

**Katholieke Universiteit Leuven**

## **Autoreferat**

**Joanna Kałucka**

Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism,  
Center for Cancer Biology (CCB),  
Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB),  
Department of Oncology and Leuven Cancer Institute (LKI)  
KU Leuven, Leuven, Belgium



Leuven 2019

## 1. DANE OSOBOWE

### Imię i nazwisko:

Joanna Kałucka

### Aktualne miejsce pracy:

Laboratory of Angiogenesis & Vascular Metabolism

VIB Center for Cancer Biology (CCB)

Flanders Institute for Biotechnology (VIB),

Catholic University of Leuven (KU Leuven)

Department of Oncology

Campus Gasthuisberg, O&N4

Herestraat 49-B912

B-3000, Leuven, Belgia

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

**2006** – tytuł magistra inżyniera biotechnologii. Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu;

**Tytuł pracy magisterskiej:** „Characterization of the in vivo biological function of VEGF-A/VEGFRs signaling in hematopoietic lineage commitment”

**Promotorzy:** Prof. dr hab. Ryszard Słomski (Uniwersytet przyrodniczy w Poznaniu)  
dr Jody Jonathan Haigh (Uniwersytet w Ghent)

**2010** – stopień doktora nauk medycznych; *doctor rerum medicinalium (Dr.rer.med.)* w dziedzinie biologii molekularnej.

Dresden International Graduate School for Biomedicine and Bioengineering;

Wydział Medycyny, Techniczny Uniwersytet w Dreźnie, Niemcy

**Tytuł pracy doktorskiej:** „Relevance of Prolyl HIF Hydroxylase 2 (PHD2) during embryo development and wound healing in mice” (magna cum laude),

**Promotorzy:** Prof. dr Georg Breier, Prof. dr Ben Wielockx

## 3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

**09/2006 – 08/2011;** Doktorant w ramach Międzynarodowej Szkoły Doktorskiej w zakresie Biomedycyny i Bioinżynierii (*International Graduate School for Biomedicine and Bioengineering*); Medizinische Fakultät, Technische Universität Dresden, Drezno, Niemcy

**09/2011 – 10/2014;** Staż podoktorski na Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Department of Nephrology Erlangen, Erlangen, Niemcy

**2014 – obecnie;** Staż podoktorski w Center for Cancer Biology (CCB), Flanders Institute for Biotechnology (VIB) / Catholic University of Leuven (KU Leuven), Leuven, Belgia

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w zw. z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669):

#### 4.A. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

### „MOLEKULARNE I METABOLICZNE PRZYSTOSOWANIA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA DO UTRZYMANIA HOMEOSTAZY”

PONIŻEJ PRZEDSTAWIONY JEST CYKL PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE:

#### 4.B. AUTOR/AUTORZY, TYTUŁ/TYTUŁY PUBLIKACJI, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA, RECENZENCI WYDAWNICZY

**4b.1.** Kalucka J\*, Schley G\*, Georgescu A, Klanke B, Rossler S, Baumgartl J, Velden J, Amann K, Willam C, Johnson RS, Eckardt KU, Weidemann A. Kidney injury is independent of endothelial HIF-1 $\alpha$ .

J Mol Med (Berl). (2015) Aug;93(8):891-904 (równorzędni współautorzy)

IF<sub>2015</sub>: 4,855; punkty z Listy MNiSW = 35, liczba cytowań = 6

**Mój wkład w powstanie publikacji polegał na:** *opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu danych i manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

**4b.2.** Kalucka J\*, Missiaen R\*, Georgiadou M, Schoors S, Lange C, De Bock K, Dewerchin M, Carmeliet P. Metabolic control of the cell cycle. Cell Cycle. (2015); 14(21):3379-88 (równorzędni współautorzy)

IF<sub>2015</sub>: 3,952; punkty z Listy MNiSW = 30, liczba cytowań = 8

**Mój wkład w powstanie publikacji polegał na:** *opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu danych i manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

**4b.3.** Harjes U, Kalucka J, Carmeliet P.

Targeting fatty acid metabolism in cancer and endothelial cells.

Crit Rev Oncol Hematol. (2016) Jan; 97:15-21 (praca przeglądowa)

IF<sub>2016</sub>: 4,971; punkty z Listy MNiSW = 35, liczba cytowań = 18

**Mój wkład w powstanie publikacji polegał na:** *opracowaniu koncepcji manuskryptu, doborze i opracowaniu literatury, przygotowaniem rysunków do publikacji, redagowaniu pracy zgodnie z wymogami publikacyjnymi. Mój udział procentowy stanowi 45%.*

**4b.4.** Kalucka J<sup>&</sup>, Bierhansl L, Wielockx B, Carmeliet P, Eelen G<sup>&</sup>.

Interaction of endothelial cells with macrophages – linking molecular and metabolic signaling. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. (2017) Apr;469(3-4):473-483

<sup>&</sup>autorzy korespondencyjni (praca przeglądowa)

IF<sub>2017</sub>: 2,765; punkty z Listy MNI<sub>SW</sub>=35, liczba cytowań = 6

**Mój wkład w powstanie publikacji polegał na:** *opracowaniu koncepcji manuskryptu, doborze i opracowaniu literatury, przygotowaniu rysunków do publikacji, redagowaniu pracy zgodnie z wymogami publikacyjnymi. Mój udział procentowy stanowi 65%.*

**4b.5** Kalucka J\*, Bierhansl L\*, Conchinha NV\*, Missiaen R\*, Elia I, Brüning U, Scheinok S, Treps L, Cantelmo AR, Dubois C, de Zeeuw P, Goveia J, Zecchin A, Taverna F, Morales-Rodriguez F, Brajic A, Conradi LC, Schoors S, Harjes U, Vriens K, Pilz GA, Chen R, Cubbon R, Thienpont B, Cruys B, Wong BW, Ghesqui.re B, Dewerchin M, De Bock K, Sagaert X, Jessberger S, Jones EAV, Gallez B, Lambrechts D, Mazzone M, Eelen G, Li X, Fendt SM, Carmeliet P. Quiescent endothelial cells upregulate fatty acid  $\beta$ -oxidation for vasculoprotection via redox homeostasis. *Cell Metabolism*. (2018) Dec 4;28(6):881-894.e13. (IF<sub>2017</sub>=20,565; punkty z Listy MNI<sub>SW</sub>=50; liczba cytowań = 3) (równorzędni współautorzy)

**Mój wkład w powstanie publikacji polegał na:** *opracowaniu koncepcji badań, kierowaniem zespołem badawczym, zaplanowaniu i wykonaniu badań, interpretacji wyników oraz przygotowaniu danych i manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 35%.*

Oświadczenia wszystkich współautorów prac, określające ich indywidualny wkład w powstawanie poszczególnych publikacji znajdują się w [Załączniku 6](#).

**Podsumowanie:**

Suma punktów za publikacje tworzące osiągnięcie naukowe:

(i) sumaryczny współczynnik oddziaływania (*ang.* impact factor) prac składających się na osiągnięcie naukowe: **37,108**

(ii) punkty według komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 9 grudnia 2016 roku: **185**

(iii) liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **41**

**4.C. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO****STRESZCZENIE ISTOTY BADAŃ**

Układ naczyniowy to zamknięta sieć składająca się z tętnic, żył i wzajemnie połączonych naczyń włosowatych tworzących rozgałęzione struktury. Naczynia krwionośne zapewniają dostarczanie składników odżywczych i tlenu do wszystkich tkanek dzięki ich transportowi poprzez śródbłonek. Śródbłonek zbudowany jest z komórek śródbłonka (*ang. endothelial cells, ECs*), które tworzą warstwę wyścielającą światło naczyń krwionośnych stanowiąc selektywną barierę pomiędzy krążącą krwią, a otaczającymi tkankami. Komórki śródbłonka w funkcjonujących naczyniach krwionośnych są w stanie spoczynku (uśpienia, *ang. quiescence*) i rzadko się dzielą. Natomiast do inicjacji ich podziału może dojść np.: w stanach patologicznych takich jak: choroba

niedokrwienność, stany zapalne lub nowotwory złośliwe. Powstałe komórki mogą migrować tworząc nowe sieci naczyń w procesie zwanym angiogenezą. Komórki zainicjowane do podziału nazywane są komórkami kiełkującymi (*ang. sprouting cells*).

Zagrażające życiu komplikacje sercowo-naczyniowe wynikają z dysfunkcji komórek śródbłonna. Ponadto, patologiczna angiogeneza, np. podczas rozwoju nowotworu zapewnia stałe dostarczanie składników odżywczych i tlenu do komórek nowotworowych, co z kolei pozwala na ich dalszy wzrost. Prawie wszystkie opracowane leki przeciwiangiogeniczne do stosowania klinicznego nakierowane są na blokowanie czynnika proangiogenicznego VEGF (*ang. Vascular endothelial growth factor, VEGF*) odpowiedzialnego za stymulację angiogenezy. Jednakże niewystarczająca skuteczność tych leków, oporność i toksyczność ograniczają powodzenie terapii przeciwiangiogenicznych. Z tego względu istnieje coraz większa potrzeba poszerzenia naszej wiedzy na temat biologii komórek śródbłonna, koniecznej do znalezienia lepszych metod pozwalających na ukierunkowanie terapii na śródbłonek.

Monograficzny cykl prac zatytułowany „Molekularne i metaboliczne przystosowania komórek śródbłonna do utrzymania homeostazy” stanowi podsumowanie moich badań nad rolą dwóch ważnych szlaków sygnałowych (czynniki indukowane hipoksją (HIF) i Notch) w regulacji homeostazy śródbłonna. Ponadto, wniosłam wkład do niedawnych odkryć, które wykazały występowanie zmian metabolicznych równocześnie ze zmianami w procesie angiogenezy. Podczas gdy większość badań skupia się na identyfikowaniu czynników odpowiedzialnych za włączenie procesu angiogenezy oraz tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, ja postanowiłam badać komórki śródbłonna w stanie spoczynku w celu uzyskania cennych informacji odpowiedzialnych za ich adaptację w tych warunkach.

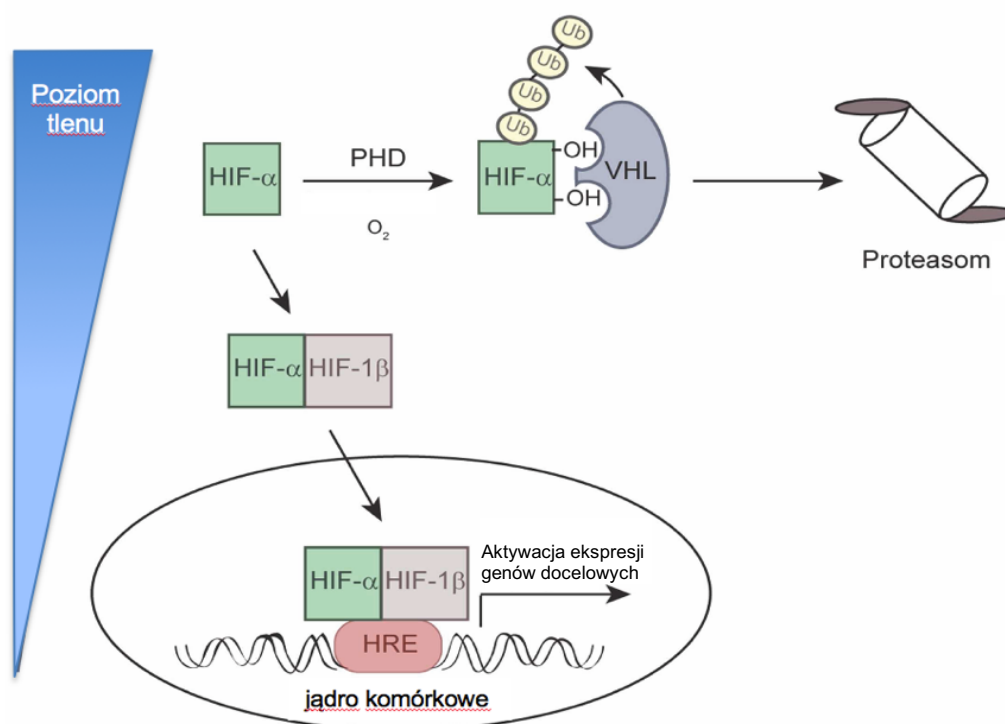
## WSTĘP

Naczynia krwionośne, które zapewniają dostarczanie składników odżywczych i tlenu do wszystkich komórek są zbudowane z komórek śródbłonna. Komórki te wyściełają światło naczyń krwionośnych i tworzą selektywną barierę pomiędzy krwiobiegami i otaczającymi tkankami oraz regulują dynamiczny pasaż składników odżywczych i komórek. Komórki śródbłonna wykazują specyficzne dla konkretnych narządów molekularne i funkcjonalne właściwości, które zapewniają niezbędną heterogeniczność w układzie naczyń (Aird, 2007a, b). Dodatkowo wykazują one wysoką plastyczność, np.: w zdrowym organizmie komórki śródbłonna w funkcjonujących naczyniach krwionośnych są w stanie spoczynku (uśpienia) i rzadko się dzielą, ale przy stymulacji czynnikami wzrostu (*ang. growth factors*), zaczynają dzielić się i mogą migrować tworząc nowe sieci naczyń, w ściśle kontrolowanym procesie zwanym angiogenezą. Angiogeneza przedłuża wcześniej istniejące naczynia krwionośne, aby poprawić dostarczanie tlenu i składników odżywczych do niedotlenionych tkanek.

### (i) Niedotlenienie, czynniki indukowane hipoksją (HIF) i tlen

Poziom tlenu w naszym organizmie nie jest stały, ale zmienia się dynamicznie. Istnieją różne mechanizmy wykrywania jego poziomu, które pozwalają organizmowi na utrzymanie odpowiednich ilości tlenu dostarczanych do tkanek oraz na wykrywanie i adaptację do zmian w jego dostępności. Ponadto, naczynia krwionośne są znane z tego, że w unikatowy sposób

reagują na spadek poziomu tlenu. Niedotlenienie tkanek jest wykrywane dzięki czynnikom indukowanym hipoksją  $\alpha$  (ang. *hypoxia inducible factors*, *HIF $\alpha$* ) i swoistym hydroksylazom prolinowym HIF (ang. *HIF prolyl-hydroxylase*, *PHDs*) regulującym aktywność HIF $\alpha$ . Aby zachować swoją aktywność enzymatyczną, PHD wymagają obecności tlenu, żeby przeprowadzić reakcję hydroksylacji prolin w HIF $\alpha$ . W konsekwencji, potranslacyjne zmiany w HIF $\alpha$  prowadzą do jego ubikwitacji i degradacji proteasomalnej przy udziale czynnika von Hippel–Lindau (VHL) (Fong and Takeda, 2008). Podczas niedotlenienia PHD tracą swoją zdolność hydroksylacji HIF (ze względu na swoją enzymatyczną zależność od tlenu). Utrata mechanizmu degradacji HIF $\alpha$  uruchamia kaskadę ekspresji kolejnych genów, których produkty biorą udział w m.in.: **indukcji angiogenezy, regulacji metabolizmu komórkowego, oraz wzrostu komórek** (Semenza, 2003) (**Rysunek 1**). Podjednostki HIF $\alpha$  (HIF1-3 $\alpha$ ) należą do rodziny podstawowych czynników transkrypcyjnych o strukturze helisa–pętla–helisa/PAS. HIF działa transkrypcyjnie jako heterodimer, składający się z podjednostek HIF $\alpha$  i HIF $\beta$ , które wiążą się z elementem/elementami odpowiedzi na niedotlenienie (HRE, ang. *hypoxia responsive element(s)*) występującym w promoterze genów licznych białek (Wang et al, 1995). W większości typów komórek, HIF-1 $\alpha$  jest stabilizowany przy ostrym niedotlenieniu.



**Rysunek 1. Uproszczony schemat przedstawiający regulację sygnalizacji HIF.** Czynniki indukujące niedotlenienie (HIF) są czynnikami transkrypcyjnymi złożonymi z podjednostek  $\alpha$  (np.: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  lub HIF-3 $\alpha$ ) i podjednostki konstytutywnej HIF-1 $\beta$ . Aktywność HIF- $\alpha$  jest bezpośrednio związana z poziomem tlenu. W warunkach normoksji, proces degradacji HIF- $\alpha$  jest inicjowany przez hydroksylację prolin w HIF- $\alpha$  przez enzymy PHD (ang. *HIF prolyl-hydroxylase*). Zmiany potranslacyjne HIF- $\alpha$  prowadzą do jego ubikwitacji i degradacji proteasomalnej przy udziale czynnika von Hippel-Lindau (VHL). W warunkach niedotlenienia następuje aktywacja HIF- $\alpha$  poprzez zatrzymanie jego hydrolizy. HIF- $\alpha$  jest translokowany do jądra komórkowego, gdzie poprzez interakcję z HIF- $\beta$ , wiąże się do DNA i aktywuje transkrypcję genów, których białka zaangażowane są w rozwój i funkcjonowanie układu naczyniowego, między innymi stymulatory procesu angiogenezy. Rysunek jest zaadaptowany z Schonenberger and Kovacs, 2015.

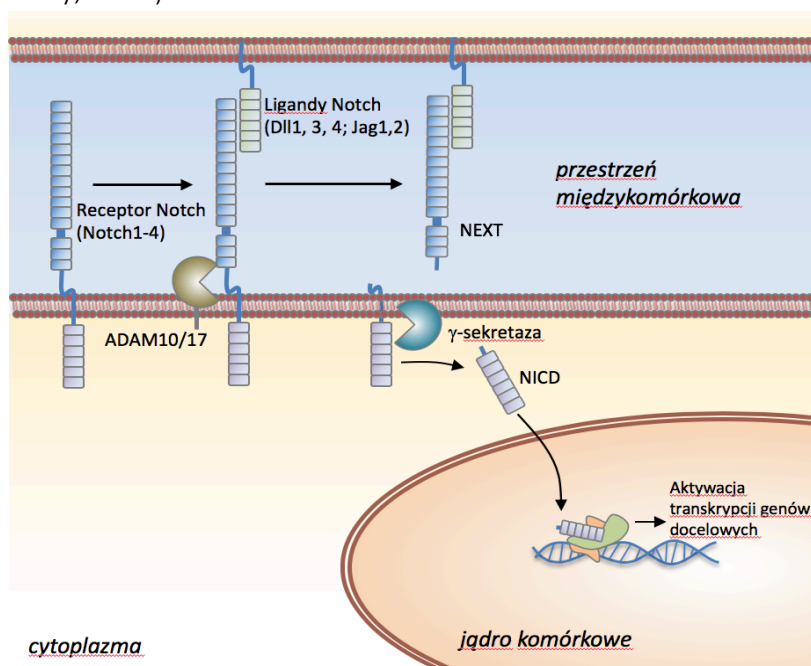
Ekspresja i poziom HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$  są bardziej swoiste i zróżnicowane w komórkach różnych tkanek. W niedotlenionych tkankach HIF-1 $\alpha$  aktywują transkrypcję genów, których białka zaangażowane są w rozwój i funkcjonowanie układu naczyniowego, między innymi stymulatory procesu angiogenezy, np. VEGF (Schonenberger and Kovacs, 2015; Semenza, 2003). Dodatkowo HIF reguluje ekspresję genów, których produkty biorą udział w metabolizmie energetycznym komórki i np.: powodują uruchomienie procesu glikolizy jako głównego mechanizmu pozyskiwania energii.

## (ii) Szlak sygnałowy Notch

Angiogeneza jest ściśle regulowanym procesem kierowanym przez różne szlaki sygnałowe, które kontrolują specyficzność komórek śródbłonna, np. szlak sygnałowy Notch. Sygnalizacja Notch odgrywa ważną rolę podczas wielu etapów rozwoju naczyń krwionośnych co wykazały różne badania z użyciem myszy z wyciszeniem genów (knockout) kilku receptorów i ligandów Notch. W komórkach śródbłonna są ekspresowane dwa receptory Notch (Notch 1 i 4) oraz cztery ligandy (Dll1, Dll4, Jag1 i Jag2) (Gridley, 2010). Kanoniczny szlak sygnałowy Notch jest oparty na międzykomórkowej interakcji pomiędzy jednym z ligandów Notch i jednym z receptorów Notch. Ta interakcja wywołuje serie zmian konformacyjnych w receptorze, powodujących dysocjację domeny pozakomórkowej receptora (w której pośredniczy cięcie dokonane przez  $\gamma$ -sekretazę) oraz uwalnianie domeny wewnątrzkomórkowej Notch (*ang. Notch intracellular domain, NICD*) (Gridley, 2010).

Następnie NICD ulega translokacji do jądra komórkowego i bezpośrednio współdziała z czynnikiem transkrypcyjnym CSL/RBP-J (CFB-1 u człowieka, *suppressor of hairless* u *D. melanogaster*, Lag u *C. elegans*, RBP-j u myszy) indukując transkrypcję genów białek docelowych Notch (np. *Hairy/enhancer of split* (HES) oraz białek związanych z HES) (Rysunek 2). Na poziomie komórkowym kaskada sygnałowa Notch oraz szlak VEGF odgrywają kluczową rolę w regulacji

wczesnego embrionalnego rozwoju naczyń. Hamowanie szlaku sygnałowego Notch powoduje zwiększoną proliferację komórek śródbłonna (Gridley, 2010).



**Rysunek 2. Uproszczony schemat przekazu sygnału przez receptor Notch.** W wyniku związania liganda, receptor Notch jest usuwany z powierzchni komórek przez proteinazę z rodziny ADAM. W konsekwencji dochodzi do kolejnego trawienia receptora Notch przez  $\gamma$ -sekretazę i uwolnienia wewnątrzkomórkowego fragmentu NICD. Uwolniony NICD ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie pośredniczy w regulacji genów, np. *Hes1*.

Chociaż generalnie uznaje się, że szlak sygnałowy Notch odgrywa ważną rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego komórek śródbłonka i przyczynia się do wzbudzenia fenotypu stanu uśpionia tych komórek, niewiele mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za ten stan komórek zostało do tej pory zaproponowanych. Co więcej, do tej pory nie opublikowano żadnej pracy opisującej rolę szlaku sygnałowego Notch w kontrolowaniu metabolicznych adaptacji komórek śródbłonka do ich stanu aktywacji.

### (iii) Metabolizm EC – siła napędowa angiogenezy

Komórki śródbłonka gwałtownie przechodzą od stanu uśpionia do indukcji angiogenezy w momencie aktywacji przez czynniki wzrostu. W ciągu ostatnich lat wykazano, że metabolizm śródbłonka jest ważny dla homeostazy tkanek jak i angiogenezy (Zecchin et al., 2017). Zmianom metabolicznym w komórkach śródbłonka oraz angiogenezie towarzyszą zmiany w sygnalizacji komórkowej. Ponieważ angiogeniczne komórki śródbłonka i uśpione komórki śródbłonka są funkcjonalnie zróżnicowane, jest wysoko prawdopodobne, że przebiegają w nich odmienne procesy metaboliczne. Angiogeniczne komórki śródbłonka potrzebują wydajnej syntezy biomasy i adenozyno-trifosforanu (ATP), co pozwala im na utrzymanie ich zdolności do proliferacji i migracji. Uśpione komórki śródbłonka, które są wystawione na działanie czynników oksydacyjnych środowiska w krwiobiegu wymagają by ich metabolizm utrzymywał stan homeostazy. Generalnie uważa się, że zróżnicowane dzielące się komórki wystawione na działanie tlenu mają aktywny metabolizm oksydacyjny (Vander Heiden et al., 2009).

Chociaż poziom tlenu w krwiobiegu jest jednym z najwyższych notowanych w organizmach ssaków, aktywnym procesem w komórkach śródbłonka jest glikoliza. Komórki śródbłonka wytwarzają ponad 85% ATP w procesie glikolizy (De Bock et al., 2013; Eelen et al., 2018a). Ponadto, stwierdzono, że fosfofruktokinazo-2/fruktozo-2,6-bisfosforan 3 (*ang. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3*), kluczowy regulator glikolizy, kontroluje zachowanie komórek czołowych (*ang. „tip cell”*) i intensywnie dzielących (*ang. „stalk cell”*). Poza glikolizą ważną rolę w utrzymaniu zdolności proliferacyjnych komórek śródbłonka odgrywa metabolizm kwasów tłuszczowych. Ostatnio stwierdzono, że kwasy tłuszczowe służą jako źródła węgla do syntezy dNTP (*ang. deoxynucleotide*), które są wykorzystywane w syntezie DNA komórek śródbłonka. Ponadto, hamowanie farmakologiczne lub genetyczne CPT1A (*ang. carnitine palmitoyltransferase I, CPT1A*), kluczowego enzymu ograniczającego tempo oksydacji kwasów tłuszczowych (*ang. fatty acid  $\beta$ -oxidation, FAO*), prowadzi do upośledzenia indukcji rozwoju naczyń wynikającego ze zmniejszonej proliferacji komórek śródbłonka oraz do zwiększonego przeciekania naczyń krwionośnych. Dodatkowo, VEGF może zwiększać pobieranie i transport kwasów tłuszczowych poprzez indukowanie ekspresji genu białka wiążącego kwasy tłuszczowe (*ang. fatty acid binding protein 4, FABP4*), powodując wzrost angiogenezy. (Harjes et al., 2016) **(4.b.3)**. Łącznie te odkrycia potwierdzają, że metabolizm komórek śródbłonka jest ważnym czynnikiem wpływającym na regulację procesu angiogenezy, który jest kontrolowany przez genetycznie zaprogramowane szlaki sygnałowe.

Uważa się, że angiogeniczne (proliferacyjne) i uśpione komórki śródbłonka mają inne potrzeby metaboliczne. Kosztowne procesy takie jak proliferacja i migracja, występujące w



aktywowanym śródbłonku, wymagają ogromnych ilości biomasy i energii. Z tego względu, potrzeby metaboliczne tych komórek muszą być odpowiednio dostosowane. W przeciwieństwie do tego, uśpione komórki śródbłonka opierają się na metabolizmie pozwalającym na podtrzymywaniu homeostazy komórkowej. Badania nad metabolizmem komórek śródbłonka skupiają się głównie nad czynnikami odpowiedzialnymi za indukcję angiogenezy, podczas gdy metabolizm homeostazy komórek śródbłonka w stanie spoczynku oraz metaboliczne adaptacje związane z indukowaniem tego stanu są pomijane. Z tego powodu moim celem było scharakteryzowanie procesów metabolicznych w komórkach śródbłonka w stanie spoczynku jak również szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za ich adaptację metaboliczną.

### **CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE**

Celem mojego osiągnięcia naukowego było pogłębienie wiedzy i informacji na temat biologii komórek śródbłonka. Prowadząc badania szukałam odpowiedzi na poniższe pytania:

1. Jaka jest rola i funkcja szlaków sygnalizacyjnych indukowanych hipoksją (HIF-1 $\alpha$ ) w komórkach śródbłonka nerek?
2. Jaki jest mechanizm molekularny leżący u podstaw przeprogramowania metabolicznego odpowiedzialny za indukcję podziałów uśpionych komórek śródbłonka?
3. Czy proliferujące/aktywne i uśpione (*quiescent*), zaindukowane do podziału komórki śródbłonka wykazują heterogeniczność metaboliczną?
4. W jaki sposób metaboliczne adaptacje wyciszonych komórek śródbłonka wpływają na homeostazę tych komórek i ich funkcję w organizmie?

### **W moich badaniach wykazałam że:**

1. HIF-1 $\alpha$  kontroluje przeżycie stanu niedotlenienia i adhezję leukocytów do komórek śródbłonka *in vitro*. (Kałucka J, 2015, *J Mol Med (Berl)* **(4.b.1)**).
2. Eliminacja HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka nie wpływa negatywnie na funkcję nerek. (Kałucka J, 2015, *J Mol Med (Berl)* **(4.b.1)**).
3. Aktywacja sygnalizacji Notch w komórkach śródbłonka obniża tempo metabolizmu i hamuje cykl komórkowy w trakcie przejścia z fazy G<sub>1</sub> do S. (Kałucka J, 2015, *Cell Cycle*) **(4.b.2)**.
4. Sygnalizacja Notch pośredniczy w indukcji  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych (FAO), które są niezbędne do utrzymania homeostazy uśpionych komórek śródbłonka. (Harjes U, Kałucka J, 2016, *Crit Rev Oncol Hematol*) **(4.b.3)** i (Kałucka J, 2018, *Cell Metabolism*) **(4.b.5)**.
5. Komórki śródbłonka które wchodzi w stan uśpienia, przeprogramowują swój metabolizm tak aby zwiększyć homeostazę redoks. Podobnie do komórek nowotworowych, komórki uśpione komórki śródbłonka wykorzystują FAO, aby zwiększyć regenerację NADPH. (Harjes U, Kałucka J, 2016, *Crit Rev Oncol Hematol*) **(4.b.3)** i (Kałucka J, 2018, *Cell Metabolism*) **(4.b.5)**.

6. Zahamowanie FAO w uśpionych komórkach śródbłonna powoduje ich dysfunkcję *in vivo*, którą można częściowo odwrócić poprzez suplementację octanem. (Kalucka J, 2017, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*) (4.b.4) i (Kalucka J, 2018, *Cell Metabolism*) (4.b.5).

7. Sygnalizacja Notch zwiększa transkrypcję enzymu CPT1A, który kontroluje stopień FAO (*ang. FAO flux*). (Kalucka J, 2018, *Cell Metabolism*) (4.b.5).

### Główne wyniki rozprawy habilitacyjnej:

(i) Brak HIF-1 $\alpha$  w linii komórek śródbłonna kłębuszków nerkowych upośledza przetrwanie w przypadku hipoksji i zmniejsza adhezję komórek odpornościowych *in vitro*. (publikacja 4.b.1)

Komórki śródbłonna wykazują heterogeniczność tkankową. Podczas gdy śródbłonek tętnic i żył tworzy ciągłą jednokomórkową warstwę, śródbłonek naczyń włosowatych może być ciągły, z fenestracjami i nieciągły (Kalucka et al., 2017a)(4.b.4). Śródbłonek z fenestracjami charakteryzuje się występowaniem wewnątrzkomórkowych porów (zwanymi fenestracjami) w błonie, która przechodzi przez wyściółkę śródbłonna. Obecność tych porów umożliwia szybką wymianę wody i małych peptydów pomiędzy plazmą a płynem śródmiąższowym. Ten typ naczyń włosowatych obserwuje się w kłębuszkach nerkowych, tkance biorącej udział w filtracji płynów (Jourde-Chiche et al., 2019). Ponadto, śródbłonek nerkowy bierze udział w takich procesach jak: regulacja reakcji/stanów zapalnych, utrzymanie perfuzji tkankowej i napięcia naczyń. Co istotne, niekontrolowane okresy uszkodzeń śródbłonna (np. podczas przedłużonego niedotlenienia) mogą prowadzić do ostrego lub nawet przewlekłego uszkodzenia nerek. W obu przypadkach uważa się, że niedotlenienie odgrywa kluczową rolę i przyczynia się do postępu choroby. Jednakże, do chwili obecnej wpływ mechanizmu reakcji na niedotlenienie w śródbłonku naczyń nerkowych na postępy choroby nie jest w pełni zrozumiały. Poprzednio wykazano, że HIF kompleksowo kontroluje przystosowanie się komórek do środowiska o niskim stężeniu tlenu, a HIF-1 $\alpha$  wymagany jest do proliferacji komórek śródbłonna, chemotaksji i penetracji zewnątrzkomórkowej macierzy podczas tworzenia się nowych naczyń (Tang et al., 2004). Z tego względu moim celem było zbadanie roli HIF-1 $\alpha$  w śródbłonku nerek podczas stanów fizjologicznych (rozwoju) jak również stanów patologicznych w nerce.

Przy użyciu technik *in vitro* najpierw oceniłam rolę HIF-1 $\alpha$  w proliferacji komórek śródbłonna, ich przetrwaniu i interakcji z komórkami odpornościowymi. Aby to osiągnąć używałam linii mysich komórek śródbłonna mikronaczyniowego kłębuszków nerkowych (gLEND.2) oraz komórek z wyciszonym genem kodującym HIF-1 $\alpha$  (Weidemann et al., 2013). Wyciszenia genu dokonano za pomocą konstruktów opartego na lentiwirusie zawierający sekwencje shRNA. Komórki z wyciszonym genem HIF-1 $\alpha$  (shHIF-1 $\alpha$ ) były porównywane do komórek kontrolnych, które uległy stabilnej transfekcji irrelewantnym shRNA (shGFP). Aby ocenić wpływ zależny od HIF-1 $\alpha$  na przeżycie stanu hipoksji przez komórki gLEND.2 wykonałam analizę aktywności mitochondriów, z wykorzystaniem testu MTT. Zgodnie z oczekiwaniami proliferacja komórek gLENDs.2 w warunkach prawidłowego poziomu tlenu nie była upośledzana w wyniku braku HIF-1 $\alpha$ . 72h po wystawieniu na warunki niedotlenienia, proliferacja tych

komórek była znacząco obniżona zarówno komórek kontrolnych jak i komórek z wyciszonym HIF-1 $\alpha$ . Ponadto, utrata HIF-1 $\alpha$  spowolniła proliferację komórek gEND.2, przyczyniła się do wzrostu procesu apoptozy i martwicy tych komórek w stanach niedotlenienia.

Wiadomo, że adhezja komórek odpornościowych takich jak monocyty/makrofagi do śródbłonna ma niezwykle istotne znaczenie dla późniejszych transmigracji tych komórek i pogłębieniu stanu zapalnego (Kałucka et al., 2017a)(4.b.4). Z tego względu oceniałam adhezję pierwotnych makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego (*ang. bone marrow derived macrophages, BMDM*) do komórek gEND.2 w stosunku do obecności HIF-1 $\alpha$ . Delecja HIF-1 $\alpha$  w komórkach gEND.2 istotnie zmniejszyła adhezję makrofagów w warunkach niedotlenienia i wpływała na ekspresję cząsteczki adhezyjnej ICAM1 (*ang. Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM1*). Ekspresja ICAM1 w stanie hipoksji była obniżona, co jest zgodne z poprzednio opublikowanymi danymi (Willam et al., 1999). Ponadto, wyciszenie HIF-1 $\alpha$  dodatkowo obniżyło ekspresję ICAM1. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazały, że HIF-1 $\alpha$  jest niezwykle ważne dla przetrwania hipoksji i dla adhezji leukocytów w linii kłębuszkowych komórek śródbłonna.

(ii) HIF-1 $\alpha$  podlega ekspresji w EC w komórkach nerek *in vivo*, jednakże jego delecja w komórkach śródbłonna nie upośledza funkcji nerek. (publikacja 4.b.1)

Pomimo spornych wyników przedstawionych w poprzednich publikacjach dotyczących ekspresji i znaczenia funkcjonalnego białka HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonna, moje wyniki uzyskane w doświadczeniach *in vitro* wskazały, że HIF-1 $\alpha$  jest niezwykle ważny dla różnych aspektów funkcji kłębuszkowych komórek śródbłonna i skłoniły mnie do dalszych badań nad tym białkiem w układach *in vivo*. Poprzez ekspozycję myszy na bodźce takie jak: niedotlenienie, wykorzystanie inhibitora hydroksylazy prolinowej (PHDi) i sepsy poprzez podwiązanie, zbadłam aktywację HIF-1 $\alpha$  w ich nerkach. Aby ocenić, czy HIF-1 $\alpha$  ulega ekspresji w komórkach śródbłonna w rdzeniu lub brodawkach wykorzystałam techniki immunohistochemiczne. Preparaty histologiczne (skrawki tkanek) zostały zanalizowane na obecność białka HIF-1 $\alpha$  i śródbłonkowego markera PLVAP/MECA-32 (*ang. plasmalemma vesicle-associated protein, PLVAP*). Zaobserwowałam, że bodźce takie jak niedotlenienie, PHDi lub sepsa wystarczają, żeby indukować sygnał HIF-1 $\alpha$  w nerkach. W porównaniu do ekspresji HIF-1 $\alpha$  w kanalikach nerkowych, całkowita liczba komórek śródbłonna wykazujących obecność HIF-1 $\alpha$  była niska i głównie ograniczona do komórek rdzenia nerkowego.

Aby zbadać, czy HIF-1 $\alpha$  wpływa na przetrwanie i stan zapalny śródbłonna nerkowego *in vivo*, warunkowo usunęłam HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonna poprzez krzyżowanie myszy z ekspresją Tie2-Cre ze zwierzętami typu *flox* HIF-1 $\alpha$ . Delecja HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonna nie uszkodziła rozwoju nerek ani tworzenia kłębuszków nerkowych. Podobnie, funkcja nerek u dorosłych (12. tygodniowych) myszy ocenianych pod kątem poziomu kreatyniny i mocznika w surowicy krwi, była porównywalna pomiędzy obu genotypami. Co więcej, wielkość kłębuszka nerkowego i ich liczba, jak również liczba naczyń krwionośnych nie różniła się pomiędzy osobnikami HIF-1 $\alpha$  knock-out i osobnikami z tych samych miotów w typie dzikim. Podsumowując, specyficzna delecja genu HIF-1 $\alpha$  w śródbłonku nie wpływa na funkcjonowanie nerek *in vivo* u myszy.

Ponieważ udało mi się wykryć HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka nerek po zastosowaniu patologicznego bodźca (indukcja sepsy przez CLP), wykorzystywałam modele ostrego uszkodzenia nerek (niedotlenienie nerek-uszkodzenie przy reperfuzji (*ang. ischemia reperfusion injury, IRI*)) i zwłóknienie nerek (jednostronna obstrukcja moczowodu (UUO)) do dalszych badań nad rolą HIF-1 $\alpha$  w śródbłonku nerek. 24 i 72h po niedokrwieniu i reperfuzji, funkcja nerek była istotnie upośledzona w porównaniu do zwierząt operowanych fikcyjnie (*ang. sham-operated*). Jednakże, warunkowy knock-out genu HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka myszy nie indukował istotnych zmian w ich metabolizmie oraz nie miał wpływu na stan ich zdrowia w porównaniu do zwierząt typu dzikiego z grupy kontrolnej. Ponadto, knock-out HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka nie miał wpływu na stopień uszkodzenia kanalików i zdolność tych komórek do proliferacji (oceny przez barwienie jądrowego antygenu komórek proliferujących (*ang. proliferating cell nuclear antigen, PCNA*)). Moje analizy wykazały także, że na infiltrację komórek odpornościowych (makrofagów i komórek T) nie wpływała utrata HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka. Chociaż ekspresja genów biorących udział w rekrutacji komórek odpornościowych (*ICAM1, VCAM1*) była podwyższona po IRI nerek, na żadne z nich nie wpływał brak HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka. Reasumując, brak HIF-1 $\alpha$  nie miał wpływu na uszkodzenie nerek i reakcję zapalną po ostrym uszkodzeniu nerek.

Jak wiadomo, zwłóknienie nerek w trakcie przewlekłej choroby nerek prowadzi do rozrzedzenia naczyń (co jest związane z niedotlenieniem tkanki śródmiąższowej). Dlatego zbadałam także, czy szlak sygnałowy HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonkach wpływa na zwłóknienie nerek przy użyciu modelu jednostronnej niedrożności moczowodu, UUO (*ang. unilateral ureteral obstruction, UUO*). Stosując ten model zaobserwowałam, że funkcja nerek pogarsza się z czasem, ale bez istotnych różnic pomiędzy zwierzętami typu dzikiego i tych z warunkowym knock-out HIF-1 $\alpha$ . Zgodnie z postępującym zwłóknieniem, ekspresja pro-fibrotycznego genu transformującego czynnik wzrostu beta, TGF- $\beta$  (*ang. transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$* ) stopniowo zwiększała się z czasem, niezależnie od HIF-1 $\alpha$ . Co więcej, geny kodujące białka związane ze zwłóknieniem takie jak Col1a1, Col1a2 i Pai1 ulegały zwiększonej ekspresji w komórkach nerek z obstrukcją niezależnie od genotypu. Rozległość stanu zapalnego, określony przez analizę immunohistologiczną monocytów infiltrowanych F4/80+ i komórek T CD3+ do nerek z obstrukcją i poprzez ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym (np. *ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$* ), nie była istotnie zmieniona przez HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka. Ogółem te wyniki wykazują, że śródbłonkowy HIF-1 $\alpha$  jest zbędny dla patofizjologicznego przystosowania do ostrych i przewlekłych uszkodzeń nerek.

Podsumowując, delecja genu HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka nerek nie wpływa na uszkodzenie tkanek, reakcje zapalne i rozwój zwłóknienia. Brak wpływu delecji HIF-1 $\alpha$  w śródbłonku nerek mógłby być przypisany faktowi, że w przeciwieństwie do komórek śródbłonka serca i płuc, istnieje ograniczona ekspresja HIF-1 $\alpha$  w komórkach śródbłonka nerek (Nolan et al., 2013). To sugeruje, że w ramach tego samego typu komórek funkcjonowanie HIF-1 $\alpha$  jest modyfikowane specyficznie tkankowo. Jednakże, w świetle opracowywanych terapeutycznych metod modyfikujących szlak sygnałowy HIF, niniejsze wyniki wskazują na nowy aspekt funkcjonowania i złożoność specyficznych izoformów HIF w przypadku reakcji na niedotlenienie

w komórkach nerek.

(iii) Adaptacje molekularne i metaboliczne w toku cyklu komórkowego (publikacja 4.b.2).

Szlaki sygnałowe Notch odgrywają ważną rolę w procesach różnicowania, proliferacji i przeżywalności komórek. W literaturze dostępne jest jednak tylko kilka prac omawiających udział receptorów Notch w regulacji metabolizmu komórek śródbłonna. Przykładowo, wykazano potencjalną interakcję Notch z białkiem Forkhead box protein O1 (FoxO1) w procesie regulacji ekspresji enzymów metabolicznych takich jak karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (*ang. phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1, PCK1*) czy glukozy-6-fosfataza (*ang. glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6Pase*) w hepatocytach. W literaturze nie opisano jednak szczegółowo mechanizmu tych interakcji (Pajvani et al., 2011; Valenti et al., 2013). Podobnie, współdziałanie pomiędzy FoxO1 i Notch1 zaobserwowano w kontekście komórek śródbłonna dla białka wiążącego kwasy tłuszczowe (*ang. fatty acid binding protein 4, FABP4*). W pracy opublikowanej przez Harjes i in. wykazano, że obok znanych motywów wiązania dla FoxO1, NICD wiąże się z również promotorem *FABP4* (Harjes et al., 2014; Harjes et al., 2016)(4.b.3).

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w laboratorium Prof. dr Petera Carmelieta wykazano, że komórki śródbłonna są silnie zależne od glikolizy będącej źródłem ponad 85% pozyskiwanego przez nie ATP (De Bock et al., 2013). Zaobserwowano ponadto, że pobudzenie komórek śródbłonna przez Delta-like ligand 4 (DII4) skutkuje obniżeniem tempa przemian glikolitycznych (*ang. glycolytic flux*)(De Bock et al., 2013). Celem prowadzonych przez mnie badań była bardziej dogłębna analiza powyższych obserwacji i dokładne określenie charakteru powiązań pomiędzy sygnalizacją Notch, glikolizą i cyklem komórkowym. Wychodowane komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (określane dalej jako „EC”) zsynchronizowałam w  $G_0$  w drodze inhibicji kontaktowej. Następnie pasażowałam je w celu dokonania pomiaru postępów cyklu komórkowego w różnych punktach czasowych za pomocą analizy FACS w połączeniu z barwieniem Pyroniną Y i Hoechst33342. Technika ta pozwoliła na pomiar zawartości DNA i RNA w żywych komórkach (Eddaoudi et al., 2018). 18 godzin po pasażowaniu, a tym samym po reaktywacji proliferacji, EC weszły w fazę S. Co ciekawe, bezpośrednio przed przejściem w fazę  $G_1/S$  (około 16 godzin po pasażowaniu) zaobserwowano wzrost tempa przemian glikolitycznych. Po zestawieniu wyników zebranych podczas analizy cyklu komórkowego i glikolizy zaobserwowałam, że zmiany metaboliczne zachodzą w EC jednocześnie, a nawet nieznacznie poprzedzają czas przejścia do fazy S.

W oparciu o założenie, że aktywacja sygnalizacji Notch redukuje proliferację komórek śródbłonna (Serra et al., 2015), zbadałam potencjalny wpływ sygnałów Notch na proces przejścia z fazy  $G_1$  do S. W tym celu zsynchronizowane w  $G_0$  komórki EC zostały wysiane na płytce pokryte białkiem rekombinowanym DII4 lub podłożem kontrolnym. Analiza FACS cyklu komórkowego wykazała, że przejście do fazy S komórek kontrolnych rozpoczynało się po 18 godzinach, natomiast wystawienie komórek na działanie DII4 znacznie opóźniło przejście z fazy  $G_1$  do S przy jednoczesnej redukcji ilości komórek będących w fazie S/ $G_2/M$ . Aktywacja sygnalizacji Notch wywołała również znaczne obniżenie aktywności glikolitycznej EC począwszy od 16 godziny po pasażowaniu (Kałucka et al., 2015)(4.b.2). Udało mi się tym samym wykazać,

że aktywacja sygnalizacji Notch w komórkach śródbłonna hamuje cykl komórkowy oraz spowolnia glikolizę.

We wcześniejszych badaniach ponadto wykazano, że genetyczne wyciszenie PFKFB3 osłabia zdolności proliferacyjne i migracyjne EC, bez indukowania śmierci komórkowej (De Bock et al., 2013). W celu dalszego zweryfikowania funkcjonalnego znaczenia PFKFB3, przeprowadziłam badania skierowane na sprawdzenie, czy nadekspresja PFKFB3 może niwelować barierę dla progresji cyklu komórkowego wynikającą z aktywacji sygnałów Notch. Komórki śródbłonna zostały transdukiowane wektorem lentiwirusowym odpowiedzialnym za ekspresję PFKFB3, co pozwoliło na zwiększenie poziomów białka PFKFB3. Ponadto, nadekspresja PFKFB3 w komórkach śródbłonna spowodowała zwiększenie poziomów glikolizy, którym towarzyszył wzrost tempa proliferacji analizowany przez pomiar włączania <sup>3</sup>H-tymidyny do DNA. Zgodnie z opisanymi powyżej wynikami, umieszczenie EC na płytkach pokrytych Dll4 skutkowało obniżeniem glikolizy. Natomiast nadekspresja PFKFB3 spowodowała zwiększenie poziomu glikolizy w komórkach umieszczonych na płytkach pokrytych Dll4 przywracając je do wartości porównywalnych z obserwowanymi w kontroli. Ponadto, nadekspresja PFKFB3 skutkowała zwiększeniem proliferacji komórek aktywowanych Dll4 do poziomów porównywalnych z obserwowanymi w komórkach kontrolnych, a tym samym częściowym zniwelowaniem zahamowania cyklu komórkowego przez Dll4. Wyniki te stanowią dodatkowe potwierdzenie przyczynowej roli PFKFB3 w sterowaniu cyklem EC wskazując na fakt, że nadekspresja PFKFB3 w pewnym zakresie niweluje wywołane przez Notch hamowanie proliferacji i glikolizy.

#### Adaptacje metaboliczne uśpionych komórek śródbłonna (publikacje 4.b.3; 4.b.4; 4.b.5)

Podczas, gdy większość badaczy koncentruje się na procesach prowadzących w śródbłonna do indukcji angiogenezy i sposobach powstrzymywania aktywacji i powstawania nowych naczyń komórek śródbłonna w przypadłościach patologicznych (np. w raku), w mojej kolejnej pracy badawczej zanalizowałam procesy regulujące przejście proliferujących komórek śródbłonna do fazy spoczynku/uśpienia żeby uzyskać wartościowy wgląd w procesy adaptacji metabolicznej powiązanej z tym aspektem. Uważa się, że aktywne i uśpione komórki śródbłonna wykazują różne zapotrzebowanie metaboliczne. Przykładowo, kosztowne procesy energetycznie takie jak proliferacja czy migracja zachodzące w aktywowanych komórkach śródbłonna wymagają dostępu do dużych ilości biomasy i energii. Zapotrzebowanie to nie może być bez wpływu na metabolizm komórki. Z drugiej strony, metabolizm nieaktywnych/wyciszonych komórek śródbłonna ma za zadanie utrzymanie ciągłości homeostazy komórkowej, zaś nadmierna aktywność metaboliczna może potencjalnie prowadzić do stresu metabolicznego i nagromadzenia toksycznych produktów.

#### *Poziom utleniania kwasów tłuszczowych (FAO) wzrasta w komórkach śródbłonna przechodzących do fazy spoczynkowej*

W celu wprowadzenia komórek śródbłonna w stan uśpienia zastosowałam dwie wzajemnie uzupełniające się metody. EC hodowano do chwili osiągnięcia inhibicji kontaktowej (Noseda et al., 2004) lub aktywowano z użyciem Dll4 (jak opisano powyżej), aby uaktywnić pro-spoczynkowe sygnały Notch (Harrington et al., 2008). Globalne zmiany metaboliczne

indukowane przejściem do fazy spoczynkowej oceniane były z wykorzystaniem analizy transkryptomowej (RNA-sequencing) w proliferujących EC (PEC) w porównaniu do transkryptomu nieaktywnych/uśpionych EC (QEC). Analiza korelacyjnej map cieplnych (*ang. heat maps*) i grupowania hierarchicznego wykazały występowanie wyraźnie zarysowanych klastrów metabolicznych QEC i PEC ( $p > 0,05$ ), co wskazuje na różnice w zakresie metabolicznych sygnatur genetycznych pomiędzy obiema grupami komórek. Szczegółowa analiza map cieplnych i mapowania szlaków komórkowych wykazały zwiększenie transkrypcji różnorodnych genów biorących udział w procesie utleniania kwasów tłuszczowych (FAO) w QEC, przy jednoczesnym obniżeniu transkrypcji genów uczestniczących w glikolizie, cyklu Krebsa, syntezie puryny/pirymidyny, oraz szlakach uczestniczących w syntezie nukleotydów. Z uwagi na fakt, że PEC wykorzystują FAO w procesie syntezy nukleotydów (Schoors et al., 2015), oczekiwałam, że QEC (rzadko podlegające proliferacji) wykazywać będą niższy, a nie wyższy poziom FAO. Dlatego też w dalszych badaniach skupiałam się na zaskakującej obserwacji wskazującej, że ekspresja genów uczestniczących w FAO była w istocie wyższa w QEC niż w PEC.

Pomiary z użyciem radioizotopów palmitynianu, glukozy i glutaminy wykazały że flux FAO wzrastało w chwili przejścia EC do fazy spoczynkowej, przy jednoczesnym obniżeniu tempa glikolizy, utleniania glukozy i glutaminy oraz syntezy kwasów tłuszczowych w QEC. W ujęciu łącznym, dane te wskazują na fakt, że w procesie indukowania fazy spoczynkowej, komórki EC zmieniają swój metabolizm nie do oczekiwanego profilu hipo-metabolicznego lecz do stanu obejmującego selektywną indukcję FAO.

Zgodnie z danymi literaturowymi, FAO pełni różne funkcje zależnie od rodzaju komórek. Po pierwsze, procesy FAO spełniają kluczową rolę w produkcji biomasy na potrzeby proliferujących EC. Po drugie, komórki wykazujące wysokie zapotrzebowanie energetyczne, przykładowo komórki mięśni szkieletowych czy kardiomiocyty, wykorzystują FAO w procesach produkcji ATP. Po trzecie, niektóre rodzaje komórek nowotworowych wykorzystują FAO w sytuacjach stresogennych w celu regulacji homeostazy redoks poprzez promocję produkcji NADPH (Harjes et al., 2016)(**4b.3**). Co istotne, wszystkie opisane powyżej funkcje FAO wykazują pewne cechy wspólne; we wszystkich przypadkach FAO zasila cykl Krebsa dostarczając reszt węglowych w postaci acetylo-CoA, który łączy się ze szczawiooctanem tworząc cytrynian. Cytrynian wchodzi następnie w serię reakcji prowadzących do powstania półproduktów cyklu Krebsa spełniających istotne role w różnego rodzaju procesach metabolicznych, w tym produkcji biomasy, homeostazie redoks i syntezie ATP (Harjes et al., 2016) (**4b.3**). W związku z powyższym, podjęłam próbę znalezienia przyczyny wzrostu FAO w QEC przez porównanie QEC do PEC z lentiwirusowym wyciszeniem CPT1A (CPT1A<sup>KD</sup>), który jest enzymem ograniczającym FAO. Opisane podejście pozwoliło na stwierdzenie, że FAO stymulowane przez CPT1A nie ma wpływu na regulację homeostazy energetycznej, produkcji biomasy czy acetylacji histonów, ponieważ wyciszenie CPT1A w QEC pozostawało bez wpływu na te procesy.

Aby lepiej zrozumieć sposób wykorzystania kwasów tłuszczowych przez QEC, przeprowadziłam doświadczenia ze znacznikiem metabolicznym z wykorzystaniem jednakowo oznakowanego [U-<sup>13</sup>C]-palmitynianu oraz określiłam rozkład znacznika <sup>13</sup>C w półproduktach cyklu Krebsa. Analiza z wykorzystaniem spektrometrii mas wykazała wyższą dystrybucję reszt

węglowych do półproduktów cyklu Krebsa w przypadku QECs w porównaniu do PECs. Ponadto, analiza rozkładu masy dla rozkładu izotopomeru wykazała, że znakowane M+3 oraz M+4 półprodukty cyklu Krebsa występowały częściej w QECs, co wskazuje, że komórki QECs przetwarzają reszty węglowe pochodzące z palmitynianu w większym stopniu niż komórki PECs i że mniej atomów węgla opuszcza cykl Krebsa, żeby służyć procesom anabolicznym.

### **Nieaktywne/Uśpione EC programowane są do podtrzymywania homeostazy redoks**

Jak wykazano już w przypadku niektórych rodzajów komórek nowotworowych, FAO może mieć kluczowe znaczenie dla procesów podtrzymywania homeostazy redoks poprzez promocję regeneracji NADPH (Harjes et al., 2016) (**4b.3**). W komórkach nowotworowych, acetylo-CoA, będąc produktem końcowym FAO, napędza cykl Krebsa oraz promuje powstawanie izocytrynianu i jabłczanu. Oba metabolity, są substratami NADP-zależnych enzymów: enzymu jabłczanowego (ME) (*ang. malic enzyme, ME*) i dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH) (*ang. isocitrate dehydrogenase, IDH*). Dodatkowo FAO stymuluje jednocześnie przemianę NADP do NADPH. NADPH zapewnia dostępność równoważników redukujących wykorzystywanych przez systemy redoks takie jak cykl glutationowy i tioredoksykowy, co oznacza, że jest on czynnikiem niezbędnym dla procesów homeostazy redoks.

Analiza RT-qPCR ekspresji genów wykazała, że poziomy transkrypcji mitochondrialnych *IDH2* i *ME3* były wyższe w przypadku QEC. Również poziomy NADPH były podwyższone w QECs, przy czym CPT1A<sup>KD</sup> powodowało obniżenie podwyższonych poziomów NADPH w QECs do poziomów obserwowanych w PECs. CPT1A<sup>KD</sup> pozostawało bez wpływu na regenerację NADPH w PECs, potwierdzając tym samym obserwacje dotyczące niewykorzystywania FAO przez PECs w kontekście homeostazy redoks (Harjes et al., 2016; Schoors et al., 2015). Oprócz powyższych zmian zaobserwowano również, że QECs wykazują wyższe poziomy transkrypcji genów uczestniczących w produkcji NAD(P), w tym N-metylotransferazy nikotynoamidowej (*ang. Nicotinamide N-methyltransferase, NNMT*), fosforybozylotransferazy nikotynianowej (*ang. Nicotinate phosphoribosyltransferase, NAPRT*), syntetazy NAD 1 (*ang. NAD Synthetase 1, NADSYN1*) oraz kinazy rybozydu nikotynaminowego 1 (*ang. Nicotinamide riboside kinase 1 NMRK1*). Tym samym, podwyższone poziomy NADPH obserwowane w QEC wynikają z jednoczesnego oddziaływania na wzrost syntezy NADP+ oraz na regenerację NADPH z NADP+ spowodowanego przez zwiększone wykorzystanie węgla pochodnych od kwasów tłuszczowych w celu podtrzymania cyklu Krebsa. QECs promują ekspresję zarówno NAP-zależnych jak i NADP-niezależnych enzymów, które posiadają potencjał do zniwelowania reaktywnych formy tlenu (*ang. reactive oxygen species, ROS*), n.p.: katalazę (*ang. catalase, CAT*) czy dysmutazę ponadtlenkowa (*ang. superoxide dismutase, SOD*).

Co ciekawe, dalsze badania wykazały, że wzrost FAO w czasie indukcji fazy spoczynkowej EC jest odwrotnie skorelowany z wewnątrzkomórkowym poziomem ROS. Obserwowane komórkowe poziomy ROS były niższe w QEC, zarówno w warunkach prawidłowych jak i stresowych (wystawienie na działanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), niż w przypadku PEC. Jednocześnie, wyciszenie genu CPT1A w QEC skutkowało zwiększeniem poziomów ROS, co potwierdza rolę FAO jako czynnika przeciwdziałającego stresowi oksydacyjnemu. Podsumowując, wyniki te wskazują, że QEC programowane są w kierunku optymalizacji homeostazy redoks.



## Molekularne mechanizmy podwyższenia poziomu FAO w QEC

Jak wykazałam powyżej (Kałucka et al., 2015) (**4.b.2**), szlaki sygnałowe Notch stanowią ważny regulator cyklu komórkowego i metabolizmu komórki. W oparciu o tę obserwację, podjęłam dalsze badania w celu określenia sposobu, w jaki sygnalizacja Notch pośredniczy w zaobserwowanym procesie przeprogramowania metabolicznego w QECs. Po zablokowaniu sygnałów Notch w QECs za pomocą DAPT (ester N-[N-(3,5-difluorofenacetyl)-L-alanil]-S-fenilglicyn t-butyl) zaobserwowałam obniżenie ekspresji CPT1A i poziomu FAO. Następnie sprawdziłam, czy sygnalizacja Notch może stanowić potencjalny aktywator transkrypcyjny dla ekspresji genu CPT1A w QECs. Aktywna transkrypcyjnie domena wewnątrzkomórkowa Notch (NICD) nie wiąże DNA bezpośrednio, lecz w drodze interakcji z RBPJK, białkiem wiążącym DNA (Castel et al., 2013). Co istotne, zidentyfikowałam cztery domniemane motywy wiązania RBPJK (Castel et al., 2013) z DNA w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu inicjującego transkrypcję genu *CPT1A*. Analiza immunoprecypitacji chromatyny (ChIP)-qPCR, przeprowadzona z wykorzystaniem przeciwciała anti-Notch1 (które rozpoznaje NICD), wykazała interakcję pomiędzy NICD oraz trzema z czterech zidentyfikowanych potencjalnych miejsc wiązania w pobliżu kodonu inicjującego transkrypcję *CPT1A* w komórkach QECs. Sygnał ten był zredukowany po poddaniu DAPT. Wyniki te potwierdzone zostały również w doświadczeniach z wykorzystaniem genu reporterowego lucyferazy (*ang. luciferase reporter assays*), który wykazał podwyższoną aktywność lucyferazy jako parametru zwiększonej transkrypcji genu *CPT1A*. Reasumując wyniki te wskazują, że sygnalizacja Notch zwiększa przynajmniej FAO flux częściowo poprzez indukcję ekspresji genu *CPT1A*.

## Zahamowanie FAO spowodowane ubytkiem CPT1A w komórkach QEC wywołuje stres oksydacyjny *in vivo* i prowadzi do dysfunkcji EC

W celu przeniesienia obserwacji dokonanych *in vitro* na kontekst *in vivo*, warunkowo inaktywowałam CPT1A specyficznie w komórkach śródbłonna u dorosłych mysz używając techniki Cre-lox (*Cdh5(PAC)<sup>CreERT2</sup>-CPT1A<sup>lox/lox</sup>*). W tej mysiej linii gen rekombinazy Cre jest pod kontrolą tkankowo specyficznego promotora (Ve-Cadherin) i jego ekspresja jest indukowana poprzez podanie myszom tamksyfenu. Następnie zbadałam, czy QEC w myszach z CPT1A knock-outem w komórkach śródbłonna (dalej „myszy CPT1A<sup>AEC</sup>”) wykazują podwyższone poziomy ROS w naczyniach krwionośnych. Świeżo wyizolowane aorty i żyły wrotne, zostały zabarwione *en face* dihydroetydyną (*ang. dihydroethidium, DHE*) (markerem ROS) oraz izolektyną (markerem EC); zaobserwowane poziomy DHE były porównywalne w komórkach śródbłonna myszy typu dzikiego (wild-type; WT) i CPT1A<sup>AEC</sup> w warunkach bazowych. Jednakże po zaaplikowaniu lipopolisacharydu (LPS) indukującego dysfunkcje komórek śródbłonna, zmiany i przecieki naczyniowe w skutek wytwarzania ROS (Kratzer et al., 2012) i wewnątrzkomórkowe poziomy ROS w QEC były wyższe u myszy CPT1A<sup>AEC</sup> w porównaniu do mysz kontrolnych pochodzących z tego samego miotu. Ponadto, infiltracja CD45+ leukocytów do płuc mysz CPT1A<sup>AEC</sup> nasiliła się po podaniu LPS w większym stopniu niż w myszach WT. Myszy CPT1A<sup>AEC</sup> były ogólnie bardziej podatne na działanie LPS, na co wskazuje ich szybszy zgon w porównaniu z myszami WT. Wyniki te wskazują, że obniżenie poziomu FAO w QEC nasila reakcję na LPS. Tym samym, utrata genu CPT1A w QECs skutkowałą wzrostem poziomów ROS *in vivo* i zwiększała podatność na stres

oksydacyjny pod wpływem czynnika zapalnego, co określane jest mianem dysfunkcji śródbłonna. W kolejnych eksperymentach *in vitro*, w których mierzyłam trans-śródbłonkową oporność elektryczną, udało mi się wykazać, że utrata CPT1A w QECs spowodowała obniżenie szczelności bariery (*ang. monolayer*) śródbłonna i zwiększyła jej przepuszczalność. W zgodzie z powyższym, zaobserwowałam mniejszą ilość ciągłych stabilnych połączeń kadheryn śródbłonna naczyniowego (VE-Cadherin+) w QEC w momencie zahamowanym FAO. Podsumowując, zahamowanie FAO wywołuje *in vivo* stres oksydacyjny prowadzący ostatecznie do dysfunkcji śródbłonna.

W celu dodatkowego potwierdzenia znaczenia FAO dla utrzymania homeostazy QEC, wykorzystałam model nieswoistego zapalenia jelit (*ang. inflammatory bowel disease; IBD*). W warunkach fizjologicznych, bariera naczyniowa w jelitach jest nieprzepuszczalna, lecz traci ona szczelność w przypadku IBD, umożliwiając tym samym infiltrację leukocytów (Kalucka et al., 2017a) (**4b.4**). Wsunęliśmy więc hipotezę, zgodnie z którą obniżona zdolność CPT1A<sup>AEC</sup> QEC do niwelowania (*ang. scavenging*) ROS (pochodzących z samych QEC lub innych źródeł) może mieć szkodliwy wpływ na przepuszczalność, naciekanie leukocytów oraz ogólną podatność na zapalenie okrężnicy wywołane przez podanie dekstranu siarczanu sodu (*ang. dextran sulfate sodium, DSS*). Weryfikując tę hipotezę stwierdziłam, że wartość współczynnika aktywności choroby (*ang. disease activity index; DAI*) (uwzględniającego spadek masy ciała, konsystencję stolca oraz występowanie krwi w stolcu i okolicy odbytu) była wyższa u myszy CPT1A<sup>AEC</sup>. Ponadto, okrężnice myszy CPT1A<sup>AEC</sup> były bardziej skurczone i wykazywały silniejsze histologiczne objawy stanu zapalnego, w tym zanik krypt, oddzielenie podstawy krypt od błony mięśniowej oraz zgrubienie ścian okrężnicy. Ponadto, zaobserwowałam bardziej widoczne infiltracje leukocytów CD45+ w okrężnicach myszy CPT1A<sup>AEC</sup> oraz obniżoną szczelność naczyń wynikającą z przełamania bariery QEC.

### *Terapie celujące w FAO i ich potencjalne zastosowania w klinice*

Zakładając, że FAO stanowi dla QEC źródło acetylo-CoA stanowiącego paliwo dla cyklu TCA, wysunęłam hipotezę, zgodnie z którą suplementacja octanów, które mogą zostać przekształcone w acetylo-CoA za pośrednictwem syntetazy acetylo-CoA, może stanowić alternatywne źródło węgla pozwalające na uzupełnienie zasobów acetylo-CoA i przywrócenie zdolności do niwelowania ROS przez QEC z wyciszonym CPT1A. Obserwacje potwierdziły, że suplementacja octanem skutkowało obniżeniem wewnątrzkomórkowych poziomów ROS do wartości obserwowanych w komórkach kontrolnych, łącząc tym samym zaburzenie równowagi redoks obserwowane w CPT1A<sup>KD</sup> z cyklem Krebsa. Ponadto, leczenie myszy CPT1A<sup>AEC</sup> z wykorzystaniem octanu sodu zapobiegało wzrostowi poziomów DHE+ ROS w QECs po podaniu LPS i ograniczyło infiltrację CD45+ leukocytów do płuc. Wyniki te wskazują, że suplementacja octanowa pozwala na skutecznie przeciwdziałanie zaburzeniom równowagi redoks w warunkach obniżenia CPT1A. W dalszych badaniach warto będzie odpowiedzieć na pytania: czy niewłaściwe poziomy FAO mają wpływ na schorzenia charakteryzujące się dysfunkcją EC wynikającą ze stresu oksydacyjnego? oraz czy suplementacja octanowa może stanowić wartościową opcję terapeutyczną w działaniach nakierowanych na przeciwdziałanie zaburzeniom związanym ze stresem oksydacyjnym, dysfunkcją EC oraz rozwojem tego rodzaju schorzeń?

## Wnioski

Zebrane wyniki prac opublikowanych w **trzech recenzowanych pismach i dwóch pracach przeglądowych**, stanowią streszczenie dokonanych przeze mnie odkryć w zakresie charakterystyki biologicznej i funkcjonalnej komórek śródbłonka. W szczególności, po raz pierwszy opisałam sposób, w jaki HIF-1 $\alpha$  i sygnały hipoksyjne wpływają na nerkowe komórki śródbłonka wykorzystując różne analizy *in vitro* i modele *in vivo*. Pomimo, że utrata HIF-1 $\alpha$  w kłębuszkowych komórkach śródbłonka indukuje śmierć komórek i obniża adhezję makrofagów *in vitro* w warunkach hipoksji, *in vivo*, utrata HIF-1 $\alpha$  nie prowadzi do nieprawidłowości rozwojowych lub fenotypowych nerki. Śródbłonkowe HIF-1 $\alpha$  nie ma wpływu na czynność nerek, stany zapalne i zwłóknienie w następstwie uszkodzeń niedokrwiennie reperfuzyjnych lub jednostronnej niedrożności dróg moczowych. Wskazuje to na istotne różnice pomiędzy reakcją hipoksyjną nerkowego łożyska naczyniowego, a analogiczną reakcją obserwowaną w innych organach takich jak serce lub płuca. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie w kontekście rozwoju strategii farmakologicznych obejmujących śródbłonkowe szlaki reakcji hipoksyjnej.

Ponadto, po raz pierwszy opisałam sposób, w jaki komórki śródbłonka dostosowują swój metabolizm w czasie indukcji fazy spoczynkowej komórek EC do podziału. Zważywszy na fakt, że dysfunkcja nieaktywnego śródbłonka ma udział w przebiegu licznych chorób, w istocie większej ich liczby niż w przypadku dysfunkcji jakichkolwiek innych rodzajów komórek, identyfikacja nowych (opartych na metabolitach) strategii pozwalających na przeciwdziałanie/zapobieganie dysfunkcji EC może potencjalnie stanowić wartościową alternatywę terapeutyczną. Powszechnie przyjmuje się, że wyciszone/uśpione komórki wykorzystują jedynie podstawowe funkcje metaboliczne pozwalające na utrzymanie komórek przy życiu. Jednakże przeprowadzona przeze mnie charakterystyka metaboliczna wykazała, że wyciszone/uśpione komórki śródbłonka przyjmują wysoce wyspecjalizowany profil metaboliczny. Pomimo ograniczenia procesów glikolizy, utleniania glukozy i glutaminy, FAO utrzymywane jest na zaskakująco wysokim poziomie. Doświadczenia obejmujące utratę tej funkcji wykazały, że FAO stymuluje regenerację mitochondrialną NADPH zapewniając tym samym zdolność redukcyjną pozwalającą na utrzymanie homeostazy redoks.

Ponadto, zgromadzone przeze mnie dane prowadzą do zaskakującej konkluzji, iż jeden szlak metaboliczny spełnia uniwersalną, dwoistą rolę w zależności od statusu proliferacyjnego danej komórki. Z jednej strony, w proliferujących komórkach śródbłonka FAO spełnia rolę polegającą na promowaniu syntezy nukleotydów (Schoors et al., 2015), zaś z drugiej, w przypadku wyciszonych komórek FAO pozwala na utrzymanie homeostazy redoks, a tym samym integralności komórki. Opisałam również mechanizm molekularny związany z omawianymi adaptacjami. Aktywacja sygnalizacji Notch reguluje ekspresję CPT1A (enzymu kontrolującego FAO). Ponadto, omówiłam rolę tej adaptacji w kontekście ochrony przed stresem oksydacyjnym i zapobiegania dysfunkcji komórek śródbłonka *in vivo*. I wreszcie, zaobserwowałam, że suplementacja octanowa pozwala na przywrócenie zdolności do niwelacji ROS przez komórki śródbłonka z wyciszonym genem CPT1A w modelu LPS oraz, że znormalizowane infiltracji leukocytów u myszy pozbawionych śródbłonkowego CPT1A sugeruje, iż promocja FAO lub stymulacja wykorzystania octano-pochodnych reszt węglowych może pomagać w zwalczaniu chorobowej dysfunkcji komórek śródbłonka.

**Wykaz stosowanych skrótów i symboli nie wyjaśnionych w tekście**

ATP	adenosine triphosphate
ChIP-qPCR	Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) coupled with quantitative PCR
Col1a1	collagen, type I, alpha 1,
Col1a2	collagen, type I, alpha 2
FACS	fluorescence-activated cell sorting
G6Pase	Glucose 6-phosphatase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Pai1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
RT-qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin

## Wykaz cytowanej literatury

- Aird, W.C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100, 158-173.
- Aird, W.C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100, 174-190.
- Bruning, U., Morales-Rodriguez, F., Kalucka, J., Goveia, J., Taverna, F., Queiroz, K.C.S., Dubois, C., Cantelmo, A.R., Chen, R., Lorocho, S., et al. (2018). Impairment of Angiogenesis by Fatty Acid Synthase Inhibition Involves mTOR Malonylation. *Cell Metab* 28, 866-880 e815.
- Cantelmo, A.R., Conradi, L.C., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., Chaturvedi, P., Hol, J., Thienpont, B., Teuwen, L.A., et al. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* 30, 968-985.
- Cantelmo, A.R., Pircher, A., Kalucka, J., and Carmeliet, P. (2017). Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opin Ther Targets* 21, 239-247.
- Castel, D., Mourikis, P., Bartels, S.J., Brinkman, A.B., Tajbakhsh, S., and Stunnenberg, H.G. (2013). Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev* 27, 1059-1071.
- Conradi, L.C., Brajic, A., Cantelmo, A.R., Bouche, A., Kalucka, J., Pircher, A., Bruning, U., Teuwen, L.A., Vinckier, S., Ghesquiere, B., et al. (2017). Tumor vessel disintegration by maximum tolerable PFKFB3 blockade. *Angiogenesis* 20, 599-613.
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., et al. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651-663.
- Eddaoudi, A., Canning, S.L., and Kato, I. (2018). Flow Cytometric Detection of G0 in Live Cells by Hoechst 33342 and Pyronin Y Staining. *Methods Mol Biol* 1686, 49-57.
- Eelen, G., de Zeeuw, P., Treps, L., Harjes, U., Wong, B.W., and Carmeliet, P. (2018a). Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* 98, 3-58.
- Eelen, G., Dubois, C., Cantelmo, A.R., Goveia, J., Bruning, U., DeRan, M., Jarugumilli, G., van Rijssel, J., Saladino, G., Comitani, F., et al. (2018b). Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. *Nature* 561, 63-69.
- Fong, G.H., and Takeda, K. (2008). Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* 15, 635-641.
- Gridley, T. (2010). Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol* 92, 277-309.
- Harjes, U., Bridges, E., McIntyre, A., Fielding, B.A., and Harris, A.L. (2014). Fatty acid-binding protein 4, a point of convergence for angiogenic and metabolic signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem* 289, 23168-23176.
- Harjes, U., Kalucka, J., and Carmeliet, P. (2016). Targeting fatty acid metabolism in cancer and endothelial cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 97, 15-21.
- Harrington, L.S., Sainson, R.C., Williams, C.K., Taylor, J.M., Shi, W., Li, J.L., and Harris, A.L. (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 75, 144-154.
- Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Bierhansl, L., Zecchin, A., Bruning, U., Visnagri, A., Yuldasheva, N., Goveia, J., Cruys, B., et al. (2017). Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *EMBO J* 36, 2334-2352.
- Jourde-Chiche, N., Fakhouri, F., Dou, L., Bellien, J., Burtey, S., Frimat, M., Jarrot, P.A., Kaplanski, G., Le Quintrec, M., Pernin, V., et al. (2019). Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 87-108.
- Kalucka, J., Bierhansl, L., Wielockx, B., Carmeliet, P., and Eelen, G. (2017a). Interaction of endothelial cells with macrophages-linking molecular and metabolic signaling. *Pflugers Arch* 469, 473-483.
- Kalucka, J., Missiaen, R., Georgiadou, M., Schoors, S., Lange, C., De Bock, K., Dewerchin, M., and

- Carmeliet, P. (2015). Metabolic control of the cell cycle. *Cell Cycle* 14, 3379-3388.
- Kalucka, J., Teuwen, L.A., Geldhof, V., and Carmeliet, P. (2017b). How to Cross the Lymphatic Fence: Lessons From Solute Transport. *Circ Res* 120, 1376-1378.
- Kratzer, E., Tian, Y., Sarich, N., Wu, T., Meliton, A., Leff, A., and Birukova, A.A. (2012). Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 688-697.
- Nolan, D.J., Ginsberg, M., Israely, E., Palikuqi, B., Poulos, M.G., James, D., Ding, B.S., Schachterle, W., Liu, Y., Rosenwaks, Z., et al. (2013). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev Cell* 26, 204-219.
- Nosedá, M., Chang, L., McLean, G., Grim, J.E., Clurman, B.E., Smith, L.L., and Karsan, A. (2004). Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 24, 8813-8822.
- Pajvani, U.B., Shawber, C.J., Samuel, V.T., Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., Kitajewski, J., and Accili, D. (2011). Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. *Nat Med* 17, 961-967.
- Schonenberger, M.J., and Kovacs, W.J. (2015). Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol* 3, 42.
- Schoors, S., Bruning, U., Missiaen, R., Queiroz, K.C., Borgers, G., Elia, I., Zecchin, A., Cantelmo, A.R., Christen, S., Goveia, J., et al. (2015). Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature* 520, 192-197.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Serra, H., Chivite, I., Angulo-Urarte, A., Soler, A., Sutherland, J.D., Arruabarrena-Aristorena, A., Ragab, A., Lim, R., Malumbres, M., Fruttiger, M., et al. (2015). PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis. *Nat Commun* 6, 7935.
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F.J., Huang, Y., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Johnson, R.S. (2004). Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 485-495.
- Valenti, L., Mendoza, R.M., Rametta, R., Maggioni, M., Kitajewski, C., Shawber, C.J., and Pajvani, U.B. (2013). Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes* 62, 4052-4062.
- Vandekeere, S., Dubois, C., Kalucka, J., Sullivan, M.R., Garcia-Caballero, M., Goveia, J., Chen, R., Diehl, F.F., Bar-Lev, L., Souffreau, J., et al. (2018). Serine Synthesis via PHGDH Is Essential for Heme Production in Endothelial Cells. *Cell Metab* 28, 573-587 e513.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Weidemann, A., Breyer, J., Rehm, M., Eckardt, K.U., Daniel, C., Cicha, I., Giehl, K., and Goppelt-Struebe, M. (2013). HIF-1alpha activation results in actin cytoskeleton reorganization and modulation of Rac-1 signaling in endothelial cells. *Cell Commun Signal* 11, 80.
- Willam, C., Schindler, R., Frei, U., and Eckardt, K.U. (1999). Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am J Physiol* 276, H2044-2052.
- Wong, B.W., Wang, X., Zecchin, A., Thienpont, B., Cornelissen, I., Kalucka, J., Garcia-Caballero, M., Missiaen, R., Huang, H., Bruning, U., et al. (2017). The role of fatty acid beta-oxidation in lymphangiogenesis. *Nature* 542, 49-54.
- Zecchin, A., Kalucka, J., Dubois, C., and Carmeliet, P. (2017). How Endothelial Cells Adapt Their Metabolism to Form Vessels in Tumors. *Front Immunol* 8, 1750.

#### 4.D OMÓWIENIE POZOSTAŁEGO DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO:

##### Osiągnięcia naukowe i badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja zainteresowanie do nauk biologicznych zostało rozbudzone podczas studiów na kierunku Biotechnologia na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, jak również na Uniwersytecie w Gandawie, w Belgii, gdzie odbyłam istotną część mojej edukacji. Już na pierwszym semestrze studiów zgłosiłam się do studenckiej grupy badawczej kierowanej przez prof. Hannę Jackowiak w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt na Uniwersytecie Przyrodniczym. Zakres działań naszej grupy obejmował badanie wzrostu i rozwoju przed- i pourodzeniowym różnych narządów kręgowców (w tym rozwojem budowy języka i podniebienia u ptaków i ssaków). Aktywny, 3-letni udział w tej grupie, dał mi unikatową możliwość zdobycia praktycznego doświadczenia w zakresie wielu technik histologicznych, które nie były uwzględnione w podstawowym toku studiów i okazały się być podstawą do szybkiego rozwoju moich przyszłych badań. Ponadto miałam okazję prezentować uzyskane wówczas rezultaty podczas wydziałowych, międzywydziałowych, jak i ogólnokrajowych spotkań naukowych studentów.

Aby lepiej poznać różne środowiska naukowe, latem 2014 roku odbyłam dwumiesięczny staż na Wydziale Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Saint Louis w USA. Podczas pobytu w grupie badawczej Prof. dr T. Heyduk'a uczestniczyłam w projekcie, którego celem było opracowanie nowatorskich, sensorów białek opartych na kwasie nukleinowym. Jako osoba szczególnie zainteresowana biologią molekularną i atmosferą środowiska naukowego, zdecydowałam się kontynuować swoją edukację za granicą. W ramach wymiany studenckiej odbyłam 18-miesięczny staż w Centrum Badań nad Stanami Zapalnymi (VIB, pl. Flamandzki Instytut Biotechnologii, Belgia), gdzie zdobyłam doświadczenie w pracy z myszami jako organizmem modelowym oraz pogłębiłam swoją wiedzę z zakresu biologii rozwoju i komórek śródbłonna. Wyniki pracy magisterskiej, pod kierownictwem Dr Jody Haigh, na temat roli czynnika wzrostu śródbłonna naczyńowego, VEGF w rozwoju erytrocytów zarodkowych zostały opublikowane w czasopiśmie *Blood* (Drogat B, Kalucka J *i in.*, **Blood** 2010)(Zał. 4.II.A.1).

##### Osiągnięcia naukowe i badawcze podczas studiów doktoranckich

Zainteresowanie nauką oraz zachęta mojego mentora skłoniły mnie do kontynuowania badań naukowych. Dlatego też aplikowałam i pomyślnie zostałam przyjęta na studia doktoranckie w ramach uznanego, międzynarodowego programu doktorskiego (DIPP (Dresden International PhD Program), Drezno, Niemcy) organizowanego przez Instytut Molekularnej Biologii Komórki i Genetyki im. Maxa Planck'a. Wiosną 2007 roku dołączyłam do nowo utworzonej grupy kierowanej przez Prof. dr Bena Wielockx'a, gdzie badałam biologiczną rolę czujnika tlenu, hydroksylazy prolinowej HIF 2 (prolyl hydroxylase domain-containing protein 2) oraz czynników indukowanych hipoksją (HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ , *hypoxia-inducible factors*) w warunkach fizjologicznych i patologicznych, takich jak hematopoeza, regeneracja tkanek (skóry) oraz nowotwory. Moje badania prowadzone podczas doktoratu były stymulujące, ponieważ mogłam wnieść swój wkład i wzbogacić się o 3 pierwsze (współ)autorskie publikacje w czasopismach o wysokim wskaźniku cytowań (Kalucka J *i in.*, **MCB** 2013; Franke K\*, Kalucka J\*, *i in.*, **Blood** 2013; Singh R \*, Kalucka J\*, *i in.*, **Blood** 2013) (\*równorzędni współautorzy) oraz 2 dodatkowe współautorskie artykuły

(Zař. 4.II.A.2; Zař. 4.II.A.4-7). Podczas mojego doktoratu korzystając z kilku samodzielnie stworzonych, warunkowych linii myszy knock-out, wykazařam, że utrata PHD2 w nabłonku (ale nie w komórkach immunologicznych i śródbłonkowych) przyspiesza regenerację skóry w wyniku indukcji ekspresji integryny  $\beta 3$  zależnej od HIF-1 $\alpha$  (Kalucka J i in., **MCB** 2013)(Zař. 4.II.A.6). Ponadto wykazařam, że utrata PHD2 w komórkach krwiotwórczych wywołuje erytrocytozę, która jest zależna wyłącznie od HIF-2  $\alpha$ , a nie od HIF-1  $\alpha$  (Franke K \*, Kalucka J\* i in., **Blood** 2013) (Zař. 4.II.A.4), oraz że PHD2 kontroluje utrzymanie hematopoetycznych komórek macierzystych w sposób zależny od HIF-1 $\alpha$  (Singh R \*, Kalucka J\* i in., **Blood** 2013; (\* równorzędni współautorzy) (Zař. 4.II.A.5). Moje badania wykazařy również, że utrata PHD2 w układzie krwiotwórczym zmniejsza objętość guza w dwóch niezależnych modelach myszy (Mamlouk S, Kalucka J i in. **Int J. Cancer**. 2014)(Zař. 4.II.A.7) oraz że zahamowanie PHD2 w komórkach nowotworowych zmniejsza wzrost guza u myszy poprzez działanie antyproliferacyjne TGF $\beta$  (Klotzsche-von Ameln A, i in., **Cancer Res** 2011)(Zař. 4.II.A.2).

### Osiągnięcia naukowe i badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

#### *(i) Rola czynników indukowanych hipoksją (HIFs) i farmakologicznych inhibitorów hydroksylaz prolinowych HIF podczas ostrej i przewlekłej choroby nerek.*

Widząc znaczenie postępu badań w dziedzinie regeneracji tkanek, postanowiřam skupić się na dalszym poznawaniu mechanizmów leżących u podstaw procesów regeneracyjnych w celu określenia nowych strategii terapeutycznych i dalszego rozwoju translacyjnych projektów badawczych. Dołączyřam do jednostki badawczej w Centrum Badań Translacyjnych (*ang. Translation Research Center, TRC*) w Klinice Erlangen-Nürnberg w Niemczech. Podczas stażu podoktorskiego badařam rolę czynników indukujących hipoksję (HIF) i farmakologicznych inhibitorów hydroksylaz prolinowych HIF w ostrej i przewlekłej chorobie nerek. Aby pozyskać środki na badania, otrzymařam grant z programu ELAN-Programm (Erlanger Leistungsbezogene Anschubfinanzierung und Nachwuchsförderung) Fonds für Forschung und Lehre am Klinikum (*pl. Fundusz na rzecz badań i nauczania w klinice*).

Oprócz badań, które uwzględniřam w części 4C. w tym zařączniku, realizowařam również projekt dotyczący wpływu inhibitorów hydroksylazy prolinowej (PHDi) na przewlekłe śródmięszkowe zapalenia nerek indukowane przez adeninę (Schley G, Klanke B, Kalucka J i in., **Kindey Int** 2019, w druku) (Zař.4.II.A.19). Zaobserwowařam, że podawanie mysz PHDi redukuje infiltrację F4/80+ fagocytów jednojądrzystych w nerkach i wspiera regulacyjną, przeciwzapalną odpowiedź immunologiczną. Ponadto zaburzenia czynności nerek i uszkodzenia tkanki śródmięszkowej (w tym uszkodzenia cewek bliższej i dalszej), jak również osadzanie kryształów w nerkach, były istotnie zmniejszone w grupie myszy, którym poddawano PHDi. Te wyniki, oferują potencjalne możliwości terapeutyczne w przypadku leczenia przewlekłego zapalenia nerek (Schley G, Klanke B, Kalucka J i in., **Kindey Int** 2019, w druku). Aktualnie dalsze doświadczenia pod tym kątem są przeprowadzane.

Podczas pobytu w TRC zaczęřam dostrzegać istotną rolę komórek śródbłonka w rozwoju wielu stanów chorobowych, jak również to, że potencjał terapeutyczny ukierunkowany na



komórki śródbłonna nie jest w pełni wykorzystywany. Równocześnie, badania nad metabolizmem komórkowym zaczęły ujawniać jego istotne znaczenie w procesie angiogenezy, co dodatkowo zmotywowało mnie, aby kontynuować moje badania w tym kierunku w *Flamandzkim Instytucie Biotechnologii (ang. Flanders Institute for Biotechnology, VIB)* Katolickiego Uniwersytetu w Leuven, w Belgii.

### *(ii) Rola metabolizmu komórkowego w funkcji komórek śródbłonna.*

Dostrzegając ogromne znaczenie śródbłonna w postępie różnych warunków patologicznych oraz fakt, że potencjał terapeutyczny ukierunkowany na komórki śródbłonna nie jest jeszcze w pełni wykorzystany, zdecydowałam się dołączyć do grupy badawczej Prof. dr Petera Carmelieta, który jest uznanym autorytetem w dziedzinie angiogenezy i bada również możliwości wykorzystania metabolizmu śródbłonna jako ulepszonej strategii antyangiogennej w warunkach patologicznych. Jesienią 2014 r. otrzymałam stypendium podoktorskie FWO, które jest najbardziej prestiżowym stypendium badawczym przyznawanym przez Fundację Badawczą w Flandrii (*ang. Research Foundation - Flanders (FWO)*), i wkrótce po tym dołączyłam do zespołu Prof. dr Petera Carmelieta.

#### a) Ukierunkowanie na metabolizm komórek śródbłonna jako nowe podejście przeciwnowotworowe

Naczynia krwionośne nie tylko dostarczają tlen i składniki odżywcze do wszystkich narządów, ale również wspomagają wzrost tkanek patologicznych, np. nowotworów. Gwałtownie rosnące nowotwory, które stale wymagają tlenu i składników odżywczych, wytwarzają intensywnie bodźce angiogeniczne, co powoduje zachwianie równowagi w sygnalizacji pro- i antyangiogennej. Skutkuje to powstawaniem nieprawidłowej i nieszczelnej sieci naczyniowej, charakteryzującej się hipoksją, kwasicyą i wysokim ciśnieniem płynów śródmiąższowych. Działanie tych bodźców w połączeniu z hipoksyjnym środowiskiem nowotworowym powoduje hiperaktywację **nowotworowych komórek śródbłonna** (*ang. tumor endothelial cells, TECs*) (Cantelmo et al., 2016; Cantelmo et al., 2017)(Zał 4.II.A.11; Zał 4.II.A.21).

Klasyczne terapie antyangiogenne były początkowo opracowywane w celu zrównoważenia ilości bodźców pro- i antyangiogennych. Chociaż badania przedkliniczne przyniosły obiecujące wyniki, nie przełożyły się one jednak na pełen sukces badań klinicznych, wykazujących jedynie niewielki wzrost przeżywalności pacjentów chorych na raka. Coraz więcej dowodów wskazuje, że wiele ścieżek sygnałowych istotnych dla komórek śródbłonna łączy się z metabolizmem, który w ten sposób staje się atrakcyjnym celem do alternatywnego wykorzystania i przewyższenia ograniczeń obecnych terapii antyangiogennych. Pracownia Prof. dr Petera Carmelieta zidentyfikowała wcześniej glikolizę jako główny szlak metaboliczny w proliferujących komórkach śródbłonna (De Bock et al., 2013). Poprzez mój udział w badaniach nad metabolizmem nowotworowych komórek śródbłonna oraz wpływem hamowania glikolizy na wzrost guza i przerzutów, udało nam się wykazać, że TEC posiadają hiperglikolityczny metabolizm, który pozwala na szybką syntezę nukleotydów. Niedobór aktywatora glikolizującego PFKFB3 nie wpłynął na wzrost nowotworu, ale znormalizował naczynia guzowate

i zmniejszył wyciekanie komórek nowotworowych do krwiobiegu i przerzuty nowotworowe. Normalizacja naczyń krwionośnych spowodowało to lepszą perfuzję i ogólną poprawę chemioterapii guzów pierwotnych i przerzutowych (Cantelmo et al., 2016) (Załącznik 4.II.A.11). Zahamowanie działania PFKFB3 wywołało te efekty poprzez zaburzenie endocytozy kadheryny śródbłonka (*ang. vascular endothelial cadherin; CD144*). Wyniki te uzyskano stosując PFKFB3-bloker 3-(3-pirydynylo)-1-(4-pirydynylo)-2-propen-1-on (3PO) w niskim stężeniu (25 mg/kg). Jednakże, gdy zastosowaliśmy 3PO w najwyższej tolerowanej dawce (70 mg/kg), nie sprzyjało to już normalizacji naczyń guzowatych, ale zwiększało nieodwracalne zatrzymanie wzrostu komórek śródbłonka i ich śmierć, powodując fragmentację i rozpad nowotworowych naczyń krwionośnych (Conradi et al., 2017) (Załącznik 4.II.A.13). Wyniki te zasługują na dalsze rozważenie ukierunkowania glikolizy TEC jako strategii leczenia nowotworów. Jednocześnie wyniki te jasno obrazują znaczenie odpowiedniego dawkowania inhibitora glikolizy, jeśli głównym celem jest ograniczenie rozprzestrzeniania się przerzutów oraz poprawa skuteczności i efektywności chemioterapii.

#### b) Rola i funkcja metabolizmu seryny, glutaminy i kwasów tłuszczowych w komórkach śródbłonka

Podczas moich badań nad metabolizmem komórkowym zauważyłam również, że w komórkach śródbłonka zachodzi ekspresja kluczowych enzymów dla syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych (*ang. fatty acids, FA*) – karboksylazy acetylo-CoA i syntazy kwasów tłuszczowych (*ang. fatty acid synthase, FASN*). Oba te enzymy są niezbędne do przekształcenia acetylo-CoA w malonylo-CoA i produkcji długołańcuchowych FA z acetylo- i malonylo-CoA (Harjes et al., 2016) (4b.3). Dlatego zastanawiające było, dlaczego komórki śródbłonka, chociaż są w pełni wyposażone w mechanizm absorpcji i degradacji FA, wytwarzają kluczowe enzymy dla syntezy *de novo* FA. Przeprowadzone badania wykazały, że FASN reguluje poziom malonylo-CoA, który jest substratem tego enzymu. Inhibicja FASN podniosła poziom cytozolowego malonylo-CoA, co prowadzi do malonylacji potranslacyjnej mTOR, zmniejszając w ten sposób aktywność mTOR, która zaburza procesy angiogeniczne naczyń (Bruning et al., 2018) (Załącznik 4.II.A.16).

Oprócz wkładu FAO w produkcję *de novo* nukleotydów w dzielących się komórkach śródbłonka, EC mogą również wykorzystywać aminokwasy endogenne, np. glutaminę lub serynę w celu utrzymania homeostazy i podziału komórkowego (Huang et al., 2017; Vandekeere et al., 2018) (Załącznik 4.II.A.14; Załącznik 4.II.A.15). Na przykład, byliśmy w stanie wykazać, że u nowonarodzonych myszy ze specyficznym dla śródbłonka knockoutem pierwszego enzymu regulującego szlak seryny, dehydrogenazy fosfoglicerynianowej (*ang. phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH*) ( $PHGDH^{\Delta EC}$ ), w ciągu kilku dni od inaktywacji genu, pojawiają się wady naczyń krwionośnych. Brak *Phgdh* w komórkach śródbłonka u myszy skutkuje obniżoną proliferacją tych komórek i powoduje jego dysfunkcje, co w aspekcie końcowym prowadzi do przedwczesnej śmierci zwierząt. Oprócz zaburzeń syntezy nukleotydów, wyciszenie PHGDH w komórkach śródbłonka *in vitro* zwiększa stres oksydacyjny nie tylko z powodu zmniejszenia syntezy glutationu i NADPH, ale także z powodu dysfunkcji mitochondriów. Po wyciszeniu PHGDH w komórkach śródbłonka *in vitro*, zauważyliśmy obniżoną aktywność enzymów łańcucha transportu elektronów (*ang.*

*electron transport chain, ETC*) z powodu niewystarczającej produkcji hemu, który jest niezbędny do zachowania prawidłowej pracy ETC. Przeprowadzając doświadczenie mające na celu odwrócenie fenotypu (*ang. rescue experiments*), polegające na suplementacji heminy w EC z wyciszonym PHGDH, udało nam się przywrócić funkcję ETC, zredukować apoptozę oraz odwrócić wady angiogenezy. Wyniki te ilustrują znaczenie syntezy seryny dla prawidłowej funkcji komórek śródbłonka (Vandekeere et al., 2018) (Zał. 4.II.A.15).

Gdy glutamina jest dostępna, komórki śródbłonka mogą ją również wykorzystywać do różnych procesów biologicznych. Na przykład, w celu wsparcia wzrostu komórek, syntezy białek, jak również w celu zmniejszenia stresu w siateczce śródplazmatycznej (*ang. endoplasmic reticulum, ER*), komórki śródbłonka poprzez konwersję azotu pochodzącego z glutaminy (i asparagianu) syntezują asparaginę. W procesie tym bierze udział syntetaza asparaginy (*ang. asparagine synthetase, ASNS*) (Huang et al., 2017) (Zał. 4.II.A.14). W serii doświadczeń zaobserwowaliśmy, że jeżeli glutamina zostanie usunięta z pożywki (*ang. cell medium*) lub glutaminaza (*ang. glutaminase 1 GLS1*; enzym przekształcający glutaminę w glutaminian) zostanie zahamowana, komórki śródbłonka redukują proliferację z powodu niewystarczającej ilości metabolitów cyklu Krebsa, żeby podtrzymać procesy biosyntezy makrocząsteczek. Ograniczona proliferacja w komórkach śródbłonka pozbawionych glutaminy może zostać przywrócona poprzez suplementację  $\alpha$ -KG (*ang.  $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG*) i asparaginy (Huang et al., 2017), co potwierdza, że zarówno źródła węgla, jak i azotu są ważne do podtrzymania podziału komórkowego w komórkach śródbłonka. W związku z tym, wzrost stresu w siateczce śródplazmatycznej wywołanego wyczerpaniem glutaminy może zostać złagodzony po podaniu  $\alpha$ -KG i asparaginy (Huang et al., 2017). Wyniki te wykazały nowy związek pomiędzy metabolizmem glutaminy i asparaginy w indukowaniu angiogenezy (Huang et al., 2017) (Zał. 4.II.A.14).

Syntetaza glutaminowa (*ang. glutamine synthetase, GS*) jest enzymem, który przekształca glutaminian i amoniak w glutaminę. Byliśmy w stanie wykazać, że w obecności fizjologicznych poziomów glutaminy, GS nie wspomaga produkcji glutaminy w komórkach śródbłonka, ale pełni ważną funkcję w kontroli ich migracji poprzez dotychczas nieopisaną interakcją z RhoJ (Eelen et al., 2018b) (Zał. 4.II.A.17). GS ulega palmitylacji i wchodzi w reakcje z RhoJ. W konsekwencji tego procesu, RhoJ jest aktywowane (również przez palmitylację) i migruje do błony komórkowej. Wyciszenie GS obniża lokalizację i aktywację RhoJ, podczas gdy inne GTPazy Rho są aktywowane, indukując w ten sposób włókna stresowe aktyny i utrudniając ruchliwość komórek śródbłonka (Eelen et al., 2018b) (Zał. 4.II.A.17). Wykorzystując genetyczny model myszy z wyciszonym GS specyficznie w komórkach śródbłonka ( $GS^{\Delta EC}$ ), potwierdziliśmy te obserwacje i wykazaliśmy zaburzone procesy indukcji angiogenezy i jej regulacji w trakcie rozwoju naczyń krwionośnych.

### c) Metabolizm limfatycznych komórek śródbłonka

Naczynia limfatyczne (*ang. lymphatic vessels, LV*), które zbudowane są z komórek śródbłonka chłonnego (*ang. lymphatic endothelial cells, LECs*), pełnią bardzo ważną funkcję w naszym organizmie, a ich dysfunkcja przyczynia się do różnych zaburzeń zdrowotnych (Kałucka et al.,

2017b) (Załącznik 4.II.A.22). Rola i funkcja metabolizmu LEC nie jest w pełni poznana. Podczas pracy w zespole Prof. dr Petera Carmelieta uczestniczyłam również w projekcie, którego celem było zbadanie metabolizmu komórek limfatycznych śródbłonka. Odkryliśmy, że komórki te potrzebują  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych do podtrzymania takich procesów jak: podział komórkowy, migracji i limfangiogenezy. Wytworzone przez FAO acetylo-CoA, pełni ważną funkcję w procesie różnicowania się BEC (*ang. blood endothelial cells*) do LEC ponieważ jest ono wykorzystywane do acetylacji histonów w rejonach genów odpowiedzialnych za limfangiogenezę, co indukuje ich ekspresję (np. *VEGFR3, Vascular endothelial growth factor receptor 3*). Suplementacja octanu (który może być przekształcony do acetylo-CoA) ratuje defekt tego typu angiogenezy spowodowany zahamowaniem FAO przez wyciszenie CPT1A, podkreślając znaczenie acetylo-CoA w biologii LV. Rodzi to pytania, czy suplementacja diety metabolitami może wspierać obecne strategie terapeutyczne mające na celu złagodzenie objawów chorób naczyniowych? (Wong et al., 2017) (Załącznik 4.II.A.12).

### Nabyte umiejętności

Jako interdyscyplinarny pracownik naukowy z ponad 10-letnim doświadczeniem, rozwinęłam i poszerzyłam swoje zainteresowanie do opracowania nowych koncepcji fundamentalnej biologii i samodzielnego opracowywania pomysłów badawczych. Pracowałam w międzynarodowych ośrodkach badawczych, w 4 krajach, co pozwoliło mi poznać różnorodne i prężne środowiska naukowe. Umiejętności, które zdobyłam, często wykraczały poza moją działalnością badawczą (<25 recenzowanych prac, w tym 6 jako pierwszy (współ)autor) i zdobyłam pozycję eksperta w zakresie różnych nowoczesnych rozwiązań badawczych. Ponadto wielokrotnie zapraszano mnie do wygłoszenia wykładów na międzynarodowych konferencjach i seminariach (wyszczególnione w Załączniku 4.II.L).

Cenne doświadczenie w tworzeniu jednostki badawczej zdobyłam pracując w nowo utworzonych grupach badawczych Prof. dr B. Wielockxa (Uniwersytet Techniczny w Dreźnie) i Dr. Alexandra Weidemanna (Klinika w Erlangen). W pracowni Prof. dr Petera Carmelieta prowadzę obecnie własną małą grupę badawczą składającą się z trzech doktorantów, nad którymi na co dzień sprawuję opiekę mentorską. Ponadto samodzielnie napisałam i otrzymałam granty badawcze, np. prestiżowe stypendium podoktorskie FWO przyznane przez Belgijską Organizację Badawczą czy ELAN-Programm. Ostatnio zostałam koordynatorem naukowym międzynarodowego projektu, którego celem jest stworzenie atlasu mysich komórek śródbłonka przy użyciu technologii sekwencjonowania RNA z pojedynczych komórek (*ang. single-cell sequencing, scRNA-seq*). W ramach tego projektu odpowiadam za wykonanie naukowe, analizę danych, interpretację i publikację uzyskanych wyników. Doświadczenie to wiąże się ze współpracą z naukowcami z Instytutu Genetyki w Pekinie (Chiny) i Uniwersytetu w Aarhus (Dania), co dodatkowo poszerza moje umiejętności w realizacji i zarządzaniu grantami naukowymi.

Podsumowując, w przeciągu ostatnich lat dokonałam i przyczyniłam się do nowatorskich odkryć związanych z procesem niedotlenienia i biologii komórek śródbłonka (popartych licznymi publikacjami), opanowałam różnorodne i istotne techniki analityczne i zdobyłam doświadczenia

związane z koordynowaniem dużymi, międzynarodowymi grantami, jak również kierowaniem zespołami młodych naukowców.

### **Przyszłe kierunki działania**

Otyłość jest ogromnym i narastającym problemem zdrowotnym na całym świecie. Podczas wzrostu tkanki tłuszczowej w organizmie człowieka, zaburzenia budowy nowych naczyń krwionośnych sprzyjają hipoksji i stanom zapalnym, zwiększając występowanie zaburzeń metabolicznych związanych z otyłością. Dlatego też wadliwe działanie naczyń krwionośnych stało się klinicznie uznane za przypadłość zagrażającą życiu człowieka. Komórki śródbłonka są wyposażone w całe niezbędne uzbrojenie, aby mogły działać jako półprofesjonalne komórki prezentujące antygeny, wspomagając odpowiedź immunologiczną w stanach zapalnych w nowotworach niezłośliwych. Jednak dysfunkcyjne komórki śródbłonka mogą różnić się od NEC pod względem właściwości immunomodulacyjnych i w zależności od mikrośrodowiska i mogą posiadać zdolność do kontrolowania reakcji immunologicznej i przyspieszania rozwoju choroby. Wstępne dane uzyskane podczas moich badań po doktoracie wykazały, że (podzbiory) angiogenicznych komórek śródbłonka są nie tylko niestabilne genomowo (co może prowadzić do prezentacji neoantygenów), ale także zwiększają aktywację cząsteczek co-inhibitorowych, kontrolując w ten sposób aktywację komórek T. Biorąc pod uwagę narastającą potrzebę zrozumienia heterogeniczności komórek śródbłonka, przy wykorzystaniu interdyscyplinarnego podejścia (scRNA-seq, proteomika, metabolomika oraz techniki biologii molekularnej i komórkowej), planuję wykonać badania, w jaki sposób komórki śródbłonka tkanki tłuszczowej uzyskiwane od otyłych pacjentów mogą modulować reakcje immunologiczne. Ostatecznym celem jest znalezienie sposobu na zmniejszenie ryzyka dysfunkcji narządów wywołanych otyłością, np. poprzez hamowanie mechanizmów zapalnych. W przyszłości planuję realizację i rozwijanie zakresu wyżej omówionych badań poprzez aplikowanie o nowe granty umożliwiające współpracę i powrót do Polski oraz utworzenie nowej grupy/pracowni badawczej.

## 5. WSKAŹNIK DOKONAŃ NAUKOWYCH

Suma punktów za publikacje, według komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 9 grudnia 2016 roku: **1180**

- Sumaryczny impact factor publikacji naukowych zgodnie z rokiem opublikowania: **324,909**
- Indeks Hirscha obliczony na podstawie bazy Web of Science: **14**
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **517**; z pominięciem autocytowań: **487**

Zestawienie dorobku naukowego z podziałem na poszczególne formy aktywności, przedstawiłam w Tabeli 1.

**Tabela 1. Podsumowanie osiągnięć naukowych**

	Ilość	IF	Punkty MNiSzW	Liczba cytowań
<i>Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora</i>				
Prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR)	2	18,414	95	68
Prace oryginalne spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	-	-	-	-
Prace przeglądowe z listy Journal Citation Reports (JCR)	-	-	-	-
Prace przeglądowe spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	-	-	-	-
Rozdziały w książkach	-	-	-	-
Zgłoszenia patentowe	-	-	-	-
Komunikaty naukowe przedstawione w formie prezentacji ustnej na konferencjach krajowych i międzynarodowych	4 2	-	-	-
Komunikaty naukowe przedstawione w formie posterów na konferencjach krajowych i międzynarodowych	8	-	-	-
<b>Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	<b>16</b>	<b>18,414</b>	<b>95</b>	<b>68</b>
<i>Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora</i>				
Prace oryginalne z listy Journal Citation Reports (JCR)	20	268,813	850	385
Prace oryginalne spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	-	-	-	-
Prace przeglądowe z listy Journal Citation Reports (JCR)	6	37,682	235	64
Prace przeglądowe spoza listy JCR, uwzględnione w wykazie MNiSW	-	-	-	-
Rozdziały w książkach	2	-	-	-
Zgłoszenia patentowe	-	-	-	-
Komunikaty naukowe przedstawione w formie prezentacji ustnej na konferencjach krajowych i międzynarodowych	- 3	-	-	-
Komunikaty naukowe przedstawione w formie posterów ustnej na konferencjach krajowych i międzynarodowych	20	-	-	-
<b>Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	<b>51</b>	<b>306,495</b>	<b>1085</b>	<b>449</b>
<b>Ogółem</b>	<b>67</b>	<b>324,909</b>	<b>1180</b>	<b>517</b>