

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

dr Katarzyna Roszek

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Biochemii
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń**

Toruń 2017

1. Imię i Nazwisko: **Katarzyna Roszek**

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

2006 - dyplom doktora nauk biologicznych

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Sterolosulfohydrolaza siarczanu cholesterolu z lizosomów łożyska
ludzkiego”

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka

Recenzenci: prof. dr hab. Alicja Drabikowska (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa), prof.
dr hab. Alojzy Zgirski (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź).

1998 - dyplom magistra biologii

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł pracy magisterskiej: „Aktywność sulfohydrolityczna względem siarczanu cholesterolu w
oczyszczonej frakcji lizosomalnej z łożyska ludzkiego”

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka

Recenzent: prof. dr hab. Zofia Bargiel

1998 - dyplom ukończenia Międzywydziałowego Studium Pedagogicznego przy Uniwersytecie
Mikołaja Kopernika w Toruniu

1994 - Dyplom First Certificate in English, grade A, University of Cambridge, England, nr ref.:
94CPL0040064

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

od 1. 10. 2008 do aktualnie – adiunkt w Zakładzie Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony
Środowiska, UMK w Toruniu

od 1. 10. 1998 do 30. 09. 2008 – asystent w Zakładzie Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i
Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMK w Toruniu

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:

**„Sygnalizacja purynergiczna w mezenchymalnych komórkach macierzystych
i komórkach zróżnicowanych, ze szczególnym uwzględnieniem udziału ekto-enzymów
metabolizujących puryny”**

b/ publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5. Wartość IF wg JCR i punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, z wyjątkiem publikacji opublikowanych w roku 2017, dla których przyjęto IF i punktację MNiSW jak w roku 2016.

* zaznaczono autora korespondencyjnego.

1. **Roszek K***, Błaszczak A, Wujak M, Komoszyński M. Nucleotides metabolizing ecto-enzymes as possible markers of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. *Biochem Cell Biol* 2013; 91: 176-181.
IF₂₀₁₃ = 2,350; pkt MNiSW = 20
Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, hodowli komórek macierzystych i optymalizacji warunków ich różnicowania oraz oznaczaniu aktywności ekto-enzymów. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, przygotowałam całość manuskryptu w języku angielskim oraz brałam udział w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 70%.
2. **Roszek K***, Bomastek K, Drożdzał M, Komoszyński M. Dramatic differences in activity of purines metabolizing ecto-enzymes between mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood and umbilical cord tissue. *Biochem Cell Biol* 2013; 91: 519-525.
IF₂₀₁₃ = 2,350; pkt MNiSW = 20
Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, pozyskiwaniu krwi pępowinowej, oznaczaniu aktywności ekto-enzymów i wykonaniu analiz cytometrycznych. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, przygotowałam całość manuskryptu w języku angielskim oraz brałam udział w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 75%.
3. **Roszek K***, Porowińska D, Bajek A, Hołysz M, Czarnecka J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells results in substantial changes of ecto-nucleotides metabolism. *J Cell Biochem* 2015; 116: 2915–2923.
IF₂₀₁₅ = 3,446; pkt MNiSW = 30
Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, hodowli komórek macierzystych i optymalizacji warunków ich różnicowania, oznaczaniu aktywności ekto-enzymów oraz izolacji RNA. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, przygotowałam całość manuskryptu w języku angielskim oraz brałam udział w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 70%.
4. **Roszek K***, Czarnecka J. Is ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)-based therapy of central nervous system disorders possible? *Mini Rev Med Chem* 2015; 15: 5-20 (**INVITED REVIEW**).
IF₂₀₁₅ = 2,841; pkt MNiSW = 30

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji artykułu, przeglądzie literatury i przygotowaniu tekstu manuskryptu w języku angielskim. Brałam udział w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 60%.

5. Czarnecka J, Porowińska D, Bajek A, Hołysz M, **Roszek K***. Neurogenic differentiation of mesenchymal stem cells induces alterations in extracellular nucleotides metabolism. J Cell Biochem 2016, doi 10.1002/jcb.25664.

IF₂₀₁₆ = 3,446; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz współudziale w hodowli komórek MSC i komórek indukowanych w kierunku neurogenezy. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, brałam udział w redagowaniu tekstu manuskryptu w języku angielskim oraz w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 20%.

6. **Roszek K***, Makowska N, Czarnecka J, Porowińska D, Dąbrowski M, Danielewska J, Nowak W. Canine adipose-derived stem cells: purinergic characterization and neurogenic potential for therapeutic applications. J Cell Biochem 2017; 118: 58-65.

IF₂₀₁₆ = 3,446; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, koordynowaniu i interpretacji doświadczeń, hodowli komórek macierzystych i optymalizacji warunków ich różnicowania, oznaczaniu aktywności ekto-enzymów oraz izolacji RNA. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, przygotowałam całość manuskryptu w języku angielskim, brałam udział w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 70%.

7. Wujak M, Hetmann A, Porowińska D, **Roszek K***. Gene expression and activity profiling reveal a significant contribution of soluble phosphotransferases to the metabolism of extracellular nucleotides in HUVEC endothelial cells. J Cell Biochem 2016a, doi 10.1002/jcb.25791.

IF₂₀₁₆ = 3,446; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i optymalizacji hodowli komórek HUVEC. Współuczestniczyłam w opracowaniu wyników badań, brałam udział w redagowaniu tekstu manuskryptu w języku angielskim oraz w korektach wydawniczych jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy w powstaniu tej pracy szacuję na 25%.

Sumaryczny IF osiągnięcia = 21,325

Ilość punktów MNiSW = 175

c/ omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania - cytowania prac naukowych wchodzących w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego zostały podkreślone. Wszystkie cytowania umieszczono w spisie literatury.

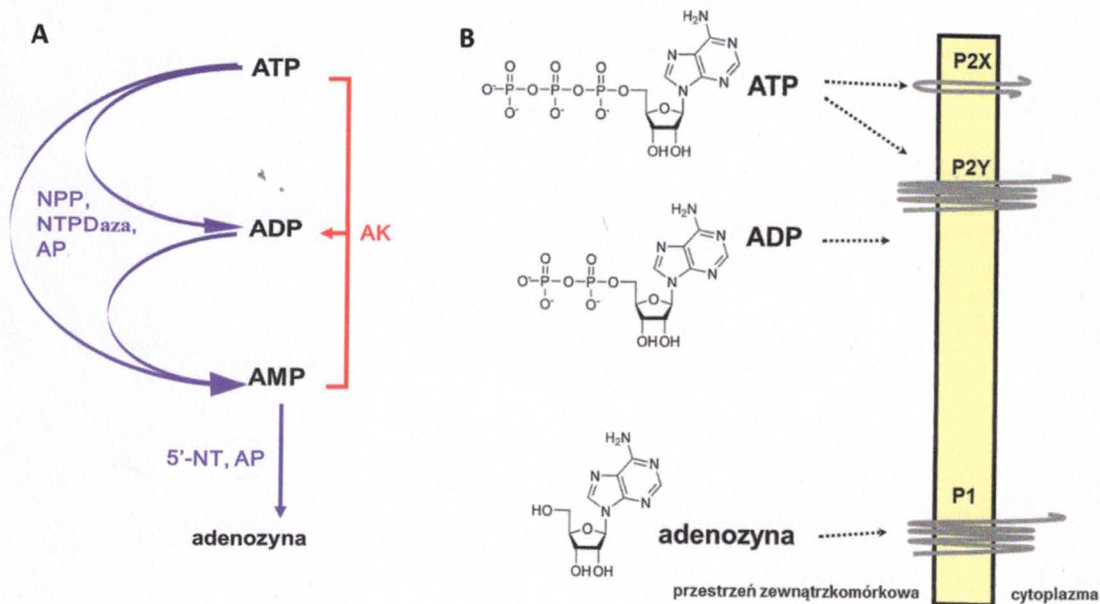
Wprowadzenie

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy i nukleozydy purynowe są cząsteczkami sygnalizacyjnymi, które uczestniczą w regulacji wielu procesów fizjologicznych w organizmie, m. in. transmisji synaptycznej, hemostazy i odpowiedzi immunologicznej [Burnstock 2007, 2009, Burnstock i Ralevic 2014]. Na poziomie komórkowym cząsteczki te regulują aktywność kanałów jonowych oraz wywołują efekty troficzne: wpływają na procesy proliferacji, apoptozy, migracji i różnicowania komórek [Burnstock i Verkhatsky 2010, Burnstock i Ulrich 2011, Glaser i wsp. 2012]. Uwalnianie nukleotydów w warunkach patologicznych i/lub długotrwała ekspozycja komórek na te cząsteczki (w szczególności ATP) mogą także generować efekty cytotoksyczne, inicjować i amplifikować procesy zapalne oraz hamować proliferację większości wyspecjalizowanych komórek [Idzko i wsp. 2014, Cauwels i wsp. 2014]. Metabolizm ekto-nukleotydów wymaga precyzyjnej regulacji, gdyż jest przykładem czułego układu równowagowego – zarówno nadmierne zwiększenie stężenia, jak i brak ATP czy ADP w przestrzeni pozakomórkowej lub zmiana ich wzajemnych proporcji, mogą prowadzić do zmiany jakości sygnału i procesów patologicznych. Stężenie nukleotydów wewnątrz komórki wynosi około 1–2 mM, podczas gdy do aktywacji receptorów i inicjacji sygnału nukleotydowego na zewnątrz komórki wystarczą już stężenia mikromolowe, a nawet nanomolowe [Zimmermann 2016]. Ekto-enzymy metabolizujące nukleotydy odpowiadają za terminację sygnału nukleotydowego oraz utrzymywanie równowagi stężeń puryn w środowisku zewnątrzkomórkowym, a nieprawidłowości w zakresie funkcjonowania ekto-enzymów leżą u podłoża wielu schorzeń [Robson i wsp. 2006, Zimmermann i wsp. 2012, Roszek i Czarnecka 2015].

W literaturze wiele miejsca poświęcono sygnalizacji purynergicznej, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu ekspresji i rozmieszczenia receptorów nukleotydowych (typu P2X i P2Y) oraz receptorów adenozyliny (typu P1) w różnych typach komórek. Natomiast **kwestia udziału ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy, profilu ich ekspresji i aktywności, była przez wiele lat niewystarczająco badana i opisywana.**

Ekto-enzymy uczestniczące w metabolizmie puryn to przedstawiciele kilku rodzin klasy hydrolaz oraz kinazy. Ich obecność stwierdzono we wszystkich przebadanych dotąd organizmach i tkankach. Z uwagi na pochodzenie oraz różnice w mechanizmie katalizowanych reakcji wyróżniamy cztery rodziny ekto-nukleotydaz: ekto-NPP (ekto-pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydów, ang. ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; EC 3.1.4.1), ekto-NTPDazy (ekto-fosfohydrolazy di- i trifosfonukleozydów, ang. ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase; EC 3.6.1.5) oraz alkaliczne fosfatazy (EC 3.1.3.1) i ekto-5'-nukleotydazy (EC 3.1.3.6) [Robson i wsp. 2006, Zimmermann i wsp. 2012]. Drugą grupą ekto-enzymów, współuczestniczących w regulacji stężenia

nukleotydów, są kinazy nukleotydowe, a wśród nich kinaza adenylanowa (EC 2.7.4.3), która katalizuje transfer grupy fosforanowej pomiędzy nukleotydami [Yegutkin 2008]. Współdziałanie ekto-enzymów z różnych klas pozwala na utrzymywanie w przestrzeni pozakomórkowej równowagi między ligandami receptorów P1 i P2 (Ryc. 1A), a tym samym regulację jakości, intensywności i czasu trwania sygnału nukleotydowego (Ryc. 1B).



Ryc. 1. System sygnalizacji purynergicznej w przestrzeni pozakomórkowej. A/ współdziałanie ekto-enzymów w utrzymaniu równowagi nukleotydowej; B/ aktywacja receptorów typu P. Objasnienia skrótów: NPP - pirofosfataza nukleotydowa, NTPDaza - fosfohydrolaza di- i trifosfonukleozydów, AP - alkaliczna fosfataza, AK – kinaza adenylanowa, 5'-NT - 5'-nukleotyda; szczegóły w tekście.

Niewystarczające dane literaturowe dotyczące udziału ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy w regulacji sygnalizacji purynergicznej oraz wstępne badania *ex vivo* nad aktywnością tych enzymów w różnych tkankach ludzkich i zwierzęcych, prowadzone w Zakładzie Biochemii w zespole prof. Komoszyńskiego [Kukulski i wsp. 2004, Łęcka i wsp. 2010, Czarnecka i wsp. 2011], zaowocowały podjęciem przeze mnie tematyki badawczej związanej z udziałem sygnalizacji purynergicznej, ze szczególnym uwzględnieniem ekto-enzymów metabolizujących puryny, w fizjologii różnych typów komórek w hodowlach *in vitro*. W toku badań okazało się, że komórki macierzyste znacząco różnią się wrażliwością na sygnał purynergiczny i profilem aktywności ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy od komórek indukowanych do różnicowania i komórek dojrzałych. Wynika to z ich szczególnych właściwości biologicznych, zaangażowania w procesy regeneracji i

zdolności do immunosupresji. Stąd też zrodziła się moja koncepcja skierowania uwagi na analizę porównawczą elementów systemu sygnalizacji purynergicznej w wyżej wymienionych typach komórek.

Celem naukowym prezentowanego cyklu prac było:

- określenie różnic we wrażliwości mezenchymalnych komórek macierzystych, komórek indukowanych do różnicowania oraz komórek dojrzałych na sygnały nukleotydowe
- zbadanie profilu aktywności i ekspresji ekto-enzymów uczestniczących w metabolizmie puryn na powierzchni mezenchymalnych komórek macierzystych, komórek indukowanych do różnicowania oraz komórek dojrzałych
- określenie zależności pomiędzy profilem sygnalizacji purynergicznej komórek a ich właściwościami biologicznymi, potencjałem proliferacyjnym i możliwościami różnicowania.

Omówienie uzyskanych wyników

Cykl siedmiu prac wchodzących w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego dotyczy analizy profilu sygnalizacji purynergicznej (czyli wrażliwości na zewnątrzkomórkowe sygnały nukleotydowe i zdolności do ich modyfikacji) mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) izolowanych z różnych źródeł, komórek indukowanych do różnicowania i komórek dojrzałych. W swojej pracy badawczej szczególny nacisk położyłam na uwzględnienie udziału ekto-enzymów metabolizujących puryny, dotychczas niedocenianych, a przecież aktywnie kontrolujących stężenie ekto-nukleotydów i nukleozydów w przestrzeni pozakomórkowej, a tym samym regulujących jakość, siłę i czas trwania sygnału nukleotydowego.

Dane literaturowe opublikowane w latach 2007-2011 [Riddle i wsp. 2007, Coppi i wsp. 2007, Katebi i wsp. 2008, Ferrari i wsp. 2011] były pierwszymi dotyczącymi udziału sygnalizacji nukleotydowej w fizjologii komórek macierzystych. Wyniki tych prac wskazują na pro-proliferacyjne działanie adenozyliny oraz przeciwstawny wpływ ATP na regulację tempa proliferacji MSC. Niestety, są to dane niepełne, często trudne do porównania, dotyczą różnych typów komórek oraz nie uwzględniają obecności i aktywności ekto-enzymów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Trudno zatem na ich podstawie wyciągnąć jednoznaczne wnioski dotyczące wpływu sygnału nukleotydowego na komórki macierzyste.

Realizując postawione sobie cele naukowe, w pierwszym etapie swojej pracy badawczej wykorzystywałam jako model eksperymentalny hodowle *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z różnych tkanek zwierzęcych i ludzkich. MSC to komórki pozyskiwane z tkanek dojrzałych organizmów (głównym ich źródłem jest szpik kostny, tkanka tłuszczowa, miazga

zębów mlecznych) oraz z tkanek okołoporodowych (krew pępowinowa, sznur pępowiny) [Bieback i Klüter 2007, Roszek i Komoszyński 2008, Gese i Roszek 2011]. Cechują się dość znaczną heterogennością w zakresie warunków hodowli, tempa proliferacji i możliwości różnicowania, dlatego ich zdefiniowanie wymagało ustalenia tzw. kryteriów minimalnych. Według tych kryteriów MSC to komórki adherentne, wykazujące obecność markerów powierzchniowych CD90, CD105 i CD73, brak ekspresji antygenów hematopoetycznych (np. CD34) oraz zdolność do różnicowania *in vitro* przynajmniej w osteoblasty, chondroblasty i adipocyty [Dominici i wsp. 2006, Ho i wsp. 2008, Mafi i wsp. 2011]. Analiza danych literaturowych dowodzi też zdolności MSC do różnicowania w inne komórki, zarówno pochodzenia mezodermalnego (mięśnie gładkie, endotelium), jak i w komórki neuralne [Janeczek-Portalska i wsp. 2012, Taran i wsp. 2014, Kaebisch i wsp. 2015].

Pod koniec 2007 roku, po odbyciu stażu z zakresu hodowli komórkowej w Zakładzie Inżynierii Tkanekowej Collegium Medicum w Bydgoszczy, rozpoczęłam współpracę z Oddziałem Ginekologiczno-Położniczym Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. L. Rydygiera w Toruniu w zakresie pozyskiwania krwi pępowinowej i sznura pępowiny. Na badania uzyskałam zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej. Z pobranego materiału izolowałam komórki MSC oraz samodzielnie zoptymalizowałam warunki ich hodowli. Następnie, mezenchymalne komórki macierzyste indukowałam w warunkach *in vitro* do różnicowania w kierunku osteoblastów, chondroblastów i komórek neuroprogenitorowych. Prowadziłam też hodowle mysich MSC ze szpiku kostnego, które różnicowałam głównie do osteoblastów.

Opublikowane w latach 2012-2013 wstępne wyniki moich badań wykazały **możliwość kontroli potencjału proliferacyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych hodowanych w warunkach *in vitro* przez suplementację pożywki hodowlanej odpowiednimi stężeniami adenozyiny, ATP lub bzATP** (analog ATP, agonista receptorów P2X). Zgodnie z danymi literaturowymi adenozyina stymulowała proliferację MSC, co ciekawe, podobny efekt zaobserwowałam także w obecności niskich, mikromolowych stężeń ATP [Roszek i wsp. 2013a]. W celu wyjaśnienia czy ekto-nukleotydy i ekto-adenozyina, dodawane do pożywki hodowlanej, podlegają przemianom metabolicznym przy udziale ekto-enzymów, konieczna była analiza ich aktywności. Do oznaczeń jakościowych i ilościowych nukleotydów i nukleozydów, będących produktami przemian katalizowanych przez ekto-enzymy, wykorzystywałam metodę HPLC. Izolowałam także RNA z badanych komórek w celu analizy ekspresji genów kodujących ekto-enzymy zaangażowane w metabolizm nukleotydów.

W wyniku przeprowadzonych analiz ekspresji i aktywności enzymów **stwierdziłam po raz pierwszy obecność transkryptów oraz aktywność ekto-enzymów metabolizujących nukleotydy, tj. ekto-NTPDazy 1, 3 i 8** w niezróżnicowanych mysich mezenchymalnych komórkach macierzystych ze szpiku kostnego oraz w komórkach różnicowanych w kierunku osteoblastów [Roszek i wsp. 2012, Roszek i wsp. 2013a]. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na wnioskowanie, że różnicowanie komórek

macierzystych *in vitro* zmienia profil ekspresji i aktywności ekto-enzymów metabolizujących puryny [Roszek i wsp. 2012, Roszek i wsp. 2013a]. **W zróżnicowanych osteoblastach rośnie ekspresja i aktywność ekto-NTPDaz i ekto-kinazy adenylanowej, spada natomiast aktywność ekto-5'-nukleotydyzy. Dominującym kierunkiem metabolizmu nukleotydów staje się hydroliza ATP i ADP, spada natomiast intensywność hydrolizy AMP do adenozyiny (katalizowanej przez 5'-nukleotydyzę).** Zmienia się również wrażliwość komórek zróżnicowanych na nukleotydy: ATP w przestrzeni pozakomórkowej, jeśli nie zostanie usunięty przez aktywne ekto-enzymy, interpretowany jest jako sygnał do obniżenia tempa proliferacji.

W dalszych badaniach wykazałam różnice w aktywności ekto-5'-nukleotydyzy (CD73, 5'-NT) na powierzchni ludzkich komórek MSC izolowanych z krwi pępowinowej i sznura pępowiny [Roszek i wsp. 2013b]. Białko CD73 jest uznane jako jeden z markerów mezenchymalnych komórek macierzystych, ale bada się najczęściej jego obecność, a nie aktywność enzymatyczną. Natomiast biorąc pod uwagę funkcjonowanie systemu sygnalizacji purynergiczej, konieczne jest określenie aktywności tej ekto-nukleotydyzy. To nowatorskie podejście pozwoliło mi na **stwierdzenie zależności między aktywnością 5'-NT a tempem proliferacji mezenchymalnych komórek macierzystych. Wyniki moich badań wskazują, że wysoka aktywność 5'-NT cechuje komórki o dużym potencjale proliferacyjnym**, podatne na stymulujące działanie ekto-adenozyny. Aktywność ekto-NTPDaz na powierzchni tych komórek jest niska [Roszek i wsp. 2013b]. Ponadto, w serii eksperymentów udowodniłam, że komórki MSC pochodzące z różnych tkanek mają inny profil ekspresji i aktywności ekto-enzymów metabolizujących puryny, a to znajduje odzwierciedlenie w odmiennych właściwościach, wrażliwości na nukleotydy i potencjale biologicznym tych komórek. Różnice te korelują także z obecnością markerów mezenchymalnych komórek macierzystych (CD90, CD105, CD73). Analiza cytometryczna wykazała, że komórki o wysokiej aktywności 5'-NT i niskiej aktywności NTPDazowej prezentują na powierzchni antygeny CD90, CD105 i CD73 [Roszek i wsp. 2013b].

Otrzymane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie początkowych wniosków o powiązaniu aktywności ekto-nukleotydyz z potencjałem biologicznym MSC – **komórki z wysoką aktywnością 5'-nukleotydyzy katalizującej produkcję adenozyiny z AMP, a pozbawione aktywności ekto-NTPDaz to komórki pierwotne, niezróżnicowane, o dużym potencjale proliferacyjnym i regeneracyjnym**, reagujące wzrostem tempa proliferacji na ekto-adenozynę oraz na niewielkie stężenia ATP w środowisku zewnątrzkomórkowym. **Z kolei komórki o niskim potencjale biologicznym lub komórki indukowane do różnicowania cechuje obecność NTPDaz aktywnie usuwających ekto-ATP oraz niska aktywność 5'-nukleotydyzy.** Komórki takie na obecność pozakomórkowego ATP reagują spadkiem tempa proliferacji, a więc wszelkie nieprawidłowości w aktywności ekto-nukleotydyz skutkują inicjacją procesów patologicznych. Uzyskane wyniki były tak interesujące, że pociągnęło to za sobą

konieczność dalszych badań nad komórkami MSC i wywodzącymi się z nich komórkami różnicowanymi. Badania te uzyskały finansowanie w ramach grantu Rektora UMK (Grant Rektora nr 501-B/2013).

Nawiązanie w 2012 roku współpracy z Polskim Bankiem Komórek Macierzystych (PBKM) w Warszawie pozwoliło mi na udoskonalenie warsztatu badawczego i optymalizację metod hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych ze sznura pępowiny (UC-MSC). Tym samym zapoczątkowałam dynamiczny rozwój hodowli komórek macierzystych w Zakładzie Biochemii UMK oraz ich wykorzystanie jako modelu badawczego, kontynuowane do chwili obecnej.

Realizacja badań z wykorzystaniem UC-MSC potwierdziła wcześniejsze obserwacje, tj. zmiany profilu ekspresji i aktywności ekto-enzymów metabolizujących puryny w mezenchymalnych komórkach macierzystych indukowanych do różnicowania [Roszek i wsp. 2015, Czarnecka i wsp. 2016]. **W komórkach indukowanych do różnicowania w chondrocyty rośnie ekspresja i aktywność ekto-NTPDaz (szczególnie ekto-NTPDazy 1 i 3), spada natomiast ekspresja i aktywność ekto-5'-nukleotyduazy.** Dominującym kierunkiem metabolizmu nukleotydów staje się, podobnie jak w przypadku osteoblastów, hydroliza ATP i ADP, spada natomiast intensywność hydrolizy AMP do adenozyliny [Roszek i wsp. 2015]. **Również w komórkach neuroprogenitorowych znacząco wzrasta poziom ekspresji błonowych ekto-NTPDaz 1, 3 i 8, co znajduje odzwierciedlenie we wzroście aktywności hydrolitycznej względem ATP i ADP [Czarnecka i wsp. 2016].** Ekspresja genu kodującego 5'-NT spada, chociaż aktywność tego enzymu pozostaje na zbliżonym poziomie, co może być wynikiem krótkiego, 3-dniowego okresu indukcji neurogenezy i obecnością białka enzymatycznego w błonie komórkowej. **Co ciekawe, w komórkach indukowanych w kierunku neurogenezy suplementacja 20 i 100 μ M ATP dodatkowo zwiększa wydajność różnicowania,** co zostało potwierdzone analizą immunomagnetyczną obecności antygenów powierzchniowych. Wydajność różnicowania wyrażona została jako odsetek komórek prezentujących na powierzchni antygen NCAM (marker prekursorów neuronalnych) lub A2B5 (marker prekursorów gleju). Jednocześnie wzrasta kilkukrotnie aktywność hydrolityczna tych komórek względem ekto-ATP i ekto-ADP, w porównaniu z komórkami neuroprogenitorowymi różnicowanymi bez suplementacji ATP [Czarnecka i wsp. 2016].

Podsumowując wyniki powyższych badań, należy postawić pytanie: dlaczego niezróżnicowane komórki macierzyste prezentują niską aktywność hydrolityczną względem ATP i ADP, która rośnie dopiero w trakcie różnicowania? W mojej opinii jest to spowodowane faktem, iż **sygnał w postaci ATP jest odbierany przez MSC jako bodziec do ich mobilizacji, zwiększenia tempa proliferacji, wydajności różnicowania i regeneracji lokalnych uszkodzeń.** Nie może więc być usuwany na drodze hydrolizy przez aktywne ekto-NTPDazy. W trakcie eksperymentów potwierdziłam

wielokrotnie, iż **mezenchymalne komórki macierzyste cechuje odmienna od komórek zróżnicowanych wrażliwość na sygnały ekto-nukleotydydowe, co wiąże się niewątpliwie z ich szczególnym potencjałem i zdolnością do regeneracji tkanek oraz procesów naprawczych.**

Podobne wyniki uzyskałam także w trakcie badań psich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej - niezróżnicowanych oraz indukowanych w kierunku neurogenezy [Roszek i wsp. 2017]. Komórki niezróżnicowane, o dużym potencjale proliferacyjnym i regeneracyjnym są pozbawione aktywności NTPDaz, a na mikromolowe stężenia ATP i adenozyiny w środowisku zewnątrzkomórkowym reagują wzrostem tempa proliferacji. Komórki indukowane do różnicowania cechuje znaczący (w przypadku psich MSC nawet kilkunastokrotny) wzrost aktywności NTPDaz. Wydaje się, iż niezależnie od źródła, z którego pozyskujemy MSC, ich potencjał biologiczny (tj. tempo proliferacji i zdolność do różnicowania) wzrasta w obecności niewielkich, mikromolowych stężeń ATP. **Zaobserwowane w naszym laboratorium różnice wskazują na odmienne „oblicze” ATP i inny niż wyłącznie cytotoksyczny wpływ ATP na mezenchymalne komórki macierzyste hodowane *in vitro*.** O tym, że jest to efekt sygnalizacji zewnątrzkomórkowej, inicjowany aktywowaniem receptorów typu P2X, świadczy podobny wpływ bzATP, który jest silnym agonistą tych receptorów [Roszek i wsp. 2017].

Tym niemniej, w literaturze ATP funkcjonuje jako cząsteczka o działaniu cytotoksycznym, chociaż coraz więcej jest przesłanek wskazujących na jej „drugą twarz” i działanie anty-apoptotyczne oraz zwiększające tempo proliferacji [Leung 2011, Adinolfi i wsp. 2009]. **Wyniki prowadzonych przeze mnie badań wskazują, że ATP generuje efekty cytotoksyczne oraz hamuje proliferację komórek zróżnicowanych i dojrzałych, podczas gdy w mezenchymalnych komórkach macierzystych zwiększa tempo proliferacji i/lub zdolność do różnicowania, a tym samym ich potencjał regeneracyjny.** Efekt promowania proliferacji i różnicowania przez sygnał nukleotydydowy jest szczególnie widoczny w komórkach indukowanych w kierunku neurogenezy [Czarnecka i wsp. 2016], co znajduje potwierdzenie w rosnącej ilości podobnych obserwacji publikowanych ostatnio przez inne zespoły badawcze [Bocazzi i wsp. 2014, Miras-Portugal i wsp. 2016].

Spośród ekto-nukleotydydów, ATP jest uznany za najsilniejszy aktywator procesów zapalnych. Wydzielany podczas stresu komórkowego pełni funkcję cząsteczki typu DAMP (ang. danger-associated molecular-pattern molecule) i aktywuje odpowiedź komórek na warunki stresowe. Powszechnie akceptowany jest fakt, że w układzie nerwowym wysoki poziom ATP (uwalnianego z uszkodzonych komórek i nie usuwanego przez często dysfunkcyjne ekto-nukleotydyazy) leży u podłoża przedłużających się stanów zapalnych i chorób neurodegeneracyjnych [Sperlagh i wsp. 2006]. W literaturze istnieją też doniesienia o zastosowaniu NTPDazy (apirazy) w układach *in vitro* i *in vivo* w celu usuwania ATP w środowisku zewnątrzkomórkowym, a tym samym zmniejszenia efektów

ekscytotoksycznych nukleotydu [Bayliss i wsp. 2014, Li i wsp. 2014, Marcus i wsp. 2003]. **Przegląd literatury i podsumowanie wiedzy na temat możliwości wykorzystania terapeutycznego NTPDazy, w szczególności w schorzeniach i dysfunkcjach układu nerwowego, zawarłam w pracy przeglądowej napisanej na zaproszenie do numeru specjalnego Mini Reviews in Medicinal Chemistry [Roszek i Czarnecka 2015].** Takie podejście terapeutyczne powinno jednak uwzględniać fakt pozytywnego wpływu ATP na niektóre typy komórek i dążyć nie do całkowitego usuwania tego nukleotydu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, ale raczej do przywrócenia równowagi nukleotydowej.

Opisane powyżej różnice w profilu purynergicznym dotyczą komórek MSC indukowanych do różnicowania w osteoblasty, chondrocyty czy komórki linii neuronalnej, co dowodzi że zmiany pojawiają się na wczesnych etapach indukcji różnicowania i dojrzewania komórek. Jako uzupełnienie i potwierdzenie tych wniosków, postanowiłam określić profil sygnalizacji purynergiczej w komórkach wyspecjalizowanych, używając jako modelu linii komórkowej ludzkich komórek endotelialnych żyły pępowinowej (HUVEC). Uzyskane wyniki wskazują na najwyższy poziom ekspresji NTPDazy 1 wśród NTPDaz błonowych, co wiąże się z dominującą aktywnością hydrolityczną względem ATP i ADP na powierzchni komórek HUVEC [Wujak i wsp. 2016a]. Co ciekawe, **aktywność ekto-nukleotydaz średnio 2,5-krotnie przewyższa aktywność pozakomórkowych egzo-enzymów hydrolizujących nukleotydy i wydzielanych przez komórki HUVEC. Odwrotną zależność obserwujemy w przypadku enzymów katalizujących fosfotransfer, tj. kinazy adenylanowej (AK) i kinazy difosfonukleozydów (NDPK) – aktywność ekto-AK i ekto-NDPK są średnio 2-krotnie niższe od aktywności rozpuszczalnych form tych enzymów wydzielanych do środowiska zewnątrzkomórkowego.** Otrzymane wyniki pozwalają na wnioskowanie, że **dominującym kierunkiem metabolizmu nukleotydów na powierzchni komórek HUVEC i w ich lokalnym mikrośrodowisku jest, podobnie jak w przypadku osteoblastów, chondrocytów i komórek neuroprogenitorowych, hydroliza ATP i ADP.** Natomiast wydzielane pozakomórkowo formy egzo-AK i egzo-NDPK, odpowiedzialne za fosfotransfer i resyntezę ATP, mogą kontrolować poziom nukleotydów we krwi, a tym samym oddziaływać również na inne typy komórek [Wujak i wsp. 2016a].

Wyniki przedstawione w opisanych powyżej pracach, zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe, jednoznacznie wskazują na odmienny profil sygnalizacji purynergiczej w różnych typach komórek. Hydroliza ATP i ADP w macierzy zewnątrzkomórkowej, katalizowana przez prawidłowo funkcjonujące ekto-NTPDazy zróżnicowanych komórek, pełni rolę mechanizmu obronnego, chroniącego komórki dojrzałe przed działaniem cytotoksycznym nukleotydów. W przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych, mikromolowe stężenia ATP zwiększają ich tempo proliferacji i/lub zdolność do różnicowania, a tym samym ich potencjał regeneracyjny. Dlatego, biorąc pod uwagę złożoność

mikrośrodowiska i możliwą obecność mezenchymalnych komórek macierzystych, należy rozważyć celowość całkowitego usuwania ATP, co sugeruje się czasami jako potencjalny kierunek terapii chorób o etiologii nukleotydowej.

Podsumowanie

Różnice w odpowiedzi różnych typów komórek na sygnał nukleotydowy dotychczas tłumaczono niemal wyłącznie różnicami w ekspresji receptorów typu P. Receptory te są jednak powszechnie obecne na błonie komórkowej, zarówno komórek macierzystych jak i komórek wyspecjalizowanych [Zippel i wsp. 2012, Kaebisch i wsp. 2015, Cavaliere i wsp. 2015, Oliveira i wsp. 2016], a nieznaczne zmiany w poziomie ich ekspresji nie tłumaczą wystarczająco tak ogromnej różnorodności efektów fizjologicznych i patologicznych. Z badań prezentowanych w ramach zgłaszanego osiągnięcia naukowego wynika, że:

- 1/ **nadrzędną rolę w determinowaniu jakości sygnału nukleotydowego i odpowiedzi komórkowej pełnią ekto-enzymy zaangażowane w metabolizm nukleotydów, odmiennie ekspresjonowane w różnych typach komórek.** Co więcej, różnice w profilu ekspresji i aktywności ekto-enzymów korelują z tempem proliferacji czy wydajnością różnicowania komórek, a więc enzymy te mogą być brane pod uwagę jako markery potencjału biologicznego.
- 2/ **mezenchymalne komórki macierzyste cechuje odmienna wrażliwość na sygnał nukleotydowy, w szczególności na ATP.** W efekcie, na sygnały uszkodzenia komórek w lokalnym mikrośrodowisku, MSC reagują wzrostem tempa proliferacji i/lub zwiększeniem efektywności regeneracji tkanek oraz procesów naprawczych.
- 3/ **nie zawsze pożądane jest obniżanie stężenia i/lub całkowite usuwanie ATP ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Nukleotyd ten aktywuje potencjał biologiczny mezenchymalnych komórek macierzystych, zwiększając ich tempo proliferacji lub efektywność różnicowania, zależnie od warunków panujących lokalnie, w niszy komórek macierzystych. Z tego punktu widzenia konieczne jest utrzymanie i precyzyjne kontrolowanie równowagi nukleotydowej na zewnątrz komórki.**

Uzyskane przeze mnie wyniki i zaprezentowane wnioski mają fundamentalne znaczenie dla pełnego poznania elementów systemu sygnalizacji purynergiczej w komórkach ludzkich i zwierzęcych. Określenie profilu purynergicznego różnych typów komórek stanowi niewątpliwą wkład w badania podstawowe dotyczące sygnalizacji zewnątrzkomórkowej, ale także jest istotne dla

nowych rozwiązań metodycznych w hodowli komórek *in vitro*. Znajomość profilu sygnalizacji purynergicznej pozwala na dostosowaną do typu komórek, odpowiednio ukierunkowaną kontrolę ich potencjału biologicznego *in vitro* oraz jest pomocna w opracowywaniu terapii schorzeń, wynikających z nieprawidłowego poziomu ekto-ATP.

Perspektywy wykorzystania otrzymanych wyników

Badania dotyczące nukleotydów i nukleozydów purynowych oraz aktywności ekto-enzymów metabolizujących puryny na powierzchni komórek w hodowlach *in vitro* stanowią istotny wkład w kompleksową charakterystykę wszystkich elementów składających się na system sygnalizacji purynergicznej. Wydaje się, że rola ekto-enzymów była dotąd niedoceniana. A przecież to właśnie aktywność ekto-nukleotydaz i ekto-kinazy adenylanowej reguluje poziom zewnątrzkomórkowych nukleotydów i nukleozydów, determinując tym samym jakość, intensywność i czas trwania sygnału nukleotydowego, co pozwala na dostosowanie odpowiedzi fizjologicznej do lokalnych warunków mikrośrodowiska zewnątrzkomórkowego. W odniesieniu do mezenchymalnych komórek macierzystych, poznanie ich odmiennej wrażliwości na sygnał nukleotydowy przyczynia się do lepszego zrozumienia fizjologii tych komórek, sposobów kontroli ich potencjału biologicznego, efektywnego namnażania i różnicowania. Jest to szczególnie istotne w warunkach hodowli *in vitro* i znacząco poszerza możliwości aplikacyjnego (terapeutycznego) zastosowania MSC.

Enzymami, które biorą udział w regulacji stężenia ekto-nukleotydów są m.in. fosfohydrolaza di- i trifosfonukleozydów (NTPDaza1) oraz kinaza adenylanowa (AK). Wydaje się, że NTPDaza jest enzymem dobrze poznanym i scharakteryzowanym pod względem kinetycznym [Zimmermann i wsp. 2012, Baqi 2015], natomiast dokładna analiza właściwości kinetycznych ludzkiej izoformy AK1 została ostatnio wykonana w naszym laboratorium [Wujak i wsp. 2016b]. Na tej podstawie sądzimy, iż w aplikacjach *in vitro* wykorzystać można modulatory aktywności lub egzogenne ekto-enzymy metabolizujące nukleotydy, immobilizowane i dostarczane do komórek za pomocą nanostrukturalnych układów transportujących (wniosek pt. „NTPDaza immobilizowana na nanonośnikach do kontrolowanego usuwania ATP w środowisku zewnątrzkomórkowym - badania *in vitro*” złożony do NCN – konkurs Sonata Bis 6; wniosek w trakcie oceny merytorycznej). W dalszej perspektywie, prowadzone z moim udziałem badania zmierzają do opracowania systemów biokatalitycznych, wykorzystujących różne ekto-enzymy (NTPDaza, kinaza adenylanowa) immobilizowane na innowacyjnych materiałach nanostrukturalnych, wszechstronnego przetestowania ich przydatności do kontrolowania równowagi nukleotydowej na zewnątrz komórek w hodowlach *in vitro* oraz możliwości ich terapeutycznego wykorzystania, np. w schorzeniach i

procesach patologicznych wynikających z długotrwałego nieprawidłowego stężenia ekto-ATP (przewlekłe stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne itp).

Literatura

1. Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D et al. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* 2009; 284: 10120-10128.
2. Baqi Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2015; 15(1): 21-33.
3. Bayliss J, Delarosa S, Wu J, Peterson JR, Eboda ON, Su GL, Hemmila M, Krebsbach PH, Cederna PS, Wang SC, Xi C, Levi B. Adenosine triphosphate hydrolysis reduces neutrophil infiltration and necrosis in partial-thickness scald burns in mice. *J Burn Care Res* 2014; 35: 54-61.
4. Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; 2: 310-323.
5. Boccazzi M, Rolando C, Abbracchio MP, Buffo A, Ceruti S. Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: contribution of reactive astrocytes. *Glia* 2014; 62(3): 428-439.
6. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87(2): 659-797.
7. Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 3-8.
8. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 2014; 66: 102-192.
9. Burnstock G, Ulrich H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(8): 1369-1394.
10. Burnstock G, Verkhatsky A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 2010; 1: 1-10.
11. Cavaliere F, Donno C, D'Ambrosi N. Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 211.
12. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis* 2014; 5, e1102.
13. Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B et al. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1840-1849.
14. Czarnecka J, Porowińska D, Bajek A, Hołysz M, Roszek K. Neurogenic differentiation of mesenchymal stem cells induces alterations in extracellular nucleotides metabolism. *J Cell Biochem* 2016, doi 10.1002/jcb.25664.
15. Czarnecka J, Roszek K, Jabłoński A, Smoliński DJ, Komoszyński M. Some aspects of purinergic signaling in the ventricular system of porcine brain. *Acta Vet Scand* 2011; 53: 54.
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
17. Ferrari D, Gulinelli S, Salvestrini V, Lucchetti G, Zini R, Manfredini R et al. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to

- CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp Hematol* 2011; 39: 360-374.
18. Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 460654.
 19. Gese A, Roszek K. Metody wydajnej izolacji i hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. *Acta Haematol Polon* 2011, 42: 651-660.
 20. Glaser T, Cappellari AR, Pillat MM, Iser IC, Wink MR, Battastini AM, Ulrich H. Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal* 2012; 8: 523-537.
 21. Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 2008; 10: 320-330.
 22. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014; 509(7500): 310-317.
 23. Janeczek-Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 2012; 7(10): e46842.
 24. Kaebisch C, Schipper D, Babczyk P, Tobiasch E. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; 13: 75-84.
 25. Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 438-444.
 26. Kukulski F, Sevigny J, Komoszyński M. Comparative hydrolysis of extracellular adenosine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res* 2004; 1030, 49-56.
 27. Leung YM. P2X7 receptor as a double-edged sword: neurotrophic and neurotoxic effects. *Biomedicine* 2011; 1: 16-20.
 28. Li P, Cao J, Chen Y, Wang W, Yang J. Apyrase protects against allergic airway inflammation by decreasing the chemotactic migration of dendritic cells in mice. *Int J Mol Med* 2014; 34: 269-275.
 29. Łęcka J, Bloch-Bogusławska E, Molski S, Komoszyński M. Extracellular purine metabolism in blood vessels (Part II): Activity of ecto-enzymes in blood vessels of patients with abdominal aortic aneurysm. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; 16(6): 650-657.
 30. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization – a systematic review of the literature. *Open Orthop J* 2011; 5 (Suppl 2): 253-260.
 31. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(1): 9-16.
 32. Miras-Portugal MT, Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Diaz-Hernandez JI, Artalejo AR, Ortega F, Delicado EG, Perez-Sen R. Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 2016; 104: 243-254.
 33. Oliveira A, Illes P, Ulrich H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology* 2016; 104: 272-281.
 34. Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, Donahue HJ. ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2007; 22(4): 589-600.
 35. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2: 409-430.
 36. Roszek K, Błaszczak A, Wujak M, Komoszyński M. Ecto-enzymes involved in extracellular purine signaling as markers of mesenchymal stem cells differentiation into osteocytes. *Acta Biochim Polon* 2012; 59 (Suppl. 3): 138.
 37. Roszek K, Błaszczak A, Wujak M, Komoszyński M. Nucleotides metabolizing ectoenzymes as possible markers of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biochem Cell Biol* 2013a; 91(3): 176-181.

38. Roszek K, Bomastek K, Drożdżal M, Komoszyński M. Dramatic differences in activity of purines metabolizing ecto-enzymes between mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood and umbilical cord tissue. *Biochem Cell Biol* 2013b; 91(6): 519-525.
39. Roszek K, Czarnecka J. Is ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)-based therapy of central nervous system disorders possible? *Mini Rev Med Chem* 2015; 15: 5-20.
40. Roszek K, Komoszyński M. Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Post Hig Med Dośw* 2008; 62: 660-667.
41. Roszek K, Makowska N, Czarnecka J, Porowińska D, Dąbrowski M, Danielewska J, Nowak W. Canine adipose-derived stem cells: purinergic characterization and neurogenic potential for therapeutic applications. *J Cell Biochem* 2017; 118: 58-65.
42. Roszek K, Porowińska D, Bajek A, Hołysz M, Czarnecka J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells results in substantial changes of ecto-nucleotides metabolism. *J Cell Biochem* 2015; 116: 2915–2923.
43. Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2006; 78(6): 327-346.
44. Taran R, Mamidi MK, Singh G, Dutta S, Parhar IS, John JP, Bhonde R, Pal R, Das AK. *In vitro* and *in vivo* neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci* 2014; 39: 157-169.
45. Wujak M, Hetmann A, Porowińska D, Roszek K. Gene expression and activity profiling reveal a significant contribution of soluble phosphotransferases to the metabolism of extracellular nucleotides in HUVEC endothelial cells. *J Cell Biochem* 2016a; doi 10.1002/jcb.25791.
46. Wujak M, Roszek K, Komoszyński M. The insight into biochemical and biological properties of human AK1 acting as a prominent adenylate kinase isoenzyme in the cardiovascular system. *Biochemistry - after revision - 2016b*.
47. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(5): 673-694.
48. Zimmermann H. Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release. *Purinergic Signal* 2016; 12(1): 25-57.
49. Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 2012; 8: 437-502.
50. Zippel N, Limbach CA, Ratajski N, Urban C, Luparello C, Pansky A, Kassack MU, Tobiasch E. Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(6): 884-900.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Oprócz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 4. Autoreferatu, jestem również współautorką 13 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), 10 artykułów w czasopismach spoza bazy JCR oraz 1 rozdziału w opracowaniu zbiorowym. łączny IF wszystkich opublikowanych przeze mnie prac naukowych wynosi 42,73 (sumaryczny IF pięcioletni 48,60), a ilość punktów MNiSW wynosi 472. Pełny wykaz prac znajduje się w Załączniku nr 6 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Rozwój naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

W 1998 roku ukończyłam studia biologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu. Pracę magisterską pt. „Aktywność sulfohydrolityczna względem siarczanu cholesterolu w oczyszczonej frakcji lizosomalnej z łożyska ludzkiego” wykonałam w Zakładzie Biochemii pod kierownictwem prof. dr hab. Jadwigi Gniot-Szulżyckiej i obroniłam 29 czerwca 1998 roku. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazywały na obecność w lizosomach komórek łożyska ludzkiego enzymu (-ów) o aktywności sterolosulfohydrolitycznej względem siarczanu cholesterolu. Rezultaty te zaprezentowałam we wrześniu 1998 roku na XXXIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku w formie plakatu konferencyjnego, a kilka lat później, po uzupełnieniu, zostały opublikowane:

- Gniot-Szulżycka J, Wojczuk B, **Roszek K**. Cholesterol sulphate sulphohydrolase activity in lysosomal fraction from human placenta. *Acta UNC Biol.* 2001, 55: 91-103.

Od 1 października 1998 roku zostałam zatrudniona w Zakładzie Biochemii UMK jako asystent i kontynuowałam prace nad wyizolowaniem, oczyszczeniem i charakterystyką kinetyczną sterolosulfohydrolazy siarczanu cholesterolu (CHSazy). Enzym ten, dotychczas nie opisywany w literaturze, wyróżniał się spośród innych sulfohydrolaz wysoką specyficnością względem siarczanu cholesterolu oraz optimum pH przypadającym w środowisku kwaśnym (pH 3,4). Jako integralne białko błony lizosomu, CHSaza uczestniczyła w regulacji zawartości cholesterolu i jego estrów siarczanowych, a tym samym wpływała na płynność błon lizosomalnych i ich funkcje fizjologiczne, np. zdolność do fuzji. W tym czasie kształtowały się także moje zainteresowania biologią i fizjologią komórki, a w szczególności lizosomami i innymi strukturami pęcherzykowymi biorącymi udział w transporcie, segregacji cząsteczek, procesach autofagii itp. Znalazły one odzwierciedlenie w pracach przeglądowych:

- **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Wielorakie formy opłaszczonych klatryną pęcherzyków w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł. *Post Biol Kom* 2000; 27: 295-314.
- **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego. *Post Biol Kom* 2001; 28: 443-465.
- **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Budowa i funkcje białek błony lizosomalnej. *Kosmos* 2003; 52: 173-184.
- **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Lizosomalna błonowa glikoproteina lamp2a – receptor dla cytosolowych białek przeznaczonych do selektywnej proteolizy. *Post Bioch* 2005; 51: 90-96.

Uzyskane przeze mnie wyniki eksperymentalne zebrałam w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Sterolosulfohydrolaza siarczanu cholesterolu z lizosomów łożyska ludzkiego”, której promotorem była prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka, a recenzentami prof. dr hab. Alicja Drabikowska (Instytut

Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) oraz prof. dr hab. Alojzy Zgierski (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź). 24 marca 2006 roku otrzymałam tytuł doktora nauk biologicznych. Wyniki badań nad oczyszczaniem i charakterystyką kinetyczną sterolosulfohydrolazy siarczanu cholesterolu były prezentowane podczas krajowych konferencji i publikowane w materiałach zjazdowych, a finalnie zostały opublikowane już po obronie rozprawy doktorskiej w *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*:

- Gniot-Szulżycka J, Wojczuk B, Wieczorek B, **Roszek K**, Norkowska M. Heterogenne formy sulfohydrolazy siarczanu cholesterolu z frakcji subkomórkowych tkanki łożyska ludzkiego. XXXVII Zjazd PTBioch, Toruń 2001, P-06-07, s. 115.
- Goździkiewicz I, **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Aktywność sterolosulfohydrolaz w wysokooczyszczonej frakcji mitochondriów łożyska ludzkiego. XXXVIII Zjazd PTBioch, Wrocław 2002, X-P-04, s. 338.
- Gniot-Szulżycka J, **Roszek K**. Cholesterol sulphate sulphohydrolase of human placenta lysosomal membrane. *Acta Biochim Polon*, 2005; 52 (Suppl 1): 170-171.
- Gniot-Szulżycka J, **Roszek K**, Fret M. Effects of steroids and salicylic acid derivatives on the activity of cholesterol sulphate sulphohydrolase of lysosomal membrane. *Acta Biochim Polon*, 2006; 53 (Suppl. 1): 181.
- **Roszek K**, Gniot-Szulżycka J. Cholesterol sulphate sulphohydrolase of human placenta lysosomal membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008; 110: 48-55.

Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Po obronie pracy doktorskiej otrzymałam propozycję dołączenia do zespołu kierowanego przez prof. Michała Komoszyńskiego, który od wielu lat aktywnie pracował nad identyfikacją oraz analizą kinetyczną i funkcjonalną enzymów zaangażowanych w metabolizm nukleotydów. W 2007 roku odbyłam staż w Zakładzie Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum UMK, gdzie zapoznałam się m. in. z metodami pozyskiwania i hodowli komórek macierzystych. W tym samym roku rozpoczęłam współpracę z Oddziałem Ginekologiczno-Położniczym Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. L. Rydygiera w Toruniu w zakresie pozyskiwania krwi pępowinowej, z której następnie izolowałam mezenchymalne komórki macierzyste (MSC). Izolacja i hodowla *in vitro* ludzkich MSC wymagały długiej i żmudnej optymalizacji, która zakończyła się sukcesem i tym samym zapoczątkowała dynamiczny rozwój hodowli komórek w Zakładzie Biochemii oraz ich wykorzystanie jako modelu badawczego. Zainteresowanie komórkami macierzystymi, ich biologią, możliwościami regulacji proliferacji i różnicowania wraz z doświadczeniem Zespołu w analizie enzymów metabolizujących puryny, zaowocowało decyzją o podjęciu badań nad rolą sygnalizacji purynergiczej w fizjologii i patologii MSC, komórek indukowanych do różnicowania i dojrzałych. Podsumowanie ówczesnego stanu wiedzy dotyczącego komórek macierzystych zawarłam w trzech publikacjach przeglądowych oraz w rozdziale monografii:

- **Roszek K**, Komoszyński M. Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Post Hig Med Dośw* 2008; 62: 660-667.
- **Roszek K**, Czarnecka J, Komoszyński M. Ependyma i subependyma mózgu dorosłych ssaków źródłem neuralnych komórek macierzystych. *Post Biol Kom* 2011, 38: 379-393.
- Gese A, **Roszek K**. Metody wydajnej izolacji i hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. *Acta Haematol Polon* 2011, 42: 651-660.
- Kuźniewski R, Bajek A, Joachimiak R, **Roszek K**, Drewna T. Mezenchymalne komórki macierzyste oraz perspektywy ich zastosowania w terapii klinicznej wybranych schorzeń. W: *Nowoczesne metody analizy surowców rolniczych*. Pod red. G. Bartosz i Cz. Puchalski. UR Rzeszów, 2011, 473-482.

Szczegółowe badania dotyczące analizy wrażliwości na zewnątrzkomórkowe sygnały nukleotydowe i zdolności do ich modyfikacji mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) izolowanych z różnych źródeł, komórek indukowanych do różnicowania i dojrzałych weszły w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego i zostały opisane w punkcie 4c niniejszego załącznika.

Ważną częścią mojej aktywności naukowej było poznanie roli sygnalizacji purynergiczej, a szczególnie ekto-enzymów, w procesach patologicznych w organizmie ludzkim, co zaowocowało opublikowaniem serii prac przeglądowych:

- Cieślak M, **Roszek K**. Purinergic signaling in the pancreas and the therapeutic potential of ecto-nucleotidases in diabetes. *Acta Biochim Polon* 2014, 61(4): 655-662.
- Cieślak M, Czarnecka J, **Roszek K**, Komoszyński M. The role of purinergic signaling in the etiology of migraine and novel anti-migraine treatment. *Purinergic Signal* 2015; 11(3): 307-316.
- Cieślak M, Czarnecka J, **Roszek K**. The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders. *Acta Biochim Polon* 2016; 63: 1-9.

Innym realizowanym aspektem badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, nie wchodzącym w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego, jest udział MSC w neuroregeneracji i możliwości ich terapeutycznego wykorzystania w medycynie oraz w weterynarii. Badania nad neuroregeneracją i rolą nukleotydów w regulacji tego procesu prowadziłam we współpracy z Zakładem Biofizyki UMK oraz Przychodnią Weterynaryjną Max-Vet. Wyniki współpracy w zakresie izolacji i hodowli psich MSC z tkanki tłuszczowej, ich pogłębionej charakterystyki oraz optymalizacji metod różnicowania do różnych typów komórek dojrzałych przedstawiono w publikacji i w prezentacjach na konferencjach:

- **Roszek K**, Czarnecka J. Perspectives of mesenchymal stem cell-based neuroregeneration. *J Stem Cells Res, Rev & Rep* 2014, 1(3): 4
- Makowska N, Czarnecka J, Porowińska D, Hnatowska J, **Roszek K**. Kontrola potencjału proliferacyjnego psich mezenchymalnych komórek macierzystych. II. Pomorskie Sympozjum Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej, Bydgoszcz 2014.
- Dąbrowski M, **Roszek K**, Strzelecki J, Stankiewicz M, Nowak W. AFM monitoring of elasticity changes accompanying differentiation towards neural cells. 59th Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore 7-11 February 2015.

Odrębnym aspektem moich zainteresowań badawczych jest **poszukiwanie biomedycznych zastosowań dla nowoczesnych materiałów nanostrukturalnych**. Badania te, realizowane od 2013 roku we współpracy z prof. Arturem Terzykiem z Katedry Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy UMK w Toruniu, zespołem prof. Tomasza Drewy z Katedry Urologii CM UMK w Toruniu oraz prof. Samy L. Habib z Health Science Center, Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas, można podzielić na 3 nurty:

A/ analiza cytotoksyczności nanomateriałów

B/ wykorzystanie nanomateriałów jako nośniki leków

C/ zastosowanie nanomateriałów jako podłoża do immobilizacji enzymów

Ad. A/ Analiza cytotoksyczności nanomateriałów obejmuje badania zgodne z ISO 10993, tj. test MTT i NRU oraz poszerzone badania wpływu nanomateriałów na komórki zwierzęce i ludzkie, prawidłowe, nowotworowe i komórki macierzyste. Otrzymane wyniki pozwoliły m. in. na określenie możliwości „sterowania” toksycznością materiałów już na etapie ich syntezy lub późniejszej modyfikacji. Nadrzędnym celem tych badań jest wybranie spośród szerokiej palety syntetyzowanych nanomateriałów tych, które mogą być z powodzeniem stosowane jako nośniki leków, enzymów czy innych związków biologicznie czynnych. Wyniki opublikowano w kilku artykułach oraz prezentowano jako referaty na konferencjach krajowych i międzynarodowych:

- Bielicka A, Wiśniewski M, Terzyk AP, Gauden PA, Furmaniak S, **Roszek K**, Kowalczyk P, Bieniek A. Carbon materials as new nanovehicles in hot-melt drug deposition. *J Phys: Condens Matter*, 2013; 25: 355002.
- Werengowska-Ciećwierz K, Wiśniewski M, Terzyk AP, **Roszek K**, Czarnecka J, Bolibok P, Rychlicki G. Conscious changes of carbon nanotubes cytotoxicity by manipulation with selected nanofactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015; 176(3): 730-741.
- Czarnecka J, Gołembiewska E, **Roszek K**, Terzyk AP, Wiśniewski M. Looking for proper toxicity evaluation of carbon nanomaterials (submitted).
- Wiśniewski M, Werengowska-Ciećwierz K, **Roszek K**, Czarnecka J, Terzyk A. Toksyczność nanorurek węglowych – fakty i mity. II. Pomorskie Sympozjum Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej, Bydgoszcz 2014.
- Terzyk AP, Werengowska-Ciećwierz K, Wiśniewski M, **Roszek K**, Czarnecka J, Bolibok P. From surface heterogeneity to cytotoxicity. Ninth International Symposium ISSHAC: Effects of Surface Heterogeneity in Adsorption and Catalysis on Solids, Wrocław 2015.

Ad. B/ Wykorzystanie nanomateriałów jako nośniki leków, w tym leków przeciwnowotworowych, otwiera kolejne perspektywy zastosowania praktycznego nowatorskich materiałów. Projekt zatytułowany „Nowe związki MOF jako degradowalne nanokontenery inhibitorów kinaz

tyrozynowych w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej” uzyskał finansowanie w ramach grantu NCN (grant NCN nr 2015/17/B/ST5/01446), którego jestem współwykonawcą. Otrzymane wstępne wyniki zostały już opublikowane:

- Nowacki M, Wiśniewski M, Werengowska-Ciećwierz K, **Roszek K**, Czarnecka J, Łakomska I, Kloskowski T, Tyloch D, Dębski R, Pietkun K, Pokrywczynska M, Grzanka D, Czajkowski R, Drewa G, Jundziłł A, Aguin JK, Habib SL, Terzyk AP, Drewa T. Nanovehicles as a novel target strategy for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: A multidisciplinary study of peritoneal carcinomatosis. *Oncotarget* 2015; 6(26): 22776-22798.
- Wiśniewski M, **Roszek K**, Czarnecka J, Bolibok P. Węglowe kropki kwantowe jako potencjalne nośniki leków. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2016; 19(2): 277-288.

Ad. C/ Zastosowanie nanomateriałów jako podłoża do immobilizacji enzymów to kierunek badawczy umożliwiający połączenie dotychczasowych badań nad właściwościami różnych enzymów i wiedzy z zakresu enzymologii z możliwościami, jakie oferują nanomateriały.

Pierwszym enzymem szczegółowo przebadanym pod kątem właściwości kinetycznych, w ramach badań prowadzonych z moim udziałem, jest modelowa oksydoreduktaza – katalaza (EC 1.11.1.6). Enzym ten, immobilizowany na tlenku grafenu, cechuje wysoka wydajność immobilizacji, podwyższona aktywność i trwałość w stosunku do katalazy natywnej. Co ciekawe, właściwości kinetyczne enzymu zależą od stosunku białka do nanomateriału. Natomiast najnowsze badania potwierdzają przydatność tlenku grafenu jako podłoża do immobilizacji kinazy adenylanowej (EC 2.7.4.3):

- Bolibok P, Wiśniewski M, **Roszek K**, Terzyk AP. Conscious controlling of enzymatic activity by immobilization on graphene oxide. *The Science of Nature* (submitted).
- Bolibok P, Gembala J, Wujak M, **Roszek K**, Terzyk AP, Wiśniewski M. Immobilizacja enzymów na nanośnikach sposobem na ukierunkowaną modyfikację właściwości biokatalizatorów. *Przemysł Chemiczny* 2016; 95: 2254-2258.
- Hetmann A, Wujak M, Kowalska K, **Roszek K**, Czarnecka J, Wiśniewski M. Ocena przydatności tlenku grafenu jako podłoża do immobilizacji kinazy adenylanowej. *Interdyscyplinarna Konferencja „NanoBioMateriały – teoria i praktyka”, Toruń, 2016.*

Prowadzone z moim udziałem interdyscyplinarne badania nad nanomateriałami, ich właściwościami w odniesieniu do systemów biologicznych (komórki, tkanki) i możliwością praktycznego zastosowania, zwróciły uwagę na konieczność coraz szerzej zakrojonej współpracy między naukowcami z różnych dziedzin. Stąd pomysł na zorganizowanie interdyscyplinarnego spotkania, służącego przepływowi informacji i poglądów oraz poszukiwaniu nowych obszarów badawczych i nawiązywaniu współpracy między naukowcami pracującymi na styku chemii materiałów, biologii i biotechnologii oraz dyscyplin pokrewnych. W czerwcu 2016 roku zorganizowaliśmy pierwszą edycję Konferencji „NanoBioMateriały – teoria i praktyka”, która cieszyła

się dużym zainteresowaniem badaczy z różnych uczelni i ośrodków naukowych oraz będzie kontynuowana w kolejnych latach.

Plany badawcze

Ekto-enzymy metabolizujące nukleotydy, immobilizowane i dostarczane do komórek za pomocą systemów transportujących, można wykorzystać do regulacji stężenia ekto-nukleotydów w aplikacjach *in vitro*. Nowoczesne systemy biokatalityczne oparte są często o podłoża nanostrukturalne. Dlatego aktualnym kierunkiem naszych badań jest wykorzystanie nanomateriałów węglowych jako podłoża do immobilizacji cząsteczek aktywnych biologicznie, w tym enzymów. Najnowsze badania potwierdzają przydatność tlenku grafenu jako podłoża do immobilizacji kinazy adenylanowej, w kolejnym kroku zamierzam przetestować przydatność immobilizowanej kinazy adenylanowej do kontrolowania stężeń ekto-nukleotydów w modelu *in vitro*.

Celem prowadzonych z moim udziałem badań jest opracowanie systemów biokatalitycznych, wykorzystujących różne ekto-enzymy (NTPDaza, kinaza adenylanowa) immobilizowane na innowacyjnych materiałach nanostrukturalnych oraz wszechstronne przetestowanie ich przydatności do kontrolowania równowagi nukleotydowej na zewnątrz komórek w hodowlach *in vitro*.

Odrębnym zagadnieniem jest udział enzymów zaangażowanych w metabolizm nukleotydów w regulację potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych. Istnieją doniesienia o ekspresji 5'-nukleotyduazy w różnych typach komórek nowotworowych oraz o stymulującym działaniu enzymu i produkowanej przez niego adenozyliny na proliferację komórek glejaka, raka jajnika czy jelita grubego [Gao i wsp. 2014, Baqi 2015]. Ciekawym problemem jest wpływ ekto-NPP (pirofosfatazy/fosfodiesterazy ekto-nukleotydów) na progresję przerzutów nowotworowych w tkance kostnej. Wstępne badania dotyczące aktywności ekto-NPP1 w komórkach osteocarcinoma HTB-85 i poszukiwania selektywnych inhibitorów tego enzymu zostały opublikowane przez zespół prof. Jeana Sevigny z Immunology and Rheumatology Lab, Laval University, Québec, Canada. Wspólnie z dr Joanną Łęcką z wspomnianego zespołu badawczego złożyliśmy projekt grantowy pt. „Role of NPP1 in osteoclasts activation leading to bone cancer development” (NCN - konkurs Polonez 3), którego ewentualne finansowanie i realizacja pozwoli na wyjaśnienie mechanizmu udziału ekto-NPP1 w rozwoju nowotworów kości i możliwości terapeutycznego wykorzystania inhibitorów tego enzymu.

Katarzyna Roszek