić również analizę ilościową (pomiar akumulacji poszczególnych białek w analizowanej mieszaninie). W tym celu wykonujemy znakowanie próbek z wykorzystaniem znaczników izotopowych lub izobarycznych. Analizowane próbki białkowe/peptydowe można przygotowywać również bez uprzedniego znakowania. W tym ostatnim podejściu, (tzw. metoda „label-free”) każdą badaną próbkę analizuje się osobno w wielu powtórzeniach. Spektrometr rejestruje sygnały pochodzące od rozdzielanych peptydów. Informacje o względnych zmianach akumulacji peptydów i białek uzyskuje się poprzez porównania intensywności sygnałów pomiędzy widmami poszczególnych analitów uzyskanych w trybie

MS. Aby uzyskać wiarygodny wynik należy dysponować dość dużą liczbą próbek. Zaletą metody „label-free” jest jej prostota – próbek nie przygotowuje się w żaden skomplikowany sposób, a nawet ograniczenie liczby kroków w czasie procedury przygotowawczej jest bardzo korzystne. Poza tym jest to metoda relatywnie niedroga. Jedną z wad jest konieczność przerobienia dużej liczby próbek, w co najmniej kilku powtórzeniach, a co za tym idzie długi czas eksperymentu. Poza tym różnice pomiędzy poszczególnymi analizami MS mogą znacząco wpływać na uzyskane wyniki. Z kolei, metoda znacznikowa obejmuje znakowanie izobaryczne lub izotopowe badanych białek lub peptydów przed analizą MS. Najpopularniejszą metodą znakowania jest tzw. etykietowanie izobaryczne: iTRAQ (ang. isobaric tagging for relative and absolute quantification). Metoda iTRAQ umożliwia porównywanie ze sobą do 8 grup eksperymentalnych – tyle bowiem jest dostępnych znaczników. Znaczniki iTRAQ zbudowane są z grupy reporterowej, tzw. grupy balansowej oraz reaktywnej grupy wiążącej się z grupą aminową peptydów. Grupa ta tworzy wiązania kowalencyjne z każdą lizyną oraz N-końcową grupą peptydów powstałych po trawieniu proteolitycznym białek. Po znakowaniu próbki pochodzące z wszystkich analizowanych grup eksperymentalnych są łączone w jedną próbkę, oczyszczane na kolumnach kationowymiennych i jako jedna próbka są wprowadzane do układu LC-MS/MS. Dzięki temu unikamy różnic pomiędzy poszczególnymi analizami MS co jak wspominałam jest znaczącą wadą w przypadku analiz typu „label-free”. Podczas fragmentacji peptydu następuje utrata obojętnej grupy balansowej i uwalniany jest jon reporterowy o masie pomiędzy 113, a 121 w zależności od zastosowanego znacznika. Porównując ze sobą powierzchnie pików pochodzących od danych jonów reporterowych uzyskuje się informacje o relatywnej ilości danego peptydu. W moich badaniach stosowałam oba podejścia proteomiczne: „label-free” oraz iTRAQ. Niezależnie jednak od zastosowanego podejścia uzyskane wyniki starałam się potwierdzać z wykorzystaniem metod alternatywnych, celowanych już na konkretne białko i w tym celu wykorzystywałam albo analizy immunoenzymatyczne z zastosowaniem specyficznych przeciwciał (western blot lub ELISA) lub też analizy LC-MS/MS polegające na monitorowaniu reakcji następczych typu SRM (ang. single reaction monitoring) i PRM (ang. parallel reaction monitoring). Metody SRM i PRM to bardzo skuteczne techniki służące do ilościowego oznaczania białek docelowych. W metodzie tej wybieramy jon o określonej masie i czasie retencji (jon ten pochodzi od peptydu należącego do walidowanego białka), a następnie śledzimy wybraną reakcję jego fragmentacji. Uzyskujemy wykres intensywności

badanej reakcji fragmentacji w czasie a jego wartość jest proporcjonalna do stężenia badanej substancji. Pozwala to na wykonywanie precyzyjnych pomiarów ilościowych.

Jak wspomniałam wyżej moje osiągnięcie naukowe dotyczyło badań podstawowych rozwoju miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek (CKD). Przewlekła choroba nerek jest to progresywna i nieodwracalna utrata funkcji tych organów, objawiająca się obniżeniem poziomu filtracji kłębuszkowej, tzw. GFR (ang. glomerular filtration rate) czyli zdolnością nerek do filtracji krwi. Najczęściej obserwowanym objawem poza obniżonym GFR są nieprawidłowości w składzie krwi i moczu, głównie proteinuria. U zdrowej osoby w ciągu jednej minuty przepływa przez nerki od 90 do 120 ml płynu i tyle wynosi prawidłowy GFR. Obniżenie wartości GFR poniżej $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ może wskazywać na przewlekłą chorobę nerek. Na podstawie tego parametru CKD dzielimy na pięć stadiów. Im niższy GFR tym bardziej zaawansowane stadium choroby. Stadium 1 i 2 CKD są najłagodniejsze i charakteryzują się prawidłowym lub nieznacznym obniżeniem GFR ($> 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$); są to tzw. stadia utajone gdyż objawiają się niespecyficznymi symptomami, które trudno zdiagnozować. W stadium 3 i 4 GFR jest już wyraźnie obniżony (CKD3: $30\text{--}59 \text{ ml/min/1,73 m}^2$; CKD4: $15\text{--}29 \text{ ml/min/1,73 m}^2$). Niestety w tym stadiach nie funkcjonuje już około 50% nefronów, a choroba bez leczenia bardzo szybko postępuje i przechodzi w stadium 5 (GFR $<15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) definiowane jako całkowita niewydolność nerek, a chory w tym stadium wymaga leczenia nerkozastępczego. Jednak najczęstszą przyczyną śmierci są w tej grupie chorych tzw. incydenty sercowo-naczyniowe, takie jak zawał mięśnia sercowego lub udar. U podłoża tych powikłań leży przede wszystkim miażdżyca, która u chorych z CKD występuje około 20-30-krotnie częściej w porównaniu do populacji ogólnej (Sarnak i wsp., 2003). Śmiertelność z powodów sercowo-naczyniowych rośnie proporcjonalnie do spadku GFR. Pacjenci z początkowymi stadiami CKD wykazują już początkowe objawy miażdżycy takie jak nadciśnienie i niedokrwienie mięśnia sercowego, natomiast u pacjentów ze stadium 5 CKD śmiertelność z powodów incydentów sercowo-naczyniowych jest ponad 20 razy wyższa w porównaniu do populacji ogólnej i to niezależnie od wieku, płci czy rasy. Z drugiej strony pacjenci z CKD nie wykazują bardzo często typowych czynników ryzyka związanych z rozwojem klasycznej choroby sercowo-naczyniowej a więc wysokiego poziomu cholesterolu i jego frakcji LDL, triacylogliceroli czy też wysokiego stężenia homocysteiny lub otyłości. Co więcej, często są tym bardziej narażeni na zaburzenia sercowo-naczyniowe, im niższe jest ich ciśnienie tętnicze, stężenie cholesterolu czy masa ciała. Zjawisko to

nazywane jest tzw. odwrotną epidemiologią (Kalantar-Zadeh i wsp., 2003). Z kolei klasyczna miażdżycą, niezwiązana z chorobą nerek spowodowana jest przez tzw. tradycyjne czynniki ryzyka, które mogą być kontrolowane i modyfikowane (takie jak nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, cukrzyca czy wysoki poziom lipidów) oraz czynniki tradycyjnie niemodyfikowalne (wiek, płeć i zmiany na podłożu genetycznym). W tych przypadkach, miażdżycą jest wynikiem bardzo wielu lat wystawienia organizmu na ich niekorzystne działanie, co prowadzi do uszkodzenia naczyń i nasilenia procesów miażdżycorodnych. Miażdżycą związana z CKD (ang. chronic kidney disease-related atherosclerosis; CKDA) rozwija się w odróżnieniu od miażdżycy klasycznej bardzo szybko i jest dodatkowo związana głównie z tzw. nietradycyjnymi czynnikami ryzyka, czyli niedożywieniem, zaburzeniami czynności śródbłonna, wpływem toksyn mocznicowych czy przeciążeniem objętościowym. Z drugiej strony od kilku lat sugeruje się również udział nietradycyjnych czynników ryzyka w rozwoju klasycznej miażdżycy. Jednak pełny obraz fizjologicznych procesów, które uczestniczą w intensyfikacji tego procesu nie jest znany w CKD. Brak jest korelacji pomiędzy dobrze poznanymi czynnikami ryzyka progresji miażdżycy, a częstotliwością zapadania na CKDA, dlatego założyłam w moich badaniach, że prawdopodobnie odmienne mechanizmy zaangażowane są w formowanie blaszki miażdżycowej w obu chorobach. Pytanie, jakie postawiłam na początku moich badań było następujące, czym różnią się od siebie mechanizmy molekularne miażdżycy klasycznej oraz miażdżycy związanej z chorobą nerek i jakie procesy wpływają na intensyfikację obu chorób. Interesujące było również, które z wymienionych czynników ryzyka są bardziej specyficzne dla CKDA.

Aby odpowiedzieć na te pytania postanowiłam przeprowadzić porównawczą analizę proteomów osocza pacjentów z różnym zaawansowaniem CKD i tym samym różnym zaawansowaniem miażdżycy. Byli to chorzy na CKD należący do 3 grup badawczych podzieleni ze względu na poziom szacunkowego GFR (estimated GFR; eGFR):

1. CKD1-2; pacjenci w 1 lub 2 stadium CKD (średni eGFR 77,04 ml/min/1,73m²);
2. CKD3-4; pacjenci w 3 lub 4 stadium CKD, (średni eGFR 20 ml/min/1,73m²);
3. CKD5; pacjenci w 5 stadium CKD (schyłkowa niewydolność nerek), leczeni przez przynajmniej dwa lata powtarzaną hemodializą (średni eGFR 5,75 ml/min/1,73m²).

Uzyskane profile białkowo-peptydowe zostały porównane do profili uzyskanych również od pacjentów cierpiących na klasyczną, zaawansowaną postać CVD niezwiązaną z dysfunkcją

nerek jak również, zdrowych ochotników (HV) z prawidłowym poziomem GFR i funkcją układu sercowo-naczyniowego. Dzięki tak dobranym grupom badawczym możliwe było przeprowadzenie analiz porównawczych pomiędzy pacjentami o różnym stopniu zaawansowania CKD jak również, o różnym nasileniu zmian miażdżycowych.

Wszystkie moje badania prowadzone były wstępnie różnymi metodami „screaningowymi” w celu znalezienia białek różnicujących analizowane grupy eksperymentalne, a następnie zróżnicowana akumulacja wybranych białek walidowana była z użyciem metod celowanych. Początkowo moje badania prowadziłam z wykorzystaniem podejścia proteomicznego opartego na rozdzielach metodą elektroforezy dwukierunkowej oraz identyfikacji białek różnicujących z użyciem spektrometrii mas. Wynikiem tych analiz było powstanie dwóch prac eksperymentalnych, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**Luczak i wsp., 2011; Luczak i wsp., 2015**). Z uzyskanego od pacjentów osocza, białka rozdzielane były z użyciem elektroforezy dwukierunkowej w dużej skali (rozmiar żeli 24x26cm), a następnie analizowane w celu znalezienia białek różnicujących. Wytypowane białka były następnie wycinane z żelu i identyfikowane początkowo z użyciem metody MS - MALDI-TOF (**Luczak i wsp., 2011**), a później MS/MS - MALDI-TOF/TOF (**Luczak i wsp., 2015**). W pierwszej z prac (**Luczak i wsp., 2011**) udało mi się zidentyfikować 42 białka osocza a wśród nich 4 białka, które ulegały zróżnicowanej akumulacji w analizowanych grupach badawczych: α -1-mikroglobulinę (α -1m), apolipoproteinę A-IV (apoA-IV), jedną z podjednostek fibrynogeny (Fb) oraz haptoglobinę (Hp). Co więcej, dwa z tych białek różnicowały również pacjentów CVD od CKD, jednak poziomy ich akumulacji były znacząco różne. Uzyskane rezultaty pozwoliły na wysunięcie wniosku, że co najmniej dwa procesy w odmienny sposób przyczyniają się do formowania blaszki miażdżycowej w arteriosklerozie związanej z CKD oraz CVD. Z jednej strony niezwykle ważne są mechanizmy związane z efektywnym transportem cholesterolu. Udało mi się wykazać, że apoA-IV, odpowiedzialna za usuwanie cholesterolu z komórek i jego transport do wątroby, a więc pełniąca rolę przeciwmiażdżycorodną, akumulowała na niższym poziomie u pacjentów z CVD w porównaniu do zdrowych ochotników. Na tej podstawie wysunęłam hipotezę, że niedostateczna synteza apoA-IV jest istotnym czynnikiem przyczyniającym się do intensyfikacji procesu powstawania blaszki miażdżycowej w CVD. Co ciekawe, odwrotną sytuację zaobserwowaliśmy w przypadku pacjentów z CKD. Osocze tych pacjentów zawierało nawet dwukrotnie wyższy poziom apoA-IV w porównaniu do HV co mogłoby

sugerować, iż transport cholesterolu u tych pacjentów może być bardzo wydajny. Kliniczny obraz miażdżycy u tych pacjentów jednak przeczył takiemu przypuszczeniu. Sugerował raczej, że mimo wysokiego poziomu apoA-IV wydajność transportu cholesterolu może być niewystarczająca, a nadmiar cholesterolu osadza się w naczyniach. Możliwe jest również, że zaburzenie usuwania cholesterolu z krwi następuje również na innym poziomie. Wydaje się bowiem, a wykazane przeze mnie zmiany w poziomie akumulacji tzw. białek ostrej fazy takich jak Hp i Fb to potwierdzają, że w tym typie miażdżycy znacznie ważniejszą rolę odgrywają procesy zapalne. Uszkodzenie śródbłonka naczyń krwionośnych i pojawiający się odczyn zapalny może stanowić bodziec w głównej mierze odpowiedzialny za indukcję miażdżycy związanej z chorobą nerek. W tym przypadku nawet dwukrotnie podwyższony poziom przeciwmiażdżycorodnej apoA-IV nie będzie chronił przed postępującymi zmianami w naczyniach. Między innymi Kronenberg i współautorzy wykazali niskie stężenie apoA-IV u pacjentów z CVD oraz że związek ten jest niezależny od stężenia trójglicerydów i cholesterolu (Kronenberg i wsp., 2000). Obserwowano również podwyższone stężenie Hp w moczu pacjentów chorych na nefropatię (Varghese i wsp., 2007), a także wyższy poziom Fb w osoczu chorych z niewydolnością nerek (Sarnak i wsp., 2003; Emokpae i wsp., 2010). Warto jednak wspomnieć, iż publikacja prezentująca powyższe wyniki, a wchodząca w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**Łuczak i wsp., 2011**) była pierwszą opublikowaną pracą w której dokonano jednoczesnego porównania proteomów osocza pacjentów chorych na CKD oraz CVD i wykazano zmienność w akumulacji badanych białek w obu chorobach jak i w porównaniu do HV. Efektem tego badania była również identyfikacja białka α -1m, którego poziom akumulacji liniowo wzrastał we wszystkich grupach chorych cierpiących na CKD. Poziom tego białka był 5-krotnie wyższy u chorych hemodializowanych w porównaniu do kontroli. Co więcej akumulacja α -1m była odwrotnie proporcjonalna do GFR. Liniowa, odwrotna proporcjonalność pomiędzy poziomem GFR, a akumulacją α -1m pozwoliła wyciągnąć wniosek, że białko to jest, co najmniej, tak samo dobrym biomarkerem uszkodzenia nerek jak rutynowo stosowany do tego celu GFR. Co jednak ciekawe, poziom akumulacji α -1m w osoczu chorych na CVD (bez klinicznych objawów dysfunkcji nerek) okazał się bardzo podobny do poziomu tego białka w osoczu pacjentów w 1-2 stadium CKD. Ponieważ pacjenci CVD narażeni są na zwiększone ryzyko uszkodzenia nerek, postanowiłam określić czy pierwsze symptomy zaburzenia ich funkcji poprzedzone są wzrostem akumulacji α -1m. W tym celu podzieliłam pacjentów CVD na dwie grupy: CVD \geq 90 zawierała

pacjentów, u których GFR był w normie; CVD<90 zawierała pacjentów, u których GFR był nieznacznie poniżej normy (średni GFR 79 ml/min/1,73m²) pomimo braku klinicznych objawów uszkodzenia nerek (prawidłowy GFR wynosi co najmniej 90 ml/min/1,73m²). Okazało się, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy wynikiem GFR, a poziomem akumulacji α -1m. Pacjenci z grupy CVD<90 wykazywali dwukrotnie zwiększoną akumulację α -1m w porównaniu do HV. A co jeszcze bardziej istotne nawet ci pacjenci, którzy mieli prawidłowy GFR (grupa CVD \geq 90) wykazywali również podwyższoną akumulację tego białka. Stąd wysunęłam wniosek, że α -1m może być znacznie lepszym markerem uszkodzenia nerek niż GFR, ponieważ pozwala wskazać nefropatię na bardzo wczesnym etapie choroby, kiedy GFR jeszcze niczego nie sugeruje. W tej chwili prowadzimy badania na bardzo dużej grupie pacjentów w celu potwierdzenia tej hipotezy. Podsumowując, w pracy **Łuczak i wsp., 2011** wykazaliśmy po raz pierwszy, że istnieją pewne różnice pomiędzy profilami białkowymi osocza pacjentów z CKD oraz z CVD. Jednak przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację jedynie 4 białek ulegających zróżnicowanej akumulacji wśród badanych grup chorych. Biorąc pod uwagę złożone mechanizmy obu chorób, założyliśmy, iż białek takich jest zapewne o wiele więcej i tylko ich wykrycie pozwoli w pełni zrozumieć procesy różnicujące tworzenie blaszki miażdżycowej w obu chorobach. Oczywiście zdawaliśmy sobie sprawę, co jest przyczyną identyfikacji tak małej liczby białek różnicujących. Osocze wbrew pozorom nie stanowi wcale łatwego materiału do badań proteomicznych ze względu na obecność kilku białek, w szczególności albuminy, które występują w bardzo dużym stężeniu. Białka te maskują obecność pozostałych białek obecnych w osoczu w niższych stężeniach, w szczególności tzw. białek niskokopijnych a więc produkowanych przez komórkę w niewielkich ilościach. W rzeczywistości jedynie 22 białka stanowią 99% całkowitej masy osocza a w pozostałym 1 procencie, jest zawarte około 2000 białek (Tirumalai i wsp., 2003). Tylko frakcjonowanie białek osocza mogło zapewnić nam szersze spojrzenie na zmiany zachodzące w proteomie wskutek progresji CKD. W poszukiwaniu idealnej metody przygotowywania próbek do ilościowych analiz metodami spektrometrii mas wypróbowaliśmy szereg metod. Proces optymalizacji przygotowania próbek osocza pod kątem badań proteomicznych opisałam w kolejnej pracy, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (**Łuczak i wsp., 2014**). Celem tych badań było opracowanie metody, dzięki której będziemy w stanie zidentyfikować jak największą liczbę białek osocza, w tym również białek o zróżnicowanej akumulacji. W pracy porównaliśmy wyniki uzyskane bez zastosowania

frakcjonowania oraz z użyciem 3 metod: chromatografii powinowactwa, ultrafiltracji i chromatografii kationowymiennej. W pierwszej z metod, zastosowaliśmy złoża zasocjowane z przeciwciałami swoiście wiążącymi 7 białek wysokokopijnych osocza: albuminę, IgG, α -1-antitrypsynę, IgA, transferynę, haptoglobinę oraz fibrynogen. Uzyskany w ten sposób przesącz pozbawiony białek wysokokopijnych analizowany był z użyciem chromatografii cieczowej połączonej w trybie „off-line” ze spektrometrem masowym. Zastosowanie tej metody umożliwiło identyfikację ponad 1000 białek osocza, jednak zaobserwowaliśmy również niespecyficzne wiązanie wielu białek do złoża. Uważa się, że albumina pełni rolę białka nośnikowego dla innych białek. Termin „albuminom” został wprowadzony do literatury w 2007 roku kiedy to Gundry i współpracownicy opisali 35 białek wiążących się nieswoiście do albuminy. W mojej pracy wykazałam, iż tych białek jest nawet ponad 200 i analiza jedynie frakcji retentatu co było złotym standardem w proteomice jeszcze parę lat temu może skutkować utratą cennych informacji o wielu białkach. Zasugerowaliśmy, więc iż jedynie analiza zarówno frakcji retentatu jak i frakcji związanej na złożu jest konieczna w badaniach proteomicznych i może stanowić cenne źródło biomarkerów. Udowodniliśmy to zresztą w kolejnej pracy (**Luczak i wsp., 2015**) w której zastosowaliśmy jedną z metod zoptymalizowanych w pracy **Luczak i wsp., 2014**, a w której białka różnicujące analizowane grupy eksperymentalne zidentyfikowaliśmy w obu frakcjach uzyskanych po chromatografii powinowactwa. Dzięki zastosowaniu tej techniki udało mi się poszerzyć katalog białek różnicujących pacjentów z CKD oraz CVD. W pracy **Luczak i wsp., 2015** przeprowadziłam również analizy bioinformatyczne, które ujawniły, że zidentyfikowane białka różnicujące są związane z trzema głównymi procesami: kaskadą koagulacyjną, transportem i metabolizmem lipidów oraz procesami zapalnymi. Częściowo, więc potwierdziłam wyniki uzyskane w poprzedniej pracy, ale z zastosowaniem odmiennej techniki przygotowywania próbek oraz ich analizy. Ponadto zastosowana technika ultrafiltracji do separacji białek osocza ujawniła, iż frakcja białek niskocząsteczkowych i peptydów stanowi również doskonałe źródło białek różnicujących. W skład tej frakcji wchodzi szereg ważnych fizjologicznie białek, takich jak: cytokiny, chemokiny, białkowe hormony i czynniki wzrostu. Peptydy występujące w krwioobiegu mogą także powstawać, jako produkty degradacji białek, w wyniku aktywności endogennych proteaz. Przeprowadzona analiza głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA) ujawniła, że niskocząsteczkowe białka i peptydy osocza doskonale różnicują zdrowych ochotników od pacjentów z różnym zaawansowaniem CKD. Analizę

celowaną w kierunku cytokin i ich udziale w rozwoju CKDA kontynuuję obecnie w nowym projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, a którego realizację jako kierownik rozpoczęłam w 2016 roku. Co ciekawe, w pracy **Luczak i wsp., 2015** wykazałam również, iż grupy CVD oraz CKD1-2 charakteryzują się istotnym podobieństwem między sobą pod względem akumulacji wielu białek i peptydów, w szczególności apolipoprotein i innych molekuł związanych z metabolizmem lipidów. Było to zaskakujące odkrycie, ponieważ obie grupy chorych prezentują odmienny stopień zaawansowania choroby sercowo-naczyniowej. CKD1-2 to grupa chorych z początkowymi symptomami miażdżycy, podczas gdy pacjenci z CVD to osoby często po 2-3 zawałach. Uzyskane wyniki sugerowały, że w początkowych stadiach przewlekłej choroby nerek większą rolę odgrywają tradycyjne czynniki ryzyka takie jak: wiek, płeć, dyslipidemia i nadciśnienie i to one są odpowiedzialne za nasilenie rozwoju miażdżycy. Natomiast w bardziej zaawansowanych stadiach CKD tzw. nietradycyjne czynniki ryzyka zaczynają się nakładać na czynniki tradycyjne i dodatkowo nasilają zmiany miażdżycowe w przebiegu CKD. Być może wraz ze spadkiem GFR udział tradycyjnych czynników ryzyka zmienia się na rzecz czynników nietradycyjnych. Zaobserwowane przez nas nasilenie akumulacji białek ostrej fazy oraz białek układu dopełniacza potwierdzają hipotezę, że mechanizm akceleracji zmian miażdżycowych wydaje się różny w początkowych i zaawansowanych stadiach CKD.

W kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (**Luczak i wsp., 2016**) odeszłam od metody rozdziału z wykorzystaniem 2DE i zastosowałam wysokoprzepustowe techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią masową. Zmiana podejścia proteomicznego umożliwiła wielokrotne zwiększenie liczby zidentyfikowanych białek i tym samym białek różnicujących co pozwoliło na jeszcze głębsze spojrzenie na mechanizmy związane z CKDA. Jednocześnie niezbędne stało się zastosowanie różnych narzędzi bioinformatycznych do globalnej analizy uzyskanych wyników pod względem zaangażowania zidentyfikowanych białek w poszczególne szlaki metaboliczne i patologiczne oraz ich funkcje molekularne. Potwierdziłam niezbicie, że obie jednostki chorobowe, CKD oraz CVD związane są ze współistniejącym stanem zapalnym. Przewlekłe zapalenie powoduje dysfunkcję śródbłonna i wynikające z niej zaburzenie struktury i funkcji naczyń krwionośnych i jest prawdopodobnie kluczowym elementem uczestniczącym w progresji zarówno choroby sercowo-naczyniowej i miażdżycy jak i przewlekłej choroby nerek. Aktywacja zapalna śródbłonna w efekcie uruchamia procesy zakrzepowe i stres oksydacyjny

nasilające procesy miażdżycowe. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują jednak, że procesy zapalne są jednak bardziej nasilone w CKD w porównaniu do CVD. Jest to szczególnie wyraźne w profilach osocza pacjentów poddawanych hemodializie. Zabieg ten wiąże się z nagłymi zmianami poziomu elektrolitów w krwi oraz objętości naczyniowej, co nasila procesy zapalne. Dodatkowo podczas każdej sesji hemodializy, dochodzi do kontaktu krwi pacjenta z błoną półprzepuszczalną i układem drenów dializatora, sztucznymi przetokami czy cewnikami, co dodatkowo nasila przewlekłe zapalenie (Guo i wsp., 2010). W efekcie obserwujemy wzrost akumulacji białek związanych z procesami immunologicznymi oraz białek ostrej fazy, między innymi: β -2-mikroglobuliny (β -2m), α -1m, elementów układu dopełniacza, kwaśnej α -1-glikoproteiny 1 i 2, cystatyny C, białka C-reaktywnego i innych białek zaangażowanych w sekrecję cytokin i systemiczny stan zapalny. Warto podkreślić, iż białka te różnicują zarówno CVD jak i CKD od osób zdrowych. Jednak różnice w akumulacji owych białek pomiędzy obydwoimi stanami patologicznymi są istotnie różne. Na przykład akumulacja β -2m jest nawet 30-razy wyższa w osoczu pacjentów z CKD5 w porównaniu do osocza w CVD. Podobnie, obserwowany poziom cystatyny C był 1,5-raza wyższy w CVD w porównaniu z zdrowych ochotników. Natomiast akumulacja tego białka w osoczu pacjentów CKD3-4 była ponad 4-razy, a w CKD5 nawet 6 razy wyższa w porównaniu do kontroli. Diagnostyczna wartość zarówno β -2m jak i cysC jako markerów stanów zapalnych była prezentowana w wielu pracach (Dharnidharka i wsp., 2002; Yilmaz i wsp., 2005; Filler i wsp., 2014). Również opisywano związek między podwyższonym stężeniem cysC a ryzykiem choroby sercowo-naczyniowej (Batra i wsp., 2012). Jednak jak dotąd nikt nie pokazał porównania profili tych białek w obu chorobach, CKD i CVD i nie wykazał, że stan zapalny jest czynnikiem ryzyka bardziej specyficznym i o wiele bardziej nasilonym w CKD w porównaniu do CVD.

Wysokie stężenie toksyn uremicznych również przyczynia się do intensyfikacji stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłonna w CKD na długo przed rozpoczęciem leczenia nerkozastępczego (Stinghen i wsp., 2011). Co więcej, stres oksydacyjny, kwasica i akumulacja prozapalnych cytokin oraz produktów zaawansowanej glikacji (ang. advanced glycation end products; AGE) dodatkowo nasilają stan zapalny (Shindler i wsp., 2004). Nasze badania pokazały między innymi, że akumulacja osoczowego markera aktywacji śródbłonna, VCAM-1, wzrasta istotnie w zaawansowanych stadiach CKD. Aktywacja śródbłonna może być również rezultatem stresu oksydacyjnego, kolejnego nietradycyjnego czynnika ryzyka

zarówno CKD jak i CVD. Uzyskane wyniki pokazały, że poziom peroksydazy glutationu znacząco spadał w osoczu pacjentów z CKD oraz że obserwowany spadek był pozytywnie skorelowany z poziomem GFR. Poziom tego enzymu spadał również u pacjentów z klasyczną miażdżycą w porównaniu do HV, jednak osiągał poziom obserwowany u chorych CKD1-2. W przeciwieństwie do peroksydazy glutationu, poziom peroksyredoksyny 2 wzrastał w CKD, ale nie w CVD. Z kolei akumulacja dysmutazy ponadtlenkowej obserwowana była jedynie w najbardziej zaawansowanym stadium CKD. Peroksydaza glutationu katalizuje redukcję nadtlenu wodoru lub innych wodoronadtlenków organicznych do wody z wykorzystaniem glutationu (Zachara i wsp., 2006). Enzym ten więc chroni lipidy i białka błonowe, jak również DNA przed wpływem stresu oksydacyjnego. Wyniki te sugerują, iż także stres oksydacyjny odgrywa o wiele istotniejszą rolę i jest o wiele bardziej zaburzony w CKD w porównaniu do CVD. Podobny wniosek wyciągnęliśmy w przypadku innego nietradycyjnego czynnika ryzyka CKD i CVD, czyli patologicznego procesu zwapnienia naczyń. Proces ten, jak poprzednie czynniki ryzyka, związany jest z progresją i śmiertelnością zarówno w CVD jak i CKD (Byon i wsp., 2015). Osteopontyna i fetuina A to białka, które występują w blaszce miażdżycowej i uczestniczą w procesie jej zwapnienia. Wysoki poziom krążącej w obiegu osteopontyny może więc być związany z procesem zwapnienia, sztywnością naczyń i tworzeniem blaszki miażdżycowej (Tousoulis i wsp., 2013). W moich badaniach białko to było niewykrywalne zarówno u zdrowych ochotników oraz pacjentów niedializowanych. Jej akumulacja obserwowana była jedynie w przypadku najbardziej zaawansowanego stadium CKD5. Osteopontyna była również niewykrywana w osoczu pacjentów z klasyczną CVD co sugeruje, że zwapnienie naczyń to proces bardziej nasilony w CKD. Tą sugestie potwierdza również zróżnicowana akumulacja innych białek związanych z procesem zwapnienia: fetuiny A oraz fetuiny B. Oba białka funkcjonują jako inhibitory patologicznego procesu zwapnienia (Jahnen-Dechent i wsp., 2011) i poziom obu białek wyraźnie spada u pacjentów z CKD, a obserwowany spadek jest pozytywnie skorelowany z progresją choroby. Co więcej, akumulacja fetuiny A była podobna u zdrowych ochotników oraz pacjentów z CVD, natomiast w przypadku fetuiny B jej poziom był tylko nieznacznie obniżony i osiągał poziom obserwowany u pacjentów z CKD1-2. Warto podkreślić, iż w opisywanej pracy po raz pierwszy pokazano asocjację pomiędzy tymi białkami a procesem intensyfikacji miażdżycy związanej i niezwiązanej z przewlekłą chorobą nerek.

Opisane powyżej czynniki ryzyka, takie jak aktywacja śródbłonna, przewlekły stan zapalny, stres oksydacyjny oraz zwapnienie naczyń prowadzą do uszkodzenia struktury naczyń krwionośnych. W rezultacie macierz pozakomórkowa jest ekspozowana i inicjowana jest adhezja płytek krwi do ściany naczyń prowadząc do aktywacji leukocytów i przebudowy naczyń. Ten stan, zwany mikrozapaleniem aktywuje z kolei kaskadę krzepnięcia, co nasila procesy uszkodzenia i dysfunkcji naczyń (Hansson i wsp., 2005). Zatem związek pomiędzy procesami koagulacyjnymi i progresją miażdżycy jest niewątpliwy. Prezentowałam zaburzoną akumulację białek związanych z hemostazą w CKD oraz CVD w trzech pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**Łuczak i wsp., 2011; Łuczak i wsp., 2015; Łuczak i wsp., 2016**). Jednak na podkreślenie zasługuje fakt, że również i te zmiany o wiele bardziej ekspozowane były w CKD w porównaniu do CVD. Spośród 33 białek różnicujących związanych z procesami krzepnięcia, tylko 5 różnicowało pacjentów z CVD od zdrowych ochotników. Natomiast pozostałe 28 białek było charakterystycznych dla porównania pomiędzy HV i CKD. I jak w poprzednich przypadkach, choć zaburzony profil akumulacji białek krzepnięcia prezentowano już w literaturze w CVD (Khrenov i wsp., 2002) oraz CKD (Shlipak i wsp., 2003), to porównawczej analizy takiego profilu w obu stanach nie pokazywano do tej pory. Warto podkreślić, iż tylko porównanie akumulacji w obu chorobach jednocześnie, może nam dostarczyć informacji o różnicach pomiędzy nimi.

Wspomniałam, powyżej, że pacjenci cierpiący na CKD charakteryzują się podwyższonym ryzykiem śmierci z powodów sercowo-naczyniowych, co szczególnie jest widoczne u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek. Zaznaczyłam również, że pomimo tego ryzyka, większość pacjentów z CKD wyróżnia się atypowym profilem lipidowym. W odróżnieniu od opisanych wyżej czynników ryzyka, mechanizmy związane z efektywnym transportem cholesterolu wydają się odgrywać bardziej istotną rolę w klasycznej miażdżycy w porównaniu do CKDA. Badani pacjenci cierpiący na najbardziej zaawansowane stadium CKD pomimo tego, iż charakteryzowali się 59% odsetkiem zawałów oraz udarów, wykazywali najniższy poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL w porównaniu do pozostałych pacjentów, a nawet zdrowych ochotników. Przeprowadzone badania proteomiczne wykazały jednak, że aż 29 białek różnicujących analizowane grupy eksperymentalne to białka zaangażowane w metabolizm lipidów i formowanie blaszki miażdżycowej. Na tych białkach skupiono się w ostatniej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**Łuczak i wsp., 2016a**). Większość z tych białek prezentowało

zupełnie odmienny profil porównując CKDA z CVD. ApoA-IV oraz adiponektyna pełnią rolę przeciwmiażdżycorodną oraz antyoksydacyjną i są negatywnie skorelowane z klasyczną chorobą sercowo-naczyniową (Kronenberg i wsp., 2000; Goldstein i wsp., 2009). Adiponektyna ponadto odgrywa również istotną rolę w ochronie mięśnia sercowego przed chorobą przerostową i dysfunkcją śródbłonna, nadciśnieniem oraz hamuje agregację trombocytów. Zatem spadek akumulacji tego białka, który obserwowaliśmy u pacjentów z klasyczną CVD nie był niczym szczególnym. Jednak już wzrost poziomu adiponektyny w osoczu pacjentów z CKD był dla nas zaskoczeniem biorąc pod uwagę rolę tego białka w rozwoju choroby. Podobne obserwacje poczyniłam w przypadku apoA-IV. Po pierwsze udało się potwierdzić zróżnicowaną akumulację tego białka, co prezentowane było już wcześniej z wykorzystaniem innych metod proteomicznych (**Łuczak i wsp., 2011; Łuczak i wsp., 2015**). Dodatkowo wykazałam, że białko to jest pozytywnie skorelowane z poziomem HDL jedynie w przypadku pacjentów z CVD oraz HV, natomiast wykazywało odwrotną, ujemną korelację gdy analizowałam pacjentów z CKD oraz HV. Dodatkowo analizy korelacyjne ujawniły ujemną korelację pomiędzy apoA-IV i poziomem GFR chorych z CKD i odwrotną, pozytywną korelację pomiędzy apoA-IV i poziomem GFR chorych z klasyczną CVD co tylko podkreśla, że asocjacja pomiędzy dyslipidemią i progresją miażdżycy nie jest tak oczywista w CKD. Apolipoproteina E (apoE) i M (apoM) to kolejne komponenty lipoprotein z udowodnioną funkcją przeciwmiażdżycorodną (Dahlbäck i wsp., 2006; Gungor i wsp., 2012) i niedobór obu białek został zaobserwowany w moich badaniach w grupie chorych z klasyczną CVD. Co jednak ciekawe poziom obu białek nie był zaburzony w żadnej grupie chorych z CKD, nawet w grupie ze schyłkową niewydolnością nerek (CKD5) i tym samym najbardziej zaawansowanym stadium miażdżycy. Z kolei poziom apolipoproteiny B (apoB), głównego komponenta aterogenicznej frakcji lipoprotein LDL, czyli białka ewidentnie skorelowanego pozytywnie z ryzykiem i rozwojem miażdżycy, był wyższy w osoczu CKD w porównaniu do CVD. Jednocześnie obserwowano brak korelacji pomiędzy poziomem apoB i LDL. Wzrost poziomu apoB przy jednoczesnym braku zmian w poziomie LDL może sugerować, że LDL może mieć charakter bardziej aterogeniczny w CKD w porównaniu do klasycznej CVD. Podobnie białko Lp(a), silny predyktor miażdżycy akumulowało w zupełnie odmienny sposób w CKD oraz klasycznej CVD a obserwowane zmiany nie były w żaden sposób wytłumaczalne na podstawie poziomu lipidów w krwi obwodowej. Wśród 29 białek różnicujących, które związane były z transportem i metabolizmem lipidów, aż 16 białek

różniło się istotnie poziomem akumulacji pomiędzy grupami pacjentów z najbardziej zaawansowanym stadium miażdżycy: CKD5 oraz CVD. Obserwowane, bardzo duże zmiany w poziomie apoB, apoC-I, apoC-III, apoF, apoH oraz Lp(a) pomiędzy CKD5 i CVD (grupami o podobnym poziomie zaawansowania miażdżycy, lecz zupełnie różnej funkcji nerek) podkreślają ponownie, że miażdżycy w CKD może być oparta na innych mechanizmach molekularnych niż klasyczna CVD. Oczywiście zakładałam, że obserwowane zmiany mogą być wynikiem samej dysfunkcji nerek. Jednak przeprowadzone analizy korelacyjne ujawniły, że tylko 6 białek różnicujących, związanych z metabolizmem lipidów jest skorelowanych z poziomem GFR. Aby to dodatkowo sprawdzić porównałam ze sobą dwie grupy CVD: jedna z nich zawierała chorych z klasyczną miażdżycą, bez objawów dysfunkcji nerek i prawidłowym GFR ($CVD \geq 90$), a druga grupa zawierała pacjentów z klasyczną miażdżycą, bez klinicznych objawów uszkodzenia nerek ale z obniżonym poziomem GFR ($CVD < 90$). Wyniki ujawniły obecność jedynie 9 białek różnicujących analizowane grupy, które związane były z metabolizmem lipidów, a z nich tylko angiogenina, była skorelowana z poziomem GFR. Jasno to sugeruje, że większość obserwowanych białek związanych z metabolizmem lipidów jest zaburzonych w wyniku rozwoju choroby sercowo-naczyniowej, a nie dysfunkcji nerek. Niemniej jednak te zaburzenia ujawniły całkowicie inny charakter w CKD oraz klasycznej CVD.

Kluczowy mechanizm z udziałem, którego HDL pełni swoją anty-aterogenną funkcję to transport cholesterolu z tkanek peryferyjnych do wątroby gdzie ulega katabolizmowi. Obniżenie stężenia HDL, i tym samym zwiększone ryzyko odkładania cholesterolu w naczyniach, może następować w wyniku obniżenia poziomu białek budujących HDL, czyli apoA-I i apoA-II, co w przypadku pacjentów chorych na CKD nie byłoby zaskoczeniem biorąc pod uwagę zjawisko proteinurii. Jednak nasze badania nie pokazały żadnej istotnej korelacji pomiędzy stężeniem HDL oraz poziomem białek apoA-I i apoA-II. Zasugerowałam więc istnienie dodatkowego mechanizmu związanego z niedoborem HDL w CKD. Niedawno w literaturze pojawiły się sugestie, że prawidłowa funkcja i struktura HDL może odgrywać istotniejszą rolę w rozwoju miażdżycy niż jego stężenie (Moradi i wsp., 2009; Santos-Gallego i wsp., 2014). Wykazano między innymi, że utlenienie cząsteczek HDL oraz zawartość fosforanu sfingozyny może być przyczyną jego dysfunkcji (Huang i wsp., 2014; Sattler i wsp., 2015). Fakt, iż CKD jest silnie związana z procesami przewlekłego zapalenia oraz stresu oksydacyjnego, co wykazałam również w swoich badaniach, może to potwierdzać.

Jednym z białek chroniącym HDL i budujące go białka jest enzym paraoksoгеназа 1 (PON1). Kilka lat temu wykazano, że stres oksydacyjny zaburza PON1 i HDL staje się wówczas niefunkcjonalny (Rosenblat i wsp., 2011; Kratzer i wsp., 2014). Moje badania wykazały, że akumulacja PON1 była najniższa w grupie CKD3-4 oraz CKD5, czyli grupach CKD z najbardziej zaawansowanym stadium miażdżycy. W 2009 roku pokazano, że funkcja HDL jest obniżona u pacjentów dializowanych i prowadzi to między innymi do progresji CVD (Moradi i wsp., 2009). Moje badania sugerują, że niefunkcjonalny HDL może istnieć również u pacjentów predializowanych.

Podsumowując, uzyskane wyniki charakteryzują się wysoką unikalnością, ponieważ z dostępnej literatury wynika, że nikt dotąd nie badał jednocześnie zmian zachodzących w proteomie pacjentów z CKD oraz pacjentów z „klasyczną” CVD. Co więcej pacjenci z CKD bardzo często wykluczani są z dużych, klinicznych badań skupiających się na ocenie ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych, a tymczasem nasze badania sugerują, że tylko bezpośrednia analiza obu stanów chorobowych może dostarczyć informacji na temat molekularnych podstaw mechanizmu przyspieszonej miażdżycy w CKDA. Jak dotąd uzyskane przez nas dane pozwoliły na identyfikację 1798 białek osocza, wśród których 172 białka ujawniły, istotne różnice w akumulacji pomiędzy analizowanymi grupami eksperymentalnymi. Moje badania po raz pierwszy pokazały, że białka związane ze stresem oksydacyjnym, aktywacją śródbłonna, przewlekłym stanem zapalnym, zwapnieniem naczyń i procesem koagulacji, charakteryzowały się o wiele większym zaburzeniem w akumulacji w CKDA w porównaniu do CVD. Wydaje się, że powyższe czynniki ryzyka są o wiele bardziej specyficzne i odgrywają o wiele istotniejszą rolę w rozwoju CKDA w porównaniu do CVD. Ponadto profil białkowy osocza pacjentów z klasyczną CVD ujawnił wiele podobieństw do grupy CKD1-2, pomimo istnienia istotnych różnic w zaawansowaniu choroby sercowo-naczyniowej. Również obserwowane zmiany w poziomie GFR, markera funkcji nerek, nie wyjaśniają do końca obserwowanych różnic. W opublikowanych pracach wykazałam również, że obie choroby różnią się istotnie również profilem białek zaangażowanych w transport, metabolizm cholesterolu oraz formowanie blaszki miażdżycowej. Uzyskane profile silnie sugerowały, że proces progresji miażdżycy w klasycznej chorobie sercowo-naczyniowej różni się istotnie od tego obserwowanego w CKD. Wydaje się, iż w początkowych stadiach choroby mechanizm molekularny tego procesu ten jest podobny, jednak w bardziej zaawansowanych stadiach mechanizm akceleracji zmian miażdżycowych wydaje się zmieniać. Odwrotna zależność

pomiędzy stężeniem HDL i komponentami wchodzącymi w jego skład może sugerować, że dyslipidemia pacjentów z CKD może być wynikiem bardziej zmian jakościowych struktury i funkcji HDL niż zmian w jego stężeniu.

Opisane osiągnięcie naukowe obejmuje cykl czterech prac eksperymentalnych, w których wykorzystano techniki proteomiczne do identyfikacji i analizy niektórych molekularnych mechanizmów progresji miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek. Jedna z prac pozwoliła na optymalizację procesu przygotowywania próbek, którą następnie wykorzystano w pracach kolejnych; frakcjonowanie z użyciem chromatografii powinowactwa w pracy **Łuczak i wsp., 2015** oraz chromatografii SCX w pracy **Łuczak i wsp., 2016a**. Jednak na uwagę zasługuje fakt, iż w każdej z tych prac zastosowano różne podejścia proteomiczne wykorzystujące odmienne techniki MS, frakcjonowania i rozdziału białek/peptydów, uzyskując w ten sposób doświadczenie do różnych pul białkowych i tym samym coraz głębszy wgląd w badane mechanizmy przebiegu obu chorób. Wyniki opublikowane w pierwszej z prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**Łuczak i wsp., 2011**) uzyskane zostały z wykorzystaniem osocza bez uprzedniego frakcjonowania (białka totalne) oraz z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii MALDI-TOF, która pozwoliła na identyfikację białek metodą peptydowego odcisku palca, PMF. Uzyskane wyniki potwierdzone zostały techniką western-blot i immunodetekcji. Kolejna praca (**Łuczak i wsp., 2015**) pozwoliła na głębszą analizę problemu gdyż skupiła się już na białkach frakcjonowanych techniką chromatografii powinowactwa (białka niskokopijne oraz wysokokopijne) i frakcji białek/peptydów niskocząsteczkowych. Ponadto do identyfikacji i analizy białek zastosowano tym razem metodę tandemowej spektrometrii masowej (MALDI-TOF/TOF). Jest to technika o wiele bardziej zaawansowana i dająca niezbitę wyniki w porównaniu do metody PMF. Z kolei zastosowanie tandemowej spektrometrii mas z wykorzystaniem pułapki jonowej z jonizacją typu ESI pozwoliła na walidację uzyskanych wyników z wykorzystaniem zaawansowanej techniki monitorowania reakcji następczych, SRM. Kolejne prace po pierwsze potwierdzały wyniki uzyskiwane w badaniach poprzednich, a z drugiej strony poprzez poszerzenie katalogu białek różnicujących, zapewniały jeszcze szersze spojrzenie na zmiany zachodzące w proteomie wskutek progresji CKD. Udało się to poprzez zastosowanie metody wielowymiarowej identyfikacji białek (MudPIT) zastosowanej w dwóch różnych wariantach: z wykorzystaniem podejścia „label-free” (**Łuczak i wsp., 2016**) oraz techniki opartej na znakowaniu iTRAQ (**Łuczak i wsp., 2016a**). Obie publikacje

opierają się na wynikach uzyskanych technikami dorównującymi tym stosowanym w laboratoriach na światowym poziomie. Uzyskanie jednak owych wyników było możliwe dzięki zastosowaniu technik przygotowania próbek opracowanych i zoptymalizowanych w jednej z prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**Łuczak i wsp., 2014**).

Na obecnym etapie mojej kariery planuję pozostać przy tematyce stanowiącej osiągnięcie habilitacyjne, a więc badań nad mechanizmami rozwoju miażdżycy w przewlekłej chorobie nerek. W 2016 roku rozpoczęłam, jako kierownik realizację nowego projektu, kompleksowo skupiającego się na badaniach podstaw molekularnych tego schorzenia. Głównym celem projektu jest wyjaśnienie podstaw molekularnych udziału stanu zapalnego i układowych reakcji immunologicznych w rozwoju miażdżycy w CKD oraz CVD. Projekt z jednej strony obejmuje analizy zmian zachodzących na poziomie zarówno proteomu jak i transkryptomu w monocytach, limfocytach T-pomocniczych oraz komórek NK wskutek rozwoju CKD oraz CVD. Szczególnie dużo uwagi w projekcie poświęcamy białkom zaangażowanym w systemiczny proces zapalny, takim jak cytokiny, aby sprawdzić czy te same mediatory modulujące odpowiedź immunologiczną komórki i tym samym odpowiedzialne za rozwój klasycznej miażdżycy odgrywają istotną rolę w rozwoju miażdżycy związanej z CKD. W tej chwili badamy mediatory stanu zapalnego uczestniczące w rozwoju miażdżycy w tym interleukiny 1, 6, 12, 18, TNF- α , TNF- β oraz IFN- γ jak również typowe mediatory stresu oksydacyjnego. Prowadzimy analizy korelacyjne pomiędzy obserwowaną zróżnicowaną akumulacją tych mediatorów oraz mediatorów stresu oksydacyjnego a typowymi markerami i parametrami „klasycznej” miażdżycy oraz parametrami uszkodzenia nerek. Z drugiej strony prowadzę badania *in vitro* na komórkach śródbłonna naczyń, mięśni gładkich aorty oraz mięśni gładkich tętnic wieńcowych. Chcielibyśmy się dowiedzieć jak reagują komórki tych naczyń na zwiększone stężenie toksyn mocznicowych, stres oksydacyjny, zaburzenia w stężeniu wapnia i innych niepożądanych komponentów surowicy krwi pacjentów z CKD oraz czy mechanizm układowych reakcji zapalnych opiera się na podobnych modulatorach w obu stanach chorobowych. Wreszcie określamy również zmiany w profilu lipidowym i białkowym blaszek miażdżycowych pobranych od pacjentów z zaawansowaną miażdżycą związaną oraz niezwiązaną z chorobą nerek. Uzyskane informacje pozwolą na zbudowanie modelu wyjaśniającego molekularne mechanizmy rozwoju miażdżycy w CKD, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów układowych reakcji zapalnych. Identyfikacja szlaków i sieci sygnałowych zaangażowanych w

rozwój miażdżycy w CKD oraz CVD, mamy nadzieję, pozwoli nam odpowiedzieć na pytanie, dlaczego pacjenci z CKD narażeni są na przyspieszony rozwój miażdżycy oraz zwiększone ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych. Jest to już trzeci realizowany przeze mnie projekt dotyczący tej tematyki, w tym drugi, którego jestem kierownikiem. Jego realizacja pozwoliła mi na poszerzenie grupy badawczej, a bezpośrednim skutkiem takiego rozwoju będzie formowanie nowego zespołu pracującego w obrębie Pracowni Spektrometrii Mas.

Podsumowując, osiągnięcie naukowe obejmuje cykl pięciu oryginalnych prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie znajdującym się w bazie *Journal Citation Reports*, których sumaryczny współczynnik wpływu IF (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi 17,977, a liczba punktów MNiSW wynosi 170. Łączna liczba cytowań na chwilę obecną wynosi 29, jednak w większości są to prace opublikowane niedawno, dwie z nich w roku 2016. We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem, który miał decydujący wpływ na ich powstanie wykonując większość analiz i prac eksperymentalnych oraz pisząc wszystkie manuskrypty. W czterech z tych prac jestem również autorem korespondencyjnym.

Literatura dodatkowa do punktu 4

Kronenberg F, Stühlinger M, Trenkwalder E i wsp. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000, 36: 751-757.

Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN i wsp. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *Am Soc Nephrol* 2007, 18: 913–922.

Emokpae MA, Uadia PO, Gadzama AA. Correlation of oxidative stress and inflammatory markers with the severity of sickle cell nephropathy. *Ann Afr Med* 2010, 9: 141-146.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC i wsp. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003, 108: 2154-2169.

Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA i wsp. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003, 2: 1096–1103.

Gundry RL, Fu Q, Jelinek CA i wsp. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl* 2007, 1: 73–88.

Guo, C-H, Wang C-L, Chen P-C i wsp. Linkage of some trace elements, peripheral blood lymphocytes, inflammation, and oxidative stress in patients undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2010, 31, 583–591.

Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002, 40: 221–226.

Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W i wsp. Cystatin C as a marker of GFR—History, indications, and future research. *Clin Biochem* 2005, 38: 1–8.

Yılmaz B. Serum 2-microglobulin as a biomarker in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014, 20: 10916.

Batra A, Kapoor A, Sharma RK i wsp. Association of plasma cystatin C levels with angiographically documented coronary artery disease in patients of Indian origin. *J Cardiol* 2012, 59: 182–189.

Stinghen AEM, Pecoits-Filho R. Vascular damage in kidney disease: Beyond hypertension. *Int J Hypertens* 2011, 2011: 232683.

Schindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19: V34–V40.

Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W i wsp. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochim Pol* 2006, 53: 663–677.

Byon CH, Chen Y. Molecular mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease: The link between bone and the vasculature. *Curr Osteoporos Rep* 2015, 13: 206–215.

Tousoulis D, Siasos G, Maniatis K i wsp. Serum osteoprotegerin and osteopontin levels are associated with arterial stiffness and the presence and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2013, 167: 1924–1928.

Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C i wsp. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 2011, 108: 1494–1509.

Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005, 16: 1685–1695.

Khrenov AV, Ananyeva NM, Griffin JH i wsp. Coagulation pathways in atherothrombosis. *Trends Cardiovasc Med* 2002, 12: 317–324.

Shlipak MG, Fried LF, Crump C i wsp. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003, 107: 87–92.

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 2009, 6: 27–35.

Gungor Z, Anuurad E, Enkhmaa B i wsp. Apo E4 and lipoprotein-associated phospholipase A2 synergistically increase cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2012, 223: 230–234.

Dahlbäck B i Nielsen LB. Apolipoprotein M-a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 2006, 17: 291–295.

Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R i wsp. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* 2009, 153; 77–85.

Santos-Gallego CG, Badimon JJ i Rosenson RS. Beginning to understand high-density lipoproteins. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2014, 43; 913–947.

Huang Y, DiDonato JA, Levison BS I wsp. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nature medicine* 2014, 20: 193–203.

Sattler K, Gräler M, Keul P, i wsp. Defects of high-density lipoproteins in coronary artery disease caused by low sphingosine-1-phosphate content: correction by sphingosine-1-phosphate-loading. *Journal of the American College of Cardiology* 2015, 66: 1470–1485.

Rosenblat M, Volkova N, Ward J I wsp. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis* 2011, 219: 49–56.

Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular research* 2014, 103: 350–361.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy należący do pozostałych osiągnięć, niezwiązanych z publikacjami do przewodu habilitacyjnego, obejmuje 21 prac, w tym 15 prac eksperymentalnych. Główny nurt mojej pracy naukowo-badawczej prowadzonej do czasu uzyskania stopnia doktora dotyczył badań związanych z proteomiką roślin, który to temat rozpoczęłam już na studiach, podczas wykonywania pracy magisterskiej w Instytucie Genetyki Roślin w Poznaniu. Z tym okresem wiąże się jedna praca eksperymentalna (**Bartkowiak i Łuczak, 2001**). W trakcie studiów doktoranckich moje zainteresowania skupiły się na proteomice roślinnych ścian komórkowych. Moja rozprawa doktorska była

jedną z pierwszych w Polsce prób wykorzystania proteomiki do badań materiału roślinnego. Ściany komórkowe są jednym z najtrudniejszych obiektów badań w biologii roślin, jednak udało mi się uzyskać dane o strukturalnych i funkcjonalnych powiązaniach między różnymi składnikami ścian i ich interakcjach podczas odpowiedzi roślin na różne bodźce. Dokonałam wszechstronnej analizy proteomu ścian trzech gatunków roślin analizując wyizolowane białka ścian, oczyszczone ściany komórkowe oraz nienaruszone komórki, które były traktowane różnymi czynnikami, aby prześledzić zmiany zachodzące w proteomie ścian. Opracowałam metodykę analizy złożonej organizacji ścian, którą wykorzystałam do poszukiwania białek uczestniczących w tworzeniu kontinuum ściana komórkowa-błona komórkowa-cytoszkielec. Badania zawarte w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w trzech pracach eksperymentalnych (**Wojtaszek i wsp., 2007; Łuczak i wsp., 2008; Łuczak i wsp., 2015a**). Dodatkowo tematyka związana ze ścianami komórkowymi została szeroko opisana w trzech pracach przeglądowych (**Łuczak i Wojtaszek, 2002; Rodakowska i wsp., 2006; Łuczak i wsp., 2009**) oraz w rozdziale książki „Na pograniczu Chemii i Biologii” (**Łuczak i wsp., 2003**). Badania zawarte w rozprawie doktorskiej wykonane i finansowane były częściowo w ramach projektu badawczego, a następnie projektu promotorskiego, finansowanych przez Komitet badań Naukowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora rozpoczęłam pracę w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN i skoncentrowałam swoje badania na materiale ludzkim. Było to podyktowane udziałem w realizacji projektu „Zastosowanie współczesnej genomiki funkcjonalnej i bioinformatyki do charakteryzacji i tworzenia modeli procesów biologicznych o istotnym znaczeniu w medycynie i rolnictwie”. Zmiana obiektu badawczego nie była łatwa i wymagała zastosowania odmiennego spojrzenia i zupełnie różnych technik badawczych. W tym czasie rozpoczęłam współpracę z grupą prof. dr hab. Mieczysława Komarnickiego z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nad badaniami dotyczącymi ostrej białaczki szpikowej. Ostra białaczka szpikowa (AML) jest złośliwą, klonalną, bardzo heterogenną genetycznie, chorobą tkanki krwiotwórczej, która charakteryzuje się upośledzonym wytwarzaniem prawidłowych elementów morfotycznych krwi, akumulacją nieprawidłowych komórek zwanych blastami, które naciekają różne narządy i tkanki. Różnorodność typów ostrej białaczki szpikowej AML jest ogromna. Obowiązujące modele prognostyczne, oparte na badaniach klinicznych i laboratoryjnych, charakteryzują się niską wartością predykcyjną. Stąd istnieje bezwzględna konieczność

podejmowania dalszych badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw transformacji białaczkowych oraz mechanizmu lekooporności. W ramach tej współpracy udało nam się zidentyfikować białka pomocne w odróżnieniu dwóch podtypów AML: M1 oraz M2, które choć wykazują istotne różnice w morfologii komórek, różnią się od siebie istotnie pod względem klinicznym. W kolejnym etapie badań zidentyfikowaliśmy białka różnicujące pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie i uzyskali remisję oraz proteomem pacjentów opornych na zastosowaną terapię. Jako pierwsi opublikowaliśmy proteom zdrowych komórek jednojądrzastych szpiku kostnego, który może stanowić referencję dla innych badań w tej tematyce (**Łuczak i wsp., 2012a**). Jednocześnie prowadziliśmy badania drugiego, co do częstości występowania złośliwego nowotworu układu krwiotwórczego: szpiczaka mnogiego. Współpraca z grupą prof. Komarnickiego była kontynuowana jednak dodatkowo rozpoczęliśmy również wspólne badania z zespołem prof. Andrzeja Jakubowiaka z Uniwersytetu w Chicago. W ramach wspólnej kooperacji z obydwoma zespołami przeprowadzona została porównawcza ocena proteomu plazmocytów chorych z opornym/nawrotowym szpiczakiem plazmocytowym celem identyfikacji białek oraz szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za oporność na leczenie bortezomibem. Zidentyfikowaliśmy białka o istotnym znaczeniu prognostycznym (**Dytfeld i wsp., 2016**), dzięki czemu możliwe było rozpoczęcie badań nad indywidualizacją leczenia inhibitorami proteasomu. W tym celu w 2015 roku rozpoczęliśmy współpracę z grupą dr Nate Doloffa z Wydziału Komórkowej i Molekularnej Farmakologii i Eksperymentalnej Terapeutyki z Uniwersytetu Medycznego w Karolinie Południowej. Grupa ta prowadzi badania nad opracowaniem leków nowej generacji służących do walki z lekooporną formą szpiczaka mnogiego i w tej chwili jest na etapie testowania leku na modelach mysich. Do publikacji mojego dorobku pochodzących ze współpracy z grupą prof. Komarnickiego i Jakubowiaka zaliczyć można 4 prace, w tym trzy prace eksperymentalne (**Łuczak i wsp., 2012a; Kazmierczak i wsp., 2013; Dytfeld i wsp., 2016**) oraz jedną pracę przeglądową (**Łuczak i wsp., 2012**). Obecnie pracujemy nad wspólną publikacją z grupą z Karoliny Południowej.

Zainteresowania transformacją nowotworową kontynuowałam we współpracy z zespołem prof. dr hab. Krzysztofa Szyftera. Głównym celem tych badań była charakterystyka zmian zachodzących w proteomie komórek w wyniku rozwoju płaskonabłonkowego raka krtani. Analizami objęto linie komórkowe LSCC (ang. laryngeal squamous cell carcinoma) wyprowadzone z guzów pierwotnych, przerzutowych oraz guzów pochodzących od

pacjentów ze wznową choroby. Wykazaliśmy grupę białek, których akumulacja jest wyraźnie zaburzona w komórkach pochodzących z guzów przerzutowych oraz w okresie wznowy choroby. Wyniki zostały potwierdzone na poziomie transkryptomu oraz w analizach immunolokalizacyjnych. W efekcie tych badań powstały 2 prace eksperymentalne: **Giefing i wsp., 2011** oraz **Bodnar i wsp., 2015**.

Jednocześnie prowadziłam współpracę z grupą prof. dr hab. Hieronima Jakubowskiego dotyczącą zjawiska homocysteinemii. Moje zainteresowanie tą tematyką wynika z faktu, iż podwyższony poziom homocysteiny (Hcy) w osoczu krwi jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz miażdżycy, a więc wątku ściśle związanego z moim osiągnięciem habilitacyjnym. Podwyższone stężenie Hcy w obecności adenozyiny prowadzi do powstania pochodnej, która w efekcie prowadzi do spadku liczby podziałów komórek śródbłonka, co jest wysoce niekorzystne ze względu na ochronną rolę tych komórek, które zabezpieczają naczynia tętnicze przed rozwojem miażdżycy (Wang i wsp., 1997). Z kolei w przypadku komórek mięśni gładkich, nadmiar homocysteiny powoduje nadmierne ich namnażanie (Tsai i wsp., 1996) i tym samym zwiększa opór obwodowy i przyczynia się pogrubienia ścian tętnic sprzyjając rozwojowi nadciśnienia tętniczego oraz nasileniu miażdżycy. W jednej z hipotez mechanizmu toksyczności Hcy sugeruje się, że u jej podstaw leży (katalizowana przez syntetazę metionilo-tRNA) konwersja do tiolaktonu-Hcy (Jakubowski i wsp., 2004; Jakubowski i wsp., 2005). Konwersja ta jest zintensyfikowana przy zaburzeniach reakcji remetylacji i transulfuracji, spowodowanych niedoborem któregośkolwiek z enzymów zaangażowanych w metabolizm Hcy oraz zaburzeniami żywienia (wysokometioninowa dieta, niedobory witamin z grupy B). Tiolakton-Hcy tworzy wiązanie amidowe z grupą ε-aminową lizyny w białku, a proces ten określany jest mianem N-homocysteinylacji. Znane są liczne patofizjologiczne konsekwencje obecności N-homocysteinylowanych białek w organizmie, między innymi: toksyczność komórkowa, indukcja odpowiedzi autoimmunologicznej, agregacja N-Hcy-fibrynogenu w zakrzepicy oraz zaostrzenie stanu zapalnego naczyń krwionośnych (Perla i wsp., 2004). Tiolakton homocysteiny jest usuwany z organizmu człowieka i myszy poprzez dwa mechanizmy: eliminację przez nerki oraz hydrolizę enzymatyczną poprzez tiolaktonazy. Nasze badania polegały na określeniu roli, jaką w metabolizmie homocysteiny w komórkach wątroby i mózgu odgrywają takie tiolaktonazy jak: hydrolaza bleomycyny (BLMH) oraz paraoksonaza 1 (PON1). Udało nam się wykazać, że inaktywacja genów kodujących obie tiolaktonazy-Hcy

prowadzi do obniżenia poziomów białek zaangażowanych w produkcję energii w komórce oraz znacznego zmniejszenia poziomów apoA-I oraz apo-E, które chronią przed chorobami neurodegeneracyjnymi i naczyniowo-sercowymi. Ponadto wykazaliśmy, że inaktywacja genu kodującego hydrolazę bleomycyny wywołuje zmiany w poziomach białek mózgu analogiczne do obserwowanych w modelach mysich choroby Alzheimerera. Zasugerowaliśmy, że zmniejszona w porównaniu do grupy kontrolnej aktywność enzymatyczna BLMH w mózгах chorych może przyczyniać się do rozwoju choroby Alzheimerera. Efektem tej współpracy są trzy publikacje eksperymentalne (**Suszynska-Zajczyk i wsp., 2014; Suszynska-Zajczyk i wsp., 2014a; Suszynska-Zajczyk i wsp., 2014b**).

Oprócz tematyki opisanej powyżej, podejmowałam również badania dotyczące innych zagadnień. Nawiązałam współpracę z grupą Zakładu Fizjologii Roślin kierowana przez panią prof. dr hab. Jolantę Legocką, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza. Tematem współpracy była rola transglutaminaz oraz los chloroplastowych poliamin w procesie starzenia się roślin wywołanych ciemnością. Udało nam się wykazać, że jedna z chloroplastowych transglutaminaz liści jęczmienia jest aktywowana w tym procesie, co potwierdziliśmy zarówno na poziomie genu jak i białka. Ponadto wykazaliśmy, że enzym ten dokonuje modyfikacji potranslacyjnych białek związanych z poliaminami co może wywoływać specyficzną reakcję na stres, zahamowanie fotosyntezy oraz śmierć komórek przejawiającą się konwersją chloroplastów do gerontoplastów i w efekcie degradacji plastydów. Współpraca ta zaowocowała powstaniem publikacji **Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2015**. Z kolei współpraca z Zakładem Genetyki i Żywienia Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, dotyczyła białka-kazeiny obecnej w mleku końskim. Pierwotnym celem tego badania był screening polimorfizmów w sekwencji kodującej kazeinę koni i ocena rozkładu wariantów genetycznych w różnych rasach tego gatunku. Ponadto dokonaliśmy oceny potencjalnego wpływu wykrytych wariantów genetycznych na zmienność ekspresji na poziomie mRNA oraz białka. Efektem tej współpracy jest eksperymentalna publikacja: **Cieslak i wsp., 2016**. Oprócz prac oryginalnych mój dorobek obejmuje również współautorstwo publikacji przeglądowej powstałej, jako bezpośredni skutek międzynarodowej konferencji naukowej, 9th Central and Eastern European Proteomic Conference (9th CEEPC), której miałam przyjemność być głównym organizatorem, a która odbyła się w Poznaniu w 2015 roku (**Gadher i wsp., 2016**). Praca ta streszcza główną

tematykę sesji konferencyjnych i trendy w proteomice charakterystyczne dla krajów wschodniej i centralnej Europy.

Podsumowując, tematyka białek i ich udział w mechanizmach molekularnych procesów patologicznych człowieka jest obecna w moich badaniach od czasów obrony pracy doktorskiej. Przez lata doskonaliłam swój warsztat proteomiczny poznając nowe techniki i narzędzia badawcze. Wszystkie analizy eksperymentalne zarówno z dziedziny biochemii jak spektrometrii mas przeprowadzam samodzielnie wglębiając się w chemiczne aspekty przeprowadzanych analiz. Swoją wiedzę teoretyczną pogłębiłam korzystając ze szkoleń zagranicznych i krajowych oraz uczestnicząc w tematycznych konferencjach naukowych. Mój dorobek naukowy należący do pozostałych osiągnięć, niezwiązanych z publikacjami do przewodu habilitacyjnego, obejmuje 21 prac, w tym 15 prac eksperymentalnych, których sumaryczny współczynnik wpływu IF (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **44,266**, a liczba punktów MNiSW wynosi **501**. Piętnaście prac opublikowanych jest w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, a łączna liczba ich cytowań na chwilę obecną wynosi **83**.

Literatura dodatkowa do punktu 5

Wang H, Yoshizumi M, Lai K, i wsp. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25380-25385.

Tsai JT, Wang H, Perrella MA i wsp. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1996, 97: 146-153.

Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 470-487.

Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43: 1011-1014.

Perla J, Undas A, Twardowski T, i wsp. Purification of antibodies against N-homocysteinylated proteins by affinity chromatography on Nomega-homocysteinyl-aminohexyl-Agarose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004, 807: 257-261.

Magdalena Łuczak