

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Magdalena Narajczyk

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

Tytuł magistra biologii – Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Uniwersytet Gdański, czerwiec 2002 r.

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii - Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Uniwersytet Gdański, lipiec 2007 r.
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mechanizm jednokierunkowej i dwukierunkowej inicjacji replikacji DNA w rejonie *oriλ*”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2007-2009	asystent, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Biologii Molekularnej
2009-2010	adiunkt, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Biologii Molekularnej
2010- chwila obecna	adiunkt, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Laboratorium Mikroskopii Elektronowej
03.2011 – chwila obecna	kierownik Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

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

Użycie metod mikroskopii elektronowej w analizie biomarkerów lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz

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

[1] Malinova V., Węgrzyn G., **Narajczyk M.** (2011) The use of elevated doses of genistein-rich soy extract in the gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*, 5: 21-25 (IF 2011 = 3,577, MNiSW = 25)

[2] de Ruijter J., Valstar M.J., **Narajczyk M.**, Węgrzyn G., Kulik W., Ijlst L., Wagemans T., van der Wal W.M., Wijburg F.A. (2012) Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled cross-over trial. *Annals of Neurology*, 71:110-120 (IF 2011 = 11,089, MNiSW = 50)

[3] **Narajczyk M.**, Tylki-Szymańska A., Węgrzyn G. (2012) Changes in hair morphology as a biomarker in gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease. *Gene*, 504: 292-295 (IF 2011 = 2,341, MNiSW = 25)

[4] Kloska A., **Narajczyk M.**, Jakóbkiewicz-Banecka J., Gryniewicz G., Szeja W., Gabig-Cimińska M., Węgrzyn G. (2012) Synthetic genistein derivatives as modulators of glycosaminoglycan storage. *Journal of Translational Medicine*, 10: 153 (IF 2011 = 3,47, MNiSW = 35)

[5] **Narajczyk M.**, Moskot M., Konieczna A. (2012) Quantitative estimation of lysosomal storage in mucopolysaccharidoses by electron microscopy studies. *Acta Biochimica Polonica*, 59: 693-696 (IF 2011 = 1,491, MNiSW = 15)

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

Celem naukowym powyższych prac było oszacowanie skuteczności metod mikroskopii elektronowej w analizie biomarkerów w chorobach spichrzeniowych, zwłaszcza w mukopolisacharydozach. Lizosomalne choroby spichrzeniowe to grupa genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych. Mutacja jednego z genów kodujących kwaśną hydrolazę powoduje defekt genetyczny, który objawia się zahamowaniem rozkładu związków organicznych, a w rezultacie ich kumulacją w komórce, prowadzącą do jej dysfunkcji. Pomimo dużej różnorodności w obrębie tychże chorób, można wyróżnić cechy wspólne. Są nimi wielonarządowe zmiany patologiczne, postępujący i ciężki przebieg choroby, a także przedwczesna śmierć.

Mukopolisacharydozy (MPS) stanowią grupę lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Wrodzone defekty metabolizmu glikoaminoglikanów (GAG) powodują nagromadzenie się niezdegradowanych specyficznych związków organicznych. Glikoaminoglikany są związkami występującymi w wielu tkankach organizmu ssaczego. Obecne są w przestrzeni pozakomórkowej oraz w połączeniu z błonami komórkowymi, uczestniczą w rozwoju łożyska, biorą udział w szlakach sygnałowych komórki, ograniczając zdolność

wiązania się fibroblastowego czynnika wzrostu do receptorów. Większość GAG występuje w postaci peptydoglikanów, kowalencyjnie związanych z odpowiednim białkiem. Degradacja glikozoaminoglikanów odbywa się w lizosomach przy udziale kilkunastu enzymów. Zaburzenie rozkładu GAG, które spowodowane jest brakiem lub obniżeniem aktywności jednego z enzymów, skutkuje nagromadzeniem się tego związku w lizosomach jak i przestrzeni międzykomórkowej. Następstwem tego procesu są zaburzenia w strukturze i funkcjonowaniu komórki prowadzące do jej zniszczenia, a w konsekwencji do charakterystycznych objawów klinicznych obejmujących wszystkie układy i narządy organizmu.

Wyróżnia się jedenaście typów i podtypów mukopolisacharydoz, w zależności od brakującego enzymu w komórkach chorego. Ze względu na upośledzenie funkcji praktycznie wszystkich narządów i postępujący charakter choroby, średni czas życia wynosi kilkanaście lat. Ponadto w większości przypadków diagnoza stawiana jest dopiero w wieku kilku lat, gdyż mukopolisacharydozy ujawniają się klinicznie nieco później niż większość chorób o podłożu genetycznym.

W związku z rozwojem nauki i technologii możliwe stało się wprowadzenie enzymatycznej terapii zastępczej dla MPS typu I, typu II i VI. Leczenie to polega na dożylnym podawaniu pacjentowi rekombinowanego enzymu ludzkiego, który transportowany jest do wnętrza komórek i lokalizowany w lizosomach. Takie uzupełnienie braku lub niedoboru enzymu pozwala na degradację zakumulowanych glikozoaminoglikanów, a w rezultacie poprawę kliniczną pacjentów. Niestety ze względu na barierę krew-mózg terapia ta jest nieefektywna w mukopolisacharydozach z zajęтым centralnym układem nerwowym, między innymi dla MPS typu I (zespół Hurler) oraz typu III (zespół Sanfilippo). Potencjalnym sposobem leczenia tego typu schorzeń jest terapia oparta na redukcji syntezy substratu. Związkiem, który może zostać wykorzystany podczas takiej terapii jest genisteina (4',5,7-trihydroksy-3-fenylochromen-4-on) – związek z grupy izoflawonów. Genisteina może pośrednio regulować ekspresję genów działając jako inhibitor aktywności kinazy tyrozynowej receptora EGF. Wcześniej wykazano, że dodanie genisteiny do hodowli fibroblastów obniża efektywność produkcji GAG. Dodatkowo stwierdzono iż ten izoflawon pośrednio hamuje syntezę GAG dzięki blokowaniu fosforylacji EGFR, co powoduje obniżenie wydajności ekspresji genów kodujących niektóre enzymy szlaku biosyntezy GAG. Ponadto dodanie genisteiny do hodowli fibroblastów pobranych od osób chorych na MPS powodowało zanikanie nieprawidłowych struktur wewnątrzkomórkowych. Co więcej ten izoflawon może przekraczać barierę krew-mózg, a jego stosowanie jest bezpieczne dla organizmu. Ze względu na wysokie koszty

enzymatycznej terapii zastępczej oraz wciąż ograniczonego dostępu tejże terapii dla wszystkich typów mukopolisacharydoz niezwykle istotne jest poszukiwanie innych metod leczenia MPS. Należy przy tym stwierdzić, że ze względu na różnorodność objawów chorobowych oraz zróżnicowany przebieg danego typu MPS u różnych pacjentów, precyzyjne określenie skuteczności testowanej metody terapeutycznej jest w przypadku tych chorób niezwykle trudne. Z drugiej strony, oszacowanie skuteczności danej metody leczenia poprzez zastosowanie analizy odpowiednich biomarkerów jest bardzo ważne, szczególnie biorąc pod uwagę niewielką liczbę pacjentów mogących uczestniczyć w badaniach.

W związku z doniesieniami o pozytywnym działaniu genisteiny na organizm chorych na MPS, wraz z naukowcami z Holandii brałam udział w próbie klinicznej, badającej wpływ genisteiny na pacjentów z zespołem Sanfilippo (praca 2). Próba kliniczna z podwójnie ślełą próbą, kontrolą placebo oraz zamianą okresu podawania leku i placebo obejmowała 30 pacjentów, podzielonych na dwie 15 osobowe grupy, którym podawano doustnie przez okres 6 miesięcy zamiennie placebo albo genisteinę w stężeniu 10 mg/kg masy ciała/dzień. W trakcie trwania badania przeprowadziłam analizę struktury włosów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej w trzech odstępach czasowych: przed rozpoczęciem podawania genisteiny, po 6 miesiącach badania oraz po 13 miesiącach od rozpoczęcia testu (po 6 miesiącach badania następował miesięczny okres, w którym pacjenci nie otrzymywali ani genisteiny ani placebo). W trakcie przeprowadzania analizy mikroskopowej próby były zakodowane, co pozwoliło mi na zachowanie obiektywności w trakcie wykonywania pomiarów. Pomimo przebadania znacznej ilości włosów, analiza statystyczna nie wykazała znaczącej różnicy pomiędzy próbą kontrolną a poddawaną leczeniu genisteiną. Możliwe jest jednak, że czas przyjmowania genisteiny był zbyt krótki lub też dawka 10 mg/kg masy ciała/dzień była zbyt niska aby można było zaobserwować znaczące efekty terapeutyczne.

W trakcie trwania próby klinicznej w Holandii nawiązałam współpracę z dr Verą Malinową z Uniwersytetu Karola w Pradze (Republika Czeska). W ramach tej współpracy wykonywałam analizę pobranych od pacjentów z mukopolisacharydozą typu III (zespół Sanfilippo) włosów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (praca 1). Pacjenci dr V. Malinowej przyjmowali na początku genisteinę w stężeniu 5 mg/ kg masy ciała/ dzień, jednakże mając na uwadze informacje uzyskane w trakcie badania u

pacjentów z Holandii, podnieśliśmy stężenie genisteiny do 15 mg/ kg masy ciała/ dzień. Próby pobierane były w całkowitym okresie od 16 do 22 miesięcy (u różnych pacjentów) w czasowych odstępach od 3 do 6 miesięcy. Zaobserwowałam znaczącą poprawę morfologii włosów obserwowanych w mikroskopie elektronowym po podwyższeniu stężenia genisteiny. Jednocześnie należy zaznaczyć, że przebadana grupa to zaledwie 6 pacjentów i należałoby przeprowadzić próbę z większą liczbą pacjentów.

W związku z wyżej wymienionymi sugestiami wykonałam analizę mikroskopową włosów pobranych od 35 pacjentów, którzy przyjmowali genisteinę w stężeniu 5 oraz 15 mg/ kg masy ciała/ dzień przez okres 12 miesięcy (praca 3). Dzięki badaniom z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej wykazałam, że u 26 spośród 35 pacjentów nastąpiła poprawa morfologii włosów. U 8 pacjentów nie zauważyłam poprawy morfologii włosa, a jedynie u 1 pacjenta stan ten się pogorszył (zaobserwowałam pojawienie się niewielkich bruzd w strukturze włosa). Poprawa morfologii włosów nastąpiła u wszystkich pacjentów przyjmujących wyższe stężenie genisteiny. Badania te dowodzą o skuteczności zastosowania analizy mikroskopowej struktury włosów jako biomarkera w trakcie leczenia pacjentów z mukopolisacharydozą typu III. Podkreślić należy fakt iż jest to metoda całkowicie nieinwazyjna.

Niezwykle zainteresowała mnie możliwość połączenia dwóch możliwości leczenia mukopolisacharydoz, a mianowicie enzymatycznej terapii zastępczej oraz terapii redukcji substratu. Połączenie obu tych terapii umożliwiłoby zmniejszenie kosztów leczenia pacjentów, a także z racji właściwości genisteiny, zmniejszenie neurodegeneracji. Ze względu na wczesny etap doświadczeń, zdecydowałam się przeprowadzić analizę mikroskopową z wykorzystaniem linii komórkowych wyhodowanych z fibroblastów pobranych od pacjentów z mukopolisacharydozą typu I (praca 5). Do moich badań zastosowałam linię komórkową pacjenta z MPS I z uwagi na dostępność i stosowanie w tej chorobie enzymatycznej terapii zastępczej - enzymu α -L-iduronidazy. Założyłam obniżenie stężenia enzymu do 50% (w stosunku do aktualnie stosowanej dawki w terapii) oraz dodanie genisteiny w stężeniu 30 μ M. Jako kontrolę zastosowałam hodowane jedynie w pożywce (DMEM) fibroblasty ludzkie (HDFa) oraz komórki MPS I. Dzięki technikom transmisyjnej mikroskopii elektronowej, w komórkach poddanych łączonemu działaniu genisteiny i enzymu zaobserwowałam prawie czterokrotnie mniejsze ilości glikozoaminoglikanów w stosunku do kontrolnych komórek MPS

typu I, oraz jedynie dwukrotnie większe ilości GAG w stosunku do komórek MPS typu I traktowanych stężeniem enzymu odpowiadającymi aktualnie stosowanej w terapii dawce. Eksperymenty te wykazały, że zastosowanie obu terapii jednocześnie wydaje się być kolejnym krokiem w możliwościach leczenia MPS. Ponadto doświadczenia mikroskopii elektronowej dowodzą słuszności stosowania tych metod na równi z badaniami biochemicznymi w oszacowaniu zmian w komórce pacjenta.

Z uwagi na możliwości terapeutyczne genisteiny zaciekała mnie ewentualność zastosowania syntetycznych pochodnych tego izoflawonu (praca 4). Przeprowadziłam analizę mikroskopową komórek pobranych od pacjentów z MPS typu III, podtyp A oraz B, traktowanych siedmioma pochodnymi. W ultrastrukturze komórek zauważyłam znaczące obniżenie ilości glikoaminoglikanów w stosunku do zastosowanej kontroli. Badanie mikroskopowe pokazało zmiany w morfologii komórek, obniżenie ilości pojedynczych lamellarnych struktur lizosomalnych, jak również wielu struktur otoczonych wspólną błoną. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne różnice w przypadku większości użytych pochodnych. Doświadczenia te pokazują możliwości zamiany genisteiny na inny syntetyczny izoflawon.

Podsumowując, moje osiągnięcie naukowe, przedstawione w postępowaniu habilitacyjnym, polega w głównej mierze na stwierdzeniu, że:

- analiza włosów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej może być wykorzystywana jako nieinwazyjna metoda monitorowania skuteczności terapii w leczeniu MPS;
- analiza ultrastruktury komórek z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej może być stosowana jako biomarker na równi z badaniami biochemicznymi w przypadku MPS;
- obniżenie ilości GAG w komórkach traktowanych enzymem oraz genisteiną sugeruje możliwość połączenia obu terapii w leczeniu MPS;
- obniżenie ilości GAG w komórkach traktowanych syntetycznymi pochodnymi genisteiny umożliwia ich dalsze zastosowanie w leczeniu MPS.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Studia magisterskie rozpoczęłam w Instytucie Biologii na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego w 1997 roku.

Badania stanowiące moją pracę magisterską wykonywałam w Katedrze Biologii Molekularnej pod kierunkiem dr Sylwii Barańskiej i prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Wówczas to zainteresowałam się replikacją DNA, a zwłaszcza kierunkowością tego procesu. Do moich badań wykorzystałam naturalny plazmid pIGRK-1 wyizolowany z klinicznego szczepu *Klebsiella pneumoniae*. Eksperymenty umożliwiające poznanie kierunku replikacji DNA, które zastosowałam to dwukierunkowa elektroforeza agarozowa DNA oraz techniki mikroskopii elektronowej. Dzięki tym badaniom wyznaczyłam drugie miejsce startu replikacji DNA (tzw. miejsce *origin*) plazmidu pIGRK-1 oraz określiłam kierunek ruchu widełek replikacyjnych. Wyniki tych badań stanowiły podstawę mojej pracy magisterskiej, którą obroniłam w czerwcu 2002 roku.

Po ukończeniu studiów, w latach 2002-2007 byłam słuchaczem Środowiskowego Studium Doktoranckiego z Biologii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Nadal kontynuowałam prace związane z replikacją DNA oraz jej kierunkowością. Powszechnie uznawany model przejścia od replikacji θ do replikacji σ zakłada, że replikacja σ jest poprzedzona jedną rundą jednokierunkowej replikacji θ zainicjowanej w *ori λ* . Dlatego też moje zainteresowania skupiły się na czynnikach, które mogły potencjalnie uczestniczyć w regulacji zmiany typu replikacji DNA podczas rozwoju litycznego bakteriofaga λ . Efektem tych badań były prace z punktu IIA-1,2 (załącznik 3).

Dzięki metodom dwukierunkowej elektroforezy agarozowej DNA oraz przesunięcia gęstościowego wykazałam, że proteaza ClpPX nie ma wpływu na zmianę modelu replikacji, jak było wcześniej zakładane przez zespół prof. Macieja Żylicza. Wyniki te potwierdziłam również wykorzystując techniki mikroskopii elektronowej (praca IIA-1).

Pokazałam także, że bakteryjne białko SeqA ma wpływ na zmianę modelu replikacji (praca IIA-2). Ponadto wykazałam, że białko to bierze udział w regulacji replikacji DNA plazmidów pochodzących od faga λ poprzez kontrolę stabilności dziedzicznego kompleksu replikacyjnego. Badania te wykonywałam używając szczepów $\Delta relA$ i prowadząc hodowlę w warunkach głodu aminokwasowego. Dzięki eksperymentom określającym stabilność białka λO wykazałam również, że białko SeqA ma wpływ na formowanie w komórkach *E. coli* stabilnego kompleksu replikacyjnego faga λ .

Powyższe wyniki weszły w skład mojej pracy doktorskiej, którą wykonywałam pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Pracę pt. „Mechanizm jednokierunkowej i dwukierunkowej inicjacji replikacji DNA w rejonie *ori λ* ” obroniłam w lipcu 2007 roku. Ze względu na moje zainteresowania i znajomości technik mikroskopii elektronowej w maju 2007 roku zostałam zatrudniona w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego.

Po obronie pracy doktorskiej moje zainteresowania naukowe skupiły się wokół lizosomalnych chorób spichrzeniowych, a zwłaszcza mukopolisacharydoz (MPS). Oprócz prac wymienionych w pierwszej części autoreferatu zajęłam się również analizą ultrastruktury komórek fibroblastów pobranych od pacjentów z MPS typu III traktowanych flawonoidami (genisteiną, daidzeiną, kempferolem i innymi) (prace IIA-3,7). Dzięki badaniom mikroskopii elektronowej zobrazowałam i potwierdziłam wyniki otrzymane w trakcie badań biochemicznych. Zaobserwowałam znaczący spadek ilości glikozoaminoglikanów (GAG) w komórkach traktowanych genisteiną w stosunku do doświadczeń kontrolnych. Ponadto analiza mikroskopowa potwierdziła, że genisteina hamuje syntezę GAG dzięki blokowaniu fosforylacji EGFR (praca IIA-3). Dane te stanowiły podstawę do moich dalszych badań z wykorzystaniem genisteiny jako potencjalnego leku w MPS.

W kolejnych badaniach przeprowadziłam analizę mikroskopową komórek traktowanych innymi flawonoidami: naringeniną, daidzeiną, kempferolem, apigeniną (praca IIA-7). W ultrastrukturze badanych komórek zaobserwowałam znaczące zmiany morfologiczne, zwłaszcza w przypadku komórek traktowanych daidzeiną i kempferolem. Doświadczenia te mogą zostać wykorzystane do dalszych eksperymentów, a badane flawonoidy stanowić kolejny czynnik leczniczy w terapii redukcji substratu.

Analogiczne doświadczenia przeprowadziłam podczas badań, których wyniki zostały opublikowane w pracy z punktu IIA-10, gdzie analizowałam komórki MPS typu I oraz typu III, które były inkubowane jednocześnie z dwoma specyficznymi siRNA w celu inhibicji ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę glikozoaminoglikanów. Zastosowanie takiej procedury było zaproponowane jako jedna z potencjalnych możliwości terapeutycznych. Jednakże chociaż badanie mikroskopowe wykazało zmniejszenie ilości glikozoaminoglikanów w komórkach, nie były to zmiany statystycznie istotne.

Brałam także udział we współredagowaniu prac dotyczących potencjalnych możliwości leczenia MPS w oparciu o terapię redukcji substratu z wykorzystaniem genisteiny (prace IIA-5,6,8). Dodatkowo wciąż zajmuję się badaniem morfologii bakteriofagów izolowanych z różnych środowisk. Analiza budowy badanych bakteriofagów została przedstawiona w pracach IIA-4,9.

Ze względu na znajomość licznych technik mikroskopii elektronowej zarówno transmisyjnej jak i skaningowej dwa lata temu została mi powierzona funkcja kierownika Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, samodzielnej jednostki Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. W najbliższej przyszłości zamierzam zbadać wpływ łączonej terapii enzymatycznej oraz redukcji substratu na kumulację

glikoaminoglikanów w komórkach pobranych od pacjentów z MPS typu VI z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Planuję również kontynuować badania analizy morfologii włosów pozyskanych od pacjentów przyjmujących genisteinę.

Magdalena Narajczyk
19-02-2013