

AUTOREFERAT

Z WYKAZEM INNYCH OSIĄGNIĘĆ ZAWODOWYCH

dr Magdalena Staniszewska

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk

Wrocław, 25 lutego, 2015

I. Imię i nazwisko

Magdalena Staniszewska

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

2003	Doktor nauk biologicznych Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu rozprawa doktorska pt. „Badanie właściwości biologicznych produktów glikacji białek” <i>rozprawa doktorska wyróżniona przez Radę Naukową IITD PAN</i> promotor: Prof. dr hab. Andrzej Gamian
1998	Magister inżynier, kierunek biotechnologia, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska rozprawa magisterska pt. „Izolacja i charakterystyka biochemiczna fimbrii <i>Klebsiella pneumoniae</i> i <i>Klebsiella oxytoca</i> ” promotor: Prof. dr hab. Andrzej Gamian

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2014 - dotąd	Adiunkt Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polska Akademia Nauk Wrocław
2011 - 2014	Research Associate/ Sr. Research Technologist Ocular Genomics Institute Massachusetts Eye and Ear Infirmary Department of Ophthalmology Harvard Medical School Boston, MA, USA
2007- 2011	Research Associate Schepens Eye Research Institute Department of Ophthalmology Harvard Medical School Boston, MA, USA
2003 - 2007	Research Associate Department of Ophthalmology Case Western Reserve University Cleveland, OH, USA
1998 - 2003	Asystent Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polska Akademia Nauk Wrocław

1998

Laborant

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk
Wrocław

IV. 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 /artystycznego

Zgodnie z treścią w/w ustawy, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, osiągnięciem naukowym jest cykl powiązanych tematycznie prac objętych wspólnym tytułem:

“Udział glikacji i kinureninacji białek w powikłaniach cukrzycowych oraz procesach starzenia”

B. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

- 1) **Staniszewska M**, Jarosz S, Jon M, Gamian A, Advanced glycation end-products prepared in solution under high pressure contain epitopes distinct from those formed in the dry reaction at high temperature,

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005; 53(1):71-8.

IF¹ 1,0; MNiSW² 8; LC³ 1

Indywidualny wkład w autorstwo: 85 %, wiodący udział w planowaniu zadań obejmujący zakres pracy jako kierownik projektu badawczego, wykonanie preparatów zaawansowanej glikacji białek w warunkach wysokiej temperatury, uzyskanie surowic w tym immunizacja zwierząt, wykonanie testów immunochemicznych oraz analitycznych w celu określenia składu cukrowego i aminokwasowego, przygotowanie preparatów do analizy masowej, a także interpretacja wyników oraz przygotowanie i korekta manuskryptu

- 2) **Staniszewska M**, Leszek J, Malyszczak K, Gamian A, Are advanced glycation end-products specific biomarkers for Alzheimer's disease?

Int J Geriatr Psychiatry. 2005; 20(9):896-7.

IF 2,16; MNiSW 11; LC 0

Indywidualny wkład w autorstwo: 70 %, wiodący udział w planowaniu i wykonaniu doświadczeń, w tym opracowanie testów do analizy ilościowej poziomu produktów glikacji białek, autoprzeciwciał oraz kompleksów immunologicznych. Wymienione testy są podstawą zgłoszenia patentowego, którego jestem współautorem. Moją wkład polegał również na analizie i interpretacji wyników.

¹ Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania

² Liczba punktów według MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania

³ Liczba cytowań (bez autocytaowań), według bazy *Web of Science Core Collection*, stan na dzień 23.02.2015 r

- 3) **Staniszewska MM**, Nagaraj HR, Upregulation of glyoxalase I fails to normalize methylglyoxal levels: A possible mechanism for biochemical changes in diabetic mouse lenses,
Mol Cell Biochem. 2006; 288(1- 2):29-36.
IF 1,862; MNiSW 15; LC 16
Indywidualny wkład w autorstwo: 85 %, wiodący udział w planowaniu i wykonaniu doświadczeń, w tym hodowle tkankowe ex vivo, analiza immunochemiczna, enzymatyczna i biochemiczna oraz QPCR. Mój wkład polegał również na analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu i korekcie manuskryptu.
- 4) **Staniszewska MM**, Nagaraj RH, 3-hydroxykynurenine-mediated modification of human lens proteins: structure determination of a major modification using a monoclonal antibody,
J Biol Chem. 2005; 10;280(23):22154-64.
IF 5,854; MNiSW 18; LC 9
Indywidualny wkład w autorstwo: 85 %, wiodący udział w planowaniu oraz wykonaniu doświadczeń obejmujących ekstrakcje białek oraz niskocząsteczkowych substancji z ludzkich soczewek oka, syntezę chemiczną i oczyszczanie formylokinureniny, przygotowanie preparatów białkowych oraz aminokwasowych przez modyfikowanie za pomocą kinurenin, opracowanie metodyki HPLC i oczyszczanie niskocząsteczkowych związków modyfikowanych kinureninami, analizy spektrofotometryczne i spektroskopowe (ustalenie metodyki wykonania widm NMR), analizy immunochemiczne (ELISA, immunobloting), hodowla ludzkich komórek nabłonkowych wyizolowanych z soczewki oka oraz analiza immunofluorescencyjna, pomiary stężenia tryptofanu za pomocą HPLC. Ponadto miałam również wiodący udział w interpretacji wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz korekcie manuskryptu.
- 5) **Staniszewska M**, Nagaraj RH, Detection of kynurenine modifications in proteins using a monoclonal antibody,
J Immunol Methods. 2007; 324: 63-73.
IF 1,947; MNiSW 20; LC 4
Indywidualny wkład w autorstwo: 85 %, wiodący udział w zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz interpretacji wyników jako kierownik projektu badawczego sponsorowanego przez fundację Alcon/Fight for Sight. Eksperymenty obejmowały ekstrakcje białek z ludzkich soczewek oka, przygotowanie preparatów białkowych oraz aminokwasowych przez modyfikowanie za pomocą kinurenin, produkcję i oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych (przygotowanie antygeny do immunizacji, immunizacja myszy, analiza surowicy, izolacja limfocytów; produkcja, hodowla, identyfikacja i izolacja wybranych klonów komórek hybrydowych), opracowanie metodyki i oczyszczanie niskocząsteczkowych związków modyfikowanych kinureninami za pomocą HPLC, analizy spektrofotometryczne i spektroskopowe (ustalenie metodyki wykonania widm NMR), analizy immunochemiczne (ELISA, immunobloting), hodowle ludzkich komórek nabłonkowych wyizolowanych z soczewki oka oraz analiza immunofluorescencyjna. Dodatkowo miałam również wiodący udział w pisaniu manuskryptu i graficzne przygotowanie pracy do druku.
- 6) Mailankot M, **Staniszewska MM**, Butler H, Caprara MH, Howell S, Wang B, Doller C, Reneker LW, Nagaraj RH, Indoleamine 2,3-dioxygenase overexpression causes

kynurenine-modification of proteins, fiber cell apoptosis and cataract formation in the mouse lens,

Lab Inves. 2009; 89: 498-512.

IF 4,602; MNiSW 32; LC 5

Indywidualny wkład w autorstwo: 50 %, wiodący udział w zaplanowaniu, opracowaniu metodyki i wykonaniu znacznej części eksperymentów, w tym wygenerowaniu modelu mysiego (koordynowanie pracy kilku zespołów technicznych uczestniczących w tworzeniu modelu mysiego i genotypowania), opracowaniu metody analitycznej opartej na HPLC oraz pomiar aktywności enzymatycznej IDO, produkcję monoklonalnych przeciwciał anty-kinureninowych, opracowanie metod immunochemicznych do pomiaru produktów modyfikacji białek w soczewce oka, prowadzenie hodowli ludzkich komórek nabłonkowych wyizolowanych z soczewki oka oraz ich analiza po stymulacji kinureninami. Ponadto, jako inicjator i kierownik projektu pełniłam funkcję opiekuna naukowego pierwszego autora oraz szkoliłam go w zakresie wymienionych technik. Dodatkowo, miałam znaczący udział w interpretacji wyników oraz końcowym opracowaniu manuskryptu

C. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/pracach i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna stanowi cykl sześciu prac oryginalnych (Załącznik 1a/II) poświęconych niektórym aspektom nieenzymatycznej modyfikacji białek, będących wynikiem starzenia oraz cukrzycy. Moje badania skupiają się na poznaniu nowych mechanizmów oraz zależności pomiędzy glikacją i kinureninacją białek oraz ich roli w chorobie Alzheimera, cukrzycy i katarakcie. W badaniach wykorzystano wiele modeli, w tym tworzenie modelowych produktów *in vitro* z użyciem komercyjnie dostępnych białek a także soczewkę oka, gdzie procesy glikacji i kinureninacji zachodzące *in vivo* są szczególnie nasilone z powodu warunków sprzyjających ich tworzeniu i akumulacji, takich jak wysokie stężenie i długi okres półtrwania krystalin – białek strukturalnych soczewki, wysokie stężenie niektórych substratów glikacji i kinureninacji oraz zagrożenie stresem oksydacyjnym wywołanym między innymi działaniem promieni UV.

Glikacja białek

Nieenzymatyczne reakcje przyłączenia grupy ketonowej lub aldehydowej cukrów lub ich pochodnych do wolnej grupy aminowej białka, lipidu lub kwasu nukleinowego nazywamy ogólnie glikacją. Reakcje te zachodzą w warunkach naturalnych *in vivo* czy *in vitro*⁴ jak również w warunkach podwyższonego ciśnienia lub temperatury, np. podczas procesów przetwarzania żywności⁵.

Louis Camille Maillard był pierwszym, który w 1912 roku opisał ten typ reakcji. Jest to wieloetapowy, spontaniczny proces, w którym boczny łańcuch lizyny, argininy czy N-końcowa grupa aminowa białka reaguje z redukującym cukrem, tworząc zasadę Schiffa (aldimina). Spontaniczne przegrupowanie aldiminy prowadzi do powstania produktu Amadoriego – bardziej stabilnej 1-amino-1-deoxy-2-ketozy. Utworzona fruktozylamina uważana jest za wczesny produkt glikacji, który następnie ulega wielu dodatkowym

⁴ Monnier VM, Cerami A (1981) Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211:491–493

⁵ Uribari J, Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet, *J Am Diet Assoc.* 2010; 110:911-916;

modyfikacjom: dehydratacji, fragmentacji, kondensacji, utlenieniu czy cyklizacji, prowadząc do wytworzenia produktów zaawansowanej glikacji (AGE). Podczas tych skomplikowanych szlaków, reaktywne produkty pośrednie wielokrotnie biorą udział w następnych reakcjach. W obecności tlenu, glukoza i produkty Amadoriego mogą być rozkładane do wysoce reaktywnych 1- i 3-deoksykarbonyli, takich jak metyloglioksal, glioksal, 3-deoksyglukozon⁶, tworzących szereg pochodnych, sieciujących AGE oraz wolnych rodników przyczyniających się do stresu oksydacyjnego związanego z glikacją. Dlatego reakcje te określa się także mianem „glikooksydacji”.

Duże zróżnicowanie strukturalne AGE związane jest z warunkami w jakich się tworzą, np. stężenie produktów, temperatura, ciśnienie, pH czy czas trwania reakcji. Wieloetapowy proces glikacji obejmuje różnorodny węglowodany, takie jak cukry, dikarbonyle (metyloglioksal, glioksal, 3-deoksyglukozon), produkty utlenienia kwasu askorbinowego, kwasów tłuszczowych, czy cząsteczki posiadające wolne grupy aminowe, włączając lizynę, argininę na białkach czy guanozynę w kwasach nukleinowych. Różnorodność produktów glikacji wynika również z faktu, że jeden węglowodan może być prekursorem wielu pochodnych podczas glikooksydacji czy wywołanej przez UV degradacji, generując wiele różnych produktów AGE podczas jednej reakcji. Z tego powodu wydajność poszczególnych produktów jest niska, co utrudnia odkrycie nowych struktur i szlaków ich powstawania. Pomimo dostępnej technologii zostało określonych tylko 17 różnych struktur AGE, łącznie z pentozydą, N ϵ -karboxymetylolizyną (CML), glukozepanem, piraliną oraz K2P tworzącym się w soczewce oka⁷. Niektóre z tych produktów mogą być rozpuszczalne lub związane z białkami i wykazują różnorodne właściwości fizykochemiczne: fluorescencję, absorpcję czy wrażliwość na światło. Dalsze badania są nadal konieczne do pełnego poznania struktur i mechanizmów tworzenia AGE.

Generalnie nadmierna glikacja negatywnie wpływa na procesy zachodzące w żywej komórce, zmieniając właściwości strukturalne i funkcje białek, wywołując agregację i oporność na trawienie enzymami czy też aktywując szereg szlaków metabolicznych poprzez oddziaływanie z receptorami komórkowymi. Istnieje wiele receptorów wiążących AGE⁸, ale opisanie ich funkcji jest trudne ze względu na niestabilność produktów glikacji oraz istniejące koreceptory. Najlepiej poznanym receptorem jest AGER1. Jest to transmembranowe białko występujące na powierzchni komórki, w membranach endoplazmatycznych oraz mitochondrialnych różnych komórek, najlepiej opisane w limfocytach. Dzięki właściwościom internalizowania, AGER1 usuwa produkty glikacji i kontroluje poziom stresu oksydacyjnego w komórce, a jego ekspresja uzależniona jest od poziomu AGE.

Innym receptorem wiążącym AGE jest RAGE⁹, który wykazuje powinowactwo również do innych ligandów. Aktywacja receptora związanego z błoną komórkową indukuje szereg szlaków sygnałowych prowadzących do tworzenia wolnych rodników czy procesów zapalnych, podczas gdy rozpuszczalna forma receptora odgrywa znaczenie w usuwaniu AGE.

Dodatkowo, istnieje wiele innych receptorów wiążących produkty glikacji, jednak ich rola jest mniej poznana. Receptory te wykazują niskie powinowactwo do AGE, a ich pierwszorzędownymi ligandami są inne cząsteczki, przez co badanie ich właściwości jest

⁶ Thornalley PJ et al, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, *Biochemical Journal* (1999) 344, 109–116;

⁷ Nagaraj RH et al, The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye, *Amino Acids* (2012) 42:1205–1220;

⁸ Vlassara H, The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications, *Diabetes Metab Res Rev* 17 (2001) 436–443;

⁹ Xie J et al, Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE), *Cellular Signalling* 25 (2013) 2185–2197;

utrudnione. Nie powinno się także zapominać, że podobnie jak inne wolne rodniki tlenowe, produkty AGE mogą brać udział w szlakach sygnałowych, wykorzystujących AGE-niezależne receptory, np. tzw. receptory zmiatające (scavenger receptors), związane z białkiem G (G-protein-coupled receptors), Toll-podobne (toll-like receptors), czy też mogą zmieniać właściwości komórek w sposób niezależny od receptorów.

Badania pokazują, że AGE powstałe z różnorodnych prekursorów odgrywają rolę w wielu schorzeniach, np. w powikłaniach cukrzycowych¹⁰, chorobie Alzheimera¹¹, procesach zapalnych oraz chorobach oczu związanych ze starzeniem organizmu, jak jaskra, AMD (związane z wiekiem zwyrodnienie plamki żółtej) czy zaćma⁵.

Poziom AGE powstających *in vivo* jako produkt uboczny glikolizy jest ściśle regulowany, ale w przypadku hiperglikemii, hiperlipidemii czy podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do akumulacji produktów glikacji. W wyniku starzenia mechanizmy obronne i regeneracyjne ulegają osłabieniu, co ułatwia akumulację AGE. Ostatnio dowiedziono, że zwiększona konsumpcja żywności wysoko przetworzonej stanowi dodatkowe źródło AGE oraz glikotoksyn (reaktywne produkty glikacji). Związki te powstają podczas grillowania, pieczenia i smażenia produktów, co podnosi walory smakowe i kolorystyczne potraw.

Cukrzyca i hiperglikemia sprzyjają tworzeniu się wczesnych produktów glikacji we krwi oraz gromadzących się w tkankach, wpływając na ich funkcje przez wywołanie chronicznego stanu zapalnego czy upośledzenie aktywności białek. Uważa się, że zwiększona oporność na insulinę, stan zapalny i osłabienie mechanizmów obronnych są przyczyną komplikacji cukrzycowych, np. nefropatii. Nerki, które są głównym miejscem usuwania z krążenia produktów utlenienia stanowią dogodny cel dla akumulacji efektów stresu oksydacyjnego wywołanego przez AGE¹⁰. Aktywacja RAGE przez metyloglioksal i wywołany proces zapalny predysponują do cukrzycowych zmian, gdzie reaktywne produkty glikacji filtrowane z krwi kumulują się w kłębuszkach nerkowych i u pacjentów z cukrzycą prowadzą do modyfikacji białek, zwłóknienia i hipertrofii. W rezultacie zmniejsza się zdolność filtracyjna nerek i dochodzi do kumulacji AGE w tkance.

Coraz więcej wyników wskazuje również, że glikacja związana jest z patogenezą choroby Alzheimera. Produkty AGE wykryto w splotach neurofibrylarnych oraz płytkach starczych w mózgu pacjentów. Badania zwierząt karmionych dietą z dużą zawartością metyloglioksalu sugerują, że AGE promują polimeryzację β -amyloidu i ekspresję prekursora amyloidu. Chronicznie podniesiony poziom AGE stymuluje produkcję neurotoksycznego RAGE i zmniejsza ilość receptorów odpowiedzialnych za usuwanie AGE (AGER1). Sugeruje się, że zmniejszona ekspozycja na przyjmowane z pożywieniem produkty glikacji może zachować obronne mechanizmy organizmu i zmiany metaboliczne w układzie nerwowym, a monitorowanie poziomu metyloglioksalu w surowicy może stanowić wczesny marker tych zmian.

Udział reakcji Maillarda w powikłaniach związanych ze starzeniem i cukrzycą są szeroko badane w soczewce oka⁷. Soczewka oka zbudowana jest z komórek włóknistych (fibre cells) i nabłonkowych (lens epithelial cells), które stanowią dogodny model do badania modyfikacji białek, zmian metabolicznych oraz mechanizmów zapobiegających skutkom nadmiernej glikacji. Komórki włókniste znajdujące się wewnątrz soczewki są unikalne. Nie posiadają one organelli, które zanikają podczas różnicowania oraz akumulują znaczne ilości rozpuszczalnych białek – głównie krystalin. Białka soczewki mają szczególnie długi okres

¹⁰ Vlassara H et al, Advanced glycation end products in diabetes and diabetic complications, *Endocrinol Metab Clin N Am* 42 (2013) 697–719;

¹¹ Li J et al, Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and prospective, *Journal of the Neurological Sciences* 317 (2012) 1–5;

półtrwania dlatego produkty glikacji i inne po-translacyjne modyfikacje gromadzą się w tkance. W odróżnieniu, komórki nabłonkowe tworzące pojedynczą warstwę zlokalizowane są w przedniej części soczewki. Są one aktywne metabolicznie i odpowiadają za utrzymanie homeostazy oraz zapewnienie ochrony komórkom włóknistym.

W warunkach sprzyjających powstawaniu stresu oksydacyjnego, jak cukrzyca czy starzenie się, w soczewce oka dochodzi do wielu zmian powodujących zmniejszenie jej przezroczystości i powstanie katarakty. W tym czasie białka ulegają sieciowaniu, stają się nierozpuszczalne i gromadzą się znaczne ilości pigmentu oraz związków o właściwościach fluorescencyjnych. Glikacja białek jest jednym z procesów, które wywołują te zmiany. W soczewce zidentyfikowano wiele produktów glikacji zarówno niskocząsteczkowych, jak też związanych z białkami, powodujących ich sieciowanie. Nagromadzenie się zabarwionych AGE nadaje ciemny kolor soczewkom w wyniku ich starzenia lub w katarakcie. Dzięki badaniu glikacji w soczewce oka udało się odkryć inne oprócz cukrów prekursorzy AGE, powstające przez degradację glukozy i produktów Amadoriego. Należy do nich wysoce reaktywny metyloglioksal, czy 3-deoksyglukozon występujące *in vivo*, a także askorbinian (witamina C), który w soczewce występuje w wysokim stężeniu, dochodzącym do kilku mM. Wykazano, że jest on prekursorem pentozydyny, karboksylometylolizyny i vesperlizyny A.

W soczewce oka ludzkiego wykryto ponad 100 produktów glikacji powstających z askorbinianu, choć dokładne struktury nie zostały jeszcze opisane. Dodatkowo, AGE wywodzące się z askorbinianu to związki światłouczulające, które w obecności tlenu produkują wolne rodniki tlenowe, zwiększając stres oksydacyjny tkanki i powodując dalsze modyfikacje białek w soczewkach osób starszych i w przypadku katarakty.

Mechanizmy obronne organizmu przeciwdziałające nadmiernej glikacji obejmują fagocytozę i degradację AGE z udziałem receptorów, opisaną wcześniej, mechanizmy komórkowe neutralizujące wolne rodniki tlenowe – ROS, np. zależne od glutationu peroksydazy lub bezpośrednio redukujące wolne rodniki (reakcja z GSH), jak też enzymatyczne metabolizowanie reaktywnych związków dikarbonylowych (system gliksylaz). Neutralizacja na drodze enzymów gliksylazowych (Gliksylaza I i II) jest bardzo efektywne w prawidłowych warunkach, jednak z wiekiem poziom GSH oraz ekspresja enzymu spada. Z tego powodu usuwanie reaktywnych dikarbonylowych pochodnych w komórce jest mało skuteczna, prowadzi do gromadzenia się metyloglioksalu (MGO) i tworzenia AGE.

Glikacja odgrywa znaczącą rolę w procesach starzenia i powikłaniach związanych z cukrzycą. Wzrost liczby cukrzyków jest alarmujący i dramatycznie się zwiększa. Badania wykonane w Kanadzie i Wielkiej Brytanii między 1996 a 2003 rokiem pokazały 50% wzrost liczby pacjentów z cukrzycą. Wraz z wydłużającą się długością życia, choroby towarzyszące starzeniu, jak choroby oczu czy nerek, stają się bardziej rozpowszechnione i negatywnie wpływają na stan zdrowia i jakość życia. Poszukiwanie efektywnych metod leczenia, hamujących i usuwających gromadzące się w organizmie AGE wymaga jeszcze rozszerzenia naszej wiedzy na temat mechanizmów powstawania produktów glikacji. Ważnym jest również zwrócenie uwagi na zewnętrzne źródła AGE, na co ostatnio zwrócono uwagę badając zawartość glikotoksyn w wysoce przetworzonej żywności. Różnorodność przyjmowanych z pokarmem AGE może być znacznie większa, niż produktów glikacji powstających wewnątrz organizmu. Efekty komórkowe wywołane przez te nowe produkty oraz metody zapobiegania niekorzystnym skutkom wymagają dalszych badań.

Moje badania dotyczące glikacji rozszerzyły naszą wiedzę na temat niekonwencjonalnych metod syntezy AGE, ich udziału w chorobie Alzheimera, a także komórkowego mechanizmu

obronnego zapobiegającego odkładaniu się i neutralizacji metyloglioksalu w soczewce oka. Najważniejsze i najbardziej interesujące wyniki zawarte w publikacjach dotyczących glikacji i przedstawionych do oceny dotyczą:

- tworzenia i właściwości strukturalnych produktów tworzonych pod wysokim ciśnieniem i w wysokiej temperaturze. Warunki takie używane są podczas przetwarzania żywności i zwiększają powstawanie AGE. Przyjmowane pokarmy zawierające wysoki poziom produktów glikacji stanowią główne źródło glikotoksyn i mogą wywoływać negatywne efekty w komórkach, w tym chroniczny stan zapalny. Z tego właśnie powodu niezwykle ważne jest poznanie właściwości oraz klinicznych skutków związanych z przyjmowanymi z jedzeniem produktami glikacji. Wyniki zawarte w przedstawionej do oceny **publikacji 1** (Załącznik 1a/II.IA.1) pokazują po raz pierwszy, że zwiększone ciśnienie indukuje powstawanie AGE o unikalnych właściwościach. Ważne jest określenie ich struktury i właściwości biologicznych w kontekście spożywanych produktów.
- obecności AGE w surowicy pacjentów z chorobą Alzheimerera (Załącznik 1a/II.IA.2). W **publikacji 2** przedstawiono wyniki badań krążących w surowicy AGE, autoprzeciwił oraz kompleksów immunologicznych z użyciem nowej metody, która następnie uzyskała patent międzynarodowy (punkt VII.b1).
- komórkowej obrony przeciwko AGE i roli systemu gliksylazy w detoksykacji prekursorów AGE, w tym akumulacji metyloglioksalu w tkankach, w warunkach hiperglikemii (**Publikacja 3**, Załącznik 1a/II.IA.4).

Kinureninacja

Kinureniny stanowią grupę produktów powstających z wolnego tryptofanu w enzymatycznym szlaku tworzenia się NAD. Etapem ograniczającym powstawanie kinurenin jest działanie enzymu indoloamino-2,3-dioxygenazy (IDO), który występuje w wielu tkankach i katalizuje reakcję utleniania tryptofanu do N-formylokinureniny. Produkty pośrednie takie jak N-formylokinurenina, kinurenina czy 3-hydroksykinurenina, powstające w szlaku kinureninowym, są niestabilne w fizjologicznym pH. Ulegają one deaminacji¹², przez co powstają α,β -nienasycone ketony reagujące z nukleofilowymi grupami aminokwasów, kowalencyjnie wiążące się z białkami. Wykazano, że szczególnie wysokie stężenie kinurenin występuje w soczewce oka, gdzie pełnią one rolę filtrów UV i chronią siatkówkę absorbując światło w zakresie 295-370 nm. Białka o długim okresie półtrwania, takie jak krystaliny w soczewce czy β -amyloid w mózgu narażone są na modyfikacje kinureninami, przez co zmodyfikowane białka gromadzą się w tych tkankach. Dodatkowo, kinureniny posiadające grupę hydroksylową mogą indukować wolne rodniki tlenowe (ROS) na drodze reakcji redukcji w obecności metali przejściowych. W konsekwencji dochodzi do sieciowania białek, co obserwujemy w katarakcie i podczas starzenia. Obecności kinurenin przypisuje się brązowienie starzejącej się soczewki oka. Wiele pochodnych kinureninowych zostało dotąd wyizolowanych z ludzkiej soczewki.

Powstające w organizmie produkty zmodyfikowane przez kinureniny nie ulegają rozkładowi. Mechanizmem obronnym chroniącym przed nadmierną kinureninacją jest GSH, który w zdrowej soczewce spontanicznie wiąże i tworzy GSH-kinureniny, chroniąc białka. Z wiekiem, kiedy zmniejsza się szybkość dyfuzji w soczewce, GSH nie dociera do jądra i nie może neutralizować reaktywnych pochodnych kinurenin. Dochodzi do modyfikacji białek, które stają się usieciowane, nierozpuszczalne i przybierają brązowy odcień.

¹² Taylor LM et al, Glutathione and NADH, but not Ascorbate, Protect Lens Proteins from Modification by UV Filters, *Exp Eye Res* (2002) 74(4):503-11.

Wcześniejsze badania prowadzone głównie przez grupę prof. Truscotta pokazały, że kinureniny reagują z białkami *in vitro* generując związki podobne do powstających w ludzkiej soczewce. Moje własne badania były prowadzone aby potwierdzić hipotezę, że gromadzenie się kinurenin w organizmie, wywołane nadprodukcją IDO, może prowadzić do kowalencyjnej modyfikacji białek *in vivo*. Te pionierskie badania wykazały znaczenie kinureninacji w patologii soczewki. Najważniejsze wyniki tych badań obejmują:

- identyfikację nowych, kinureninowych modyfikacji oraz ich udział w mechanizmie katarakty i zmianach starczych ludzkiej soczewki. Wyprodukowane przeciwciała monoklonalne rozpoznające związane z białkami kinureniny pozwoliły po raz pierwszy wykazać obecność pochodnych kinureninowych związanych z białkami soczewki (**Publikacja 4 i 5**, Załącznik 1a/II.IA.3, 5).
- stworzenie modelu zwierzęcego w celu zbadania cytotoksycznego wpływu kinurenin generowanych przez IDO w patologii soczewki oka (**Publikacja 6**, Załącznik 1a/II.IA.6). Zwierzęta u których występuje nadprodukcja enzymu, prowadząca do odkładania się kinurenin mogą być także wykorzystane do badań obejmujących mechanizm innych chorób związanych z kinureninacją białek.
- wykazanie po raz pierwszy cytotoksycznego wpływu kinurenin na soczewkę oka, który zaburza różnicowanie komórek włóknistych i prowadzi do ich apoptozy, co przedstawiono w **publikacji 6** (Załącznik 1a/II.IA.6).

Wyniki moich prac stanowiły podstawę i inspirację do kolejnych badań na temat roli kinurenin i IDO w biologii komórki, kontynuowanych następnie w laboratorium dr Nagaraja. Pokazały one szczegółowy mechanizm, w jakim kinureniny zaburzają różnicowanie komórek włóknistych, indukują apoptozę i prowadzą do powstania katarakty¹³. Mechanizm ten obejmuje zmniejszenie produkcji krystalin i MIP26 (ang. major intrinsic protein, inaczej aquaporin O) poprzez zaburzenie szlaku sygnałowego inicjowanego przez FGF2/FGFR1¹⁴.

Wyniki moich badań dotyczące zachodzącej *in vivo* kinureninacji białek soczewki zostały później wykorzystane do badania innych patologii wieku starczego, m. in. choroby Alzheimera. We współpracy z Prof. Markiem Smith z Departamentu Patologii CWRU wykazaliśmy, że w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera występuje większa ilość białek modyfikowanych 3-hydroksykinureniną, a w obrębie płytek starczych i włóknistych splotów, które są wskaźnikiem zmian chorobowych, podniesiona jest ekspresja IDO. Te dane (Załącznik 1a/II.IA.7) są pierwszym dowodem na to, że kinureninacja zaangażowana jest w degeneracyjne procesy występujące w chorobie Alzheimera. Udział kinurenin oraz IDO w neurodegeneracji przyciągnął uwagę badaczy innych neurologicznych schorzeń, takich jak choroba Parkinsona. Wolne, nie związane z białkami kinureniny były dotychczas traktowane głównie jako neurotoksyny mające wpływ na proces zapalny w mózgu, ale biorąc pod uwagę uzyskane przez mnie wyniki, możliwość modyfikacji białek z ich udziałem powinna być poważnie brana pod uwagę przy opracowywaniu nowych metod terapeutycznych.

Cykl sześciu prac przedstawionych do oceny opisuje pionierskie badania dotyczące nowych

¹³ Mailankot M and Nagaraj R, Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: Apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 1446–1454

¹⁴ Mailankot et al., Kynurenine inhibits fibroblast growth factor 2-mediated expression of crystallins and MIP26 in lens epithelial cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (2010) 609–620

mechanizmów modyfikacji białek przez cukry i produkty utlenienia tryptofanu. Glikacja i kinureninacja to procesy inicjowane pod wpływem niekontrolowanego stresu oksydacyjnego, który obserwuje się z wiekiem lub przy hiperglikemii. Oba procesy zachodzą spontanicznie i jednocześnie, dlatego istotne jest zbadanie ich wzajemnego wpływu na zmianę struktury czy funkcji białek. Dzięki temu możliwe będzie pełne poznanie udziału kinureninacji i glikacji w patologii. W przedstawionej do oceny **publikacji 4** (Załącznik 1a/II.IA.3) podjęto próbę wykazania wpływu glikacji na utlenienie tryptofanu. W doświadczeniu nie wykazano jednak wpływu glikacji białek z udziałem rybozy na modyfikację białek przez 3-hydroksykinureninę. Niemniej, wzajemny, modulacyjny wpływ glikacji i kinureninacji białek, został wykazany w kolejnej pracy (Załącznik 1a/II.IA.6). Na tej podstawie, dalsze badania prowadzone w laboratorium dr Nagaraj wyjaśniły dokładny mechanizm kinurenino-zależnego powstawania AGE¹⁵.

Rezultaty opisane w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie zostały podsumowane poniżej.

Publikacja 1

Staniszewska M, Jarosz S, Jon M, Gamian A, Advanced glycation end-products prepared in solution under high pressure contain epitopes distinct from those formed in the dry reaction at high temperature, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005, 53(1):71-8.

Glikacja zwykle odnosi się do reakcji redukujących cukrów z wolnymi grupami aminowymi białek, zachodzących spontanicznie w fizjologicznych warunkach, która w wieloetapowym procesie prowadzi do utworzenia produktów zaawansowanej glikacji (ang. advanced glycation end-products, AGE). Reakcje przyspiesza wysoka temperatura, dlatego obecna dieta, obfitująca w wysoce przetworzoną żywność bogata jest także w różnorodne AGE. Odkładaniu się produktów glikacji w organizmie przypisywane są patologiczne zmiany związane ze starzeniem czy hiperglikemia.

Generalnie przyjmuje się, że AGE stanowią heterogenną grupę produktów i tylko niewielki procent został scharakteryzowany pod względem strukturalnym. Moim celem było porównanie właściwości strukturalnych produktów powstałych w różnych warunkach, np. wysokiej temperatury (produkty HTG) i ciśnienia (produkty HPG). W tym celu zostały użyte modelowe białka – albumina surowicy wołowej i mioglobina, które inkubowano z różnymi cukrami. Kontrolnie poddano glikacji białka w warunkach zbliżonych do fizjologicznych – w roztworze w temperaturze 37°C. Na uwagę zasługuje obserwacja, że produkty powstałe w warunkach naturalnych, HTG (w temp. do 120°C) i HPG (pod ciśnieniem 860 MPa) znacznie różniły się stopniem usieciowania, zawartością przyłączonych cukrów do wolnych grup aminowych czy właściwościami fluorescencyjnymi. Co ważniejsze, produkty z różnych warunków syntezy wykazywały odmienne właściwości antygenowe, co sugeruje, że mogą one wywierać inne efekty w organizmie. Badania właściwości biologicznych różnych AGE są niezmiernie ważne do kompleksowego poznania patologicznych efektów związanych z glikacją. Wykazaliśmy także, że przeciwciała powstałe z wykorzystaniem AGE utworzonych w niekonwencjonalnych warunkach mogą służyć do różnicowania produktów glikacji. Niniejsze testy stanowią podstawę do identyfikacji i kolejnych badań patogennych właściwości AGE pochodzących z pokarmu i powstających w organizmie.

¹⁵ Linetsky M et al., UVA Light-excited Kynurenines Oxidize Ascorbate and Modify Lens Proteins through the Formation of Advanced Glycation End Products, *J. Biol. Chem.* (2014) 289:17111-17123

Publikacja 2

Staniszewska M, Leszek J, Malyszczak K, Gamian A, Are advanced glycation end-products specific biomarkers for Alzheimer's disease? *Int J Geriatr Psychiatry*. 2005, 20(9):896-7.

Choroba Alzheimera (AD) to najczęstsza forma choroby otępiennej czyli demencji. Starszy wiek jest największym czynnikiem ryzyka, ale nie są dostępne żadne metody zapobiegające chorobie. Poszukuje się markerów biochemicznych, które pozwoliłyby na monitorowanie postępu choroby. Rozważa się użycie AGE (związanych z patogenezą choroby Alzheimera) jako biomarkerów, ale ich detekcja i pomiar stanowi wyzwanie z powodu dużej heterogenności, niskiego stężenia indywidualnych produktów glikacji i braku łatwo dostępnych metod analizy.

Metody analityczne oparte są na kosztownych i zaawansowanych metodach chromatograficznych, np. HPLC, które mogą służyć do detekcji konkretnych, scharakteryzowanych produktów AGE. W niniejszych badaniach użyto unikalnych i nowatorskich metod wykrywających markery glikacji obecne w surowicy pacjentów z AD. Podjęto próbę sprawdzenia czy AGE, przeciwciała anty-AGE i kompleksy immunologiczne mogą być użyte jako markery choroby. W **publikacji 2** (Załącznik 1a/II.IA.2) pokazano działanie serii testów immunochemicznych wykorzystujących modelowe produkty glikacji oraz wykrywające je przeciwciała. Stworzone przeze mnie narzędzia do pomiaru biomarkerów glikacji uzyskały międzynarodową ochronę patentową (punkt VIII.1).

Wcześniejsze doniesienia dotyczące znaczenia ogólnoustrojowego procesu glikacji w AD były bardzo znikome. W jednym z tych badań, gdzie za pomocą pomiaru fluorescencji określono poziom AGE, wykazano zmniejszony poziom glikacji w surowicy pacjentów z AD¹⁶. W przedstawionej do oceny publikacji oprócz produktów AGE oznaczono także autoprzeciwciała i kompleksy immunologiczne przez analogię do chorych na cukrzycę, u których zaobserwowano powstawanie autoprzeciwciał skierowanych na AGE¹⁷. Używając trzech komplementarnych testów porównano poziom glikacji w surowicy pacjentów z chorobą Alzheimera (AD), innym rodzajem demencji, naczyniowej (VaD) oraz u zdrowych ochotników (C).

Wyniki naszych doświadczeń wykorzystujących metody immunochemiczne były zgodne z poprzednimi doniesieniami pokazując, że poziom krążących AGE, autoprzeciwciał IgG oraz kompleksów immunologicznych był niższy u pacjentów z AD w porównaniu z innymi grupami. Również poziom autoprzeciwciał klasy IgM był obniżony w grupie AD w porównaniu z grupą C i taki sam trend został zachowany dla porównania z grupą VaD. Taki wynik sugeruje, że to raczej lokalny, a nie ogólnoustrojowy proces glikacji odgrywa rolę w patologii AD, o czym także świadczy kumulacja różnych produktów glikacji w mózgu pacjentów z AD¹⁸. Z drugiej jednak strony obserwowaliśmy podwyższony poziom autoprzeciwciał klasy IgM u pacjentów z AD i VaD w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazuje na aktywny proces immunoreaktywności związany z demencją.

Podsumowując, moje badania doprowadziły do powstania nowej immunochemicznej metody określania statusu glikacji, a opracowany test uzyskał ochronę patentową. Używając wspomnianych metod wykazaliśmy negatywną korelację AGE w surowicy, wskazującą na

¹⁶ Thome J et al, Advanced Glycation Endproducts associated Parameters In The Peripheral Blood Of Patients With Alzheimer's Disease, *Life Sciences* (1996) Vol.59, No.8:679-685

¹⁷ Nicoloff, G et al, Antibodies to advanced glycation end products in children with diabetes mellitus. *Vascul. Pharmacol.* (2002) 39, 39-45

¹⁸ Horie K et al., Immunohistochemical Localization of Advanced Glycation End Products, Pentosidine, and Carboxymethyllysine in Lipofuscin Pigments of Alzheimer's Disease and Aged Neurons, *Biochim Biophys Res Comm* (1996) 236, 327-332

znaczenie lokalnego procesu glikacji u pacjentów z AD. Ukierunkowuje to dalsze badania na wyjaśnienie procesu toczącego się w komórkach neuronowych i glejowych prowadzącego do choroby.

Publikacja 3

Staniszewska MM, Nagaraj HR, Upregulation of glyoxalase I fails to normalize methylglyoxal levels: A possible mechanism for biochemical changes in diabetic mouse lenses, *Mol Cell Biochem.* 2006, 288(1- 2):29-36.

Możliwość neutralizowania lub usuwania toksycznych produktów glikacji z komórek i tkanek mogłaby przyczynić się do zahamowania dysfunkcji związanych z powikłaniami cukrzycowymi czy chorobami neurodegeneracyjnymi. W zakresie mojego zainteresowania znalazł się system glioksyłazowy degradujący metyloglioksal i możliwość jego zastosowania w terapii. Przedstawiona publikacja opisuje badania dotyczące metabolizmu metyloglioksalu (MGO) w soczewce oka.

Wewnątrzkomórkowy substrat glikacji – MGO powstaje spontanicznie z fosfotrioz lub jako produkt uboczny glikolizy¹⁹. Szybkość tworzenia MGO zależy od tkanki i statusu metabolicznego komórki, jednak wiadomo, że hiperglikemia przyczynia się do nadmiernej akumulacji MGO. Mechanizmem obronnym komórki jest enzymatyczny szlak glioksyłazowy. Pierwszym enzymem w tym szlaku jest Glioksyłaza I (GLOI), która z użyciem glutationu (GSH) jako kofaktora metabolizuje MGO do D-mleczanu.

Nowością w przedstawionej pracy jest opisanie roli GLOI w metabolizmie MGO w żywej soczewce podczas hiperglikemii na modelu zwierzęcym, co w porównaniu do badań *in vitro* znacznie dokładniej mimikuje naturalne warunki. W celu wszechstronnego zbadania problemu posłużyliśmy się metodami biochemicznymi i oznaczaliśmy poziom ekspresji GLOI (QPCR), aktywność enzymu (pomiar absorpcji tworzonego w reakcji S-laktoglutationu), dostępność GSH (test kolorymetryczny oparty na reakcji z DTNB) oraz gromadzenie MGO (pomiar fluorescencyjnego produktu reakcji z 6-hydroksy-2,4,5-triaminopyrimidyną (TRI) za pomocą HPLC) w hodowanych mysich komórkach nabłonkowych soczewki oraz całych soczewkach traktowanych medium o wysokim stężeniu glukozy lub pochodzących od myszy z wywołaną cukrzycą. Zaobserwowaliśmy, że w cukrzycy była znacznie podniesiona ekspresja GLOI, ale nie notowano obniżenia stężenia MGO, który był znacznie podwyższony w porównaniu z kontrolnymi soczewkami pochodzącymi od zdrowych myszy. Wbrew oczekowaniom wykazaliśmy, że efekt ten nie był wynikiem obniżonego poziomu GSH, który sprawdzaliśmy w soczewkach hodowanych *ex vivo*. Doświadczenia na hodowanych komórkach potwierdziły hipotezę, że szybkość tworzenia MGO przewyższa możliwość metabolizmu przez GLOI.

Jest to pierwsze doniesienie pokazujące, że znaczny wzrost aktywności GLOI wywołany przez cukrzycę jest niewystarczający aby pozbyć się powstających toksycznych metabolitów glukozy. W ludzkiej soczewce, z niskim poziomem reduktazy aldozowej (inny enzym metabolizujący MGO) może to promować modyfikację białek i prowadzić do katarakty. Początkowo GLOI wydawała się dobrym celem terapeutycznym, jednak kolejne badania pokazały modulacyjną rolę GLOI w regulowaniu poziomu MGO w soczewce, a z drugiej strony GLOI promowała tworzenie innych AGE z cukrowych substratów. Te wyniki dowodzą, że należy zachować szczególną ostrożność w rozważaniach nad terapeutycznym

¹⁹ Sousa Silva et al., The glyoxalase pathway: the first hundred years . . . and beyond, *Biochem. J.* (2013) 453, 1–15

zastosowaniem GLOI.

Publikacja 4

Staniszewska MM, Nagaraj RH, 3-hydroxykynurenine-mediated modification of human lens proteins: structure determination of a major modification using a monoclonal antibody, *J Biol Chem.* 2005; 280(23):22154-64.

Niniejsza publikacja jest najistotniejszą publikacją prezentowanego cyklu, ponieważ przedstawia przełomowe badania na temat modyfikacji białek przez wolne kinureniny w ludzkiej soczewce oka, których wyniki mają fundamentalny wpływ na zrozumienie szeroko pojętego zagadnienia modyfikacji białek oraz inspirować do badań nad rolą kinurenin w coraz bardziej powszechnych chorobach degeneracyjnych wieku starczego, włączając chorobę Alzheimera.

Do podjęcia badań przyczyniła się hipoteza, że brązowienie soczewki oka nasilające się z wiekiem i związane z podniesionym stresem oksydacyjnym może mieć inne podłoże niż powszechnie badana glikacja. W tym czasie inna grupa opisała obecność niestabilnych, wolnych kinurenin w soczewce. To skłoniło mnie do sprawdzenia czy pochodne tryptofanu znajdujące się w soczewce mogą wiązać się i sieciować krystaliny.

Początkowe badania skoncentrowały się głównie na 3-hydroksykinureninie (3-OHK), ponieważ jest to reaktywna pochodna katalizująca powstawanie wolnych rodników tlenowych, które przyspieszają glikację. Badania *in vitro* wykazały że 3-OHK jak i inne kinureniny kowalencyjnie wiążą się z wolnymi grupami aminowymi lizyny, glicyny, argininy i histydyny. Za pomocą NMR określona została dokładna struktura oczyszczonego uprzednio przez HPLC produktu reakcji 3-OHK i aminokwasu.

Co więcej, uzyskaliśmy z ekstraktu ludzkich soczewek niskocząsteczkowe związki, które były następnie inkubowane z rozpuszczalnymi białkami soczewki. W wyniku ich reakcji wytworzyły się immunoreaktywne pochodne, które zidentyfikowane zostały przez przeciwciała monoklonalne anty-3-OHK. Przeciwciała stanowiły także dogodne narzędzie do potwierdzenia, że modyfikowane kinureniną białka odkładają się w ludzkich soczewkach z kataraktą. Wiązanie przeciwciał zlokalizowane było w obrębie komórek włóknistych w soczewkach z kataraktą, ale nie w tkankach od osób starszych bez wyraźnego zmętnienia. Western blotting soczewkowego ekstraktu z użyciem tych samych przeciwciał monoklonalnych potwierdził obecność usieciowanych białek, które także tworzyły się w soczewkowych komórkach nabłonkowych hodowanych w obecności 3-OHK.

Zainicjowane w tej pracy badania były później kontynuowane w celu wyjaśnienia roli innych kinurenin w soczewce oka, a także poznania molekularnego mechanizmu prowadzącego do akumulacji kinurenin w chorobach związanych z wiekiem. Należy podkreślić, że uzyskane monoklonalne przeciwciała anty-3-OHK posłużyły nam później do zilustrowania akumulacji białek modyfikowanych przez 3-OHK w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera (Załącznik 1a/I.A.7). Dzięki temu, wyniki przedstawione w niniejszej publikacji poszerzyły wiedzę na temat mechanizmu neurodegeneracji, a to zainspirowało kolejne badania nad udziałem szlaku kinureninowego jako celu terapeutycznego w chorobach neurodegeneracyjnych.

W warunkach sprzyjających katarakcie dochodzi do modyfikacji białek na drodze różnorodnych reakcji, które zachodzą w tym samym czasie. W publikacji wysunęłam nową hipotezę, mówiącą o wzajemnym wpływie glikacji i kinureninacji, przypuszczając, że wolne rodniki tlenowe powstające podczas glikacji mogą utleniać tryptofan występujący w komórkach włóknistych generując kinureninę. Doświadczenia jednak pokazały, że ani dodanie AGE, ani sama reakcja glikacji nie powoduje utleniania tryptofanu. Wnioski, będące

wynikiem kolejnych prac wskazały, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy glikacją i kinureninacją. Szczególnie ważne jest podkreślenie, że kinurenina moduluje (stymuluje i hamuje) powstawanie produktów glikacji, w zależności od ich rodzaju (Załącznik 1a/II.A.6). Dodatkowo pod wpływem światła UVA wolne i związane z białkami kinureniny mogą gwałtownie utleniać askorbinian (substrat glikacji), który wiąże się z białkami prowadząc do tworzenia AGE²⁰. Taki efekt obserwowano podczas inkubacji białka w roztworze oraz w całych soczewkach myszy transgenicznych, u których gromadzi się nadmierna ilość askorbinianu. Razem wszystkie te doniesienia sugerują wzajemny wpływ kinureninacji i glikacji prowadzących do patologii.

Publikacja 5

Staniszewska M, Nagaraj RH, Detection of kynurenine modifications in proteins using a monoclonal antibody, *J Immunol Methods*. 2007, 324:63-73.

Badania przedstawione w tej pracy to kontynuacja analizy modyfikacji białek przez inne kinureniny, np. formylokinureninę (NFK) i kinureninę (KYN), która powstaje przez spontaniczną degradację NFK. Badania te miały szczególne znaczenie, ponieważ wcześniej wykazano, że KYN gromadzi się w organizmie pacjentów z chorobami neurologicznymi, np. z chorobą Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona oraz w przypadku niewydolności nerek. To wskazywało, że patogeneza tych chorób może być związana bezpośrednio z procesem modyfikacji białek przez kinureninę i skłoniło mnie do zbadania tego zagadnienia.

Używając do szczepienia antygeny zmodyfikowane przez NFK wyprodukowano nowe przeciwciała monoklonalne, które rozpoznawały białka inkubowane KYN i NFK. Wykazywały także reaktywność z komórkami nabłonkowymi soczewki hodowanymi *in vitro* w obecności KYN. Ostatecznie wykazaliśmy, że modyfikacje kinureninowe znajdują się na białkach soczewki od osób w zaawansowanym wieku, ale nie wykryto KYN w soczewkach młodych dawców. Intensywne barwienie w komórkach nabłonkowych wskazuje na podniesioną aktywnośćIDO (indolamino-2,3-dioksygenazę), komórkowego enzymu katalizującego powstawanie KYN z wolnego tryptofanu. Ponadto dzięki analizie NMR została zidentyfikowana struktura epitopu tworzącego się w reakcji histydyny i NFK, który determinuje specyficzność użytych przeciwciał monoklonalnych.

Zaburzenia metabolizmu tryptofanu związane z wieloma schorzeniami były poza zakresem tych badań, niemniej ich badanie wymaga specyficznych narzędzi. Uzyskane przez nas wyniki oraz specyficzne przeciwciała monoklonalne ułatwiają badania skierowane w kierunku poznania mechanizmów patogenezy, w których istotną rolę pełnią białka zmodyfikowane przez KYN.

Publikacja 6

Mailankot M, **Staniszewska MM**, Butler H, Caprara MH, Howell S, Wang B, Doller C, Reneker LW, Nagaraj RH, Indoleamine 2,3-dioxygenase overexpression causes kynurenine-modification of proteins, fiber cell apoptosis and cataract formation in the mouse lens, *Lab Invest*. 2009, 89:498-512.

Doniesienia literaturowe i własne doświadczenia (Załącznik 1a/II.A.3, 5) opisujące proces kinureninacji wskazują, że kinureniny występujące *in vivo* kowalentnie wiążą się z białkami. Podniesiony poziom wolnych kinurenin przypisywany jest wielu chorobom, których

²⁰ Linetsky M et al., UVA Light-excited Kynurenines Oxidize Ascorbate and Modify Lens Proteins through the Formation of Advanced Glycation End Products, *J. Biol. Chem.* (2014) 289:17111-17123

mechanizm wiązany jest z apoptozą wywołaną lokalnym wyczerpaniem tryptofanu i toksycznością samej KYN. W tej publikacji podjęliśmy próbę wyjaśnienia, czy lokalne tworzenie KYN w komórkach nabłonkowych soczewki może prowadzić do katarakty.

W tym celu stworzyliśmy transgeniczny model myszy, pozwalający na badanie lokalnego gromadzenia się kinurenin w soczewce oka. W ten sposób mogliśmy zidentyfikować molekularny mechanizm prowadzący do patologii soczewki. W naszym modelu ekspresja indoloamino-2,3-dioxygenazy (IDO), enzymu katalizującego pierwszy etap w szlaku kinureninowym, jest pod kontrolą promotora aktywnego tylko w soczewce. Dzięki temu, w tym miejscu możliwe było uzyskanie wysokiego stężenia KYN bez niepożądanych skutków wpływających na ogólny rozwój myszy. Zaobserwowaliśmy, że u transgenicznych zwierząt nie wykształcił się prawidłowy narząd wzroku. Ich soczewka była znacznie mniejsza, zmętniała i pozbawiona prawidłowej struktury. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego pokazały dezorganizację obu rodzajów komórek: nabłonkowych włóknistych. Heterozygoty i myszy typu dzikiego (w stosunku do IDO) nie wykazywały patologii w przeciwieństwie do homozygot, u których w 3 miesiącu życia wyraźnie widoczna była gęsta zaćma jądrowa i zmętnienie soczewki. Te zmiany związane były ze wzrostem aktywności IDO, a także z podniesionym stężeniem wolnej i związanej z białkami KYN, oznaczanej za pomocą HPLC, specyficznych przeciwciał monoklonalnych oraz spektrometrii masowej. Zwiększona produkcja IDO prowadząca do gromadzenia się KYN powodowała spadek glutationu. Sugeruje to, że neutralizacja kinurenin przez GSH jest wczesnym mechanizmem obronnym w soczewce, który nie jest jednak efektywny. Pozytywny wynik barwienia metodą TUNEL wskazuje na obecność procesu apoptozy.

Zatem przedstawiona publikacja prezentuje istotne dane wskazujące na bezpośredni udział białek zmodyfikowanych przez kinureninę w patogenezie soczewki. Wyniki te stanowiły silną podstawę dla dalszych badań wyjaśniających mechanizm i szlaki sygnałowe prowadzące do zaburzenia rozwoju, uszkodzenia i śmierci komórek soczewki oka^{21,22}.

Podsumowując, wszystkie publikacje przedstawione jako cykl do oceny omawiają nowatorskie pomysły i odkrycia dotyczące modyfikacji białek – glikacji i kinureninacji oraz ich udziału w patogenezie chorób związanych ze starzeniem. Publikacje te opisują przełomowe badania, które stały się dla mnie podstawą do kontynuowania i pogłębiania prac badawczych nad powyższymi zagadnieniami oraz stały się źródłem inspiracji dla innych badaczy.

Do najważniejszych osiągnięć związanych z mechanizmem modyfikacji białek i ich roli w chorobach należą następujące zagadnienia:

1. Niekonwencjonalne warunki syntezy prowadzące do powstawania strukturalnie odmiennych AGE
 - Analiza strukturalna i wykazanie odmienności produktów glikacji tworzonych w warunkach panujących podczas przetwarzania żywności w wysokiej temperaturze i ciśnieniu; ma to znaczenie w rozważaniach na temat egzogennych źródeł i spożywania AGE, a także jako potencjalny sposób na uzyskiwanie modelowych związków glikacji
2. Udział glikacji w patogenezie choroby Alzheimera

²¹ Mailankot M and Nagaraj R, Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: Apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 1446–1454

²² Mailankot et al., Kynurenine inhibits fibroblast growth factor 2-mediated expression of crystallins and MIP26 in lens epithelial cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (2010) 609–620

AUTOREFERAT
Z WYKAZEM INNYCH OSIĄGNIĘĆ ZAWODOWYCH
Magdalena Staniszewska

- Nowe metody pomiaru immunochemicznych wskaźników związanych z procesem glikacji; szczegóły tej metody zostały opatentowane i uzyskały ochronę w Polsce
 - Identyfikacja potencjalnych biomarkerów związanych z chorobą Alzheimera – obecność w surowicy pacjentów autoprzeciwciał klasy IgM skierowanych przeciwko AGE oraz obniżony poziom krążących AGE i autoprzeciwciał anty-AGE klasy IgG.
3. Rola GLOI w metabolizmie wewnątrzkomórkowego MGO w soczewce przy hiperglikemii
- Prezentowane wyniki mają znaczenie terapeutyczne w przypadku komplikacji związanych z cukrzycą
4. Kinureninacja białek w ludzkiej soczewce oka – badania dostarczające dowodów, że powstające *in vivo* wolne kinureniny mogą wiązać się i sieciować krystaliny
- Stworzenie nowych przeciwciał monoklonalnych wiążących KYN i 3-OHK; stanowią one narzędzia, które znalazły szerokie zastosowanie w badaniu modyfikacji białek związanych z procesami starzenia i chorobami neurodegeneracyjnymi
 - Identyfikacja krystalin zmodyfikowanych przez KYN i 3-OHK odkładających się w ludzkich soczewkach i przyczyniających się do komplikacji związanych z wiekiem
5. Właściwości cytotoksyczne kinurenin tworzących się w soczewce
- Moje badania po raz pierwszy potwierdziły cytotoksyczność tworzących się w soczewce kinurenin, które powodują komórkowe zmiany podobne do tych, które towarzyszą powstawaniu katarakty
 - Stworzenie modelu mysiego użytecznego do poznania patologii soczewki i innych schorzeń, np. choroby Alzheimera czy Parkinsona, gdzie w mechanizm zaangażowana jest kinurenina.

D. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje wczesne badania, włączając pracę magisterską, wykonywane były pod kierunkiem Prof. Andrzeja Gamiana w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, IITD PAN we Wrocławiu. Prace prowadzone w laboratorium dotyczyły strukturalnych i biologicznych właściwości bakteryjnych antygenów powierzchniowych, w tym węglowodanów, białek i lipidów oraz wykorzystania tej wiedzy do potencjalnych terapii oraz celów diagnostycznych.

Izolacja i charakterystyka biochemiczna fimbrii *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*

Podczas studiów na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej i realizacji doświadczeń wchodzących w skład pracy magisterskiej uczestniczyłam w badaniach dotyczących nośników poliwalentnej szczepionki o szerokim spektrum skierowanej wobec szczepów rodziny *Enterobacteriace* wywołujących groźne infekcje. Zespół Prof. Gamiana opracował koniugatową szczepionkę składającą się z nośnika, białkowych fimbrii oraz krzyżowo-reagującego rdzeniowego oligosacharydowego antygeny – *E. coli* K12 C600. W mojej pracy magisterskiej opisałam oczyszczanie oraz właściwości immunochemiczne fimbrii typu 1 i 3 szczepu *Klebsiella oxytoca* i *K. pneumoniae*. Białka te wykazywały niską aktywność indukcji cytokin prozapalnych i zostały w dalszym etapie użyte do stworzenia szczepionki koniugatowej. Wykazaliśmy, że powodowały one tworzenie przeciwciał skierowanych na

antygen (oligosacharyd) i na nośnik (fimbrie) oraz indukowały aktywność bakteriobójczą wobec wielu szczepów enterobakteryjnych. Z tego powodu fimbrie powinny służyć jako nośniki w szczepionkach konjugatowych oraz w diagnostyce. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na międzynarodowym zjeździe (Załącznik 1a/I.IXA.1) oraz opisane w 2 publikacjach (Załącznik 1a/I.IA.2, 1a/I.IIIB.1).

Po ukończeniu studiów ze stopniem mgr inż. w lipcu 1998 roku otrzymałam stanowisko asystenta w laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN we Wrocławiu i jako członek zespołu Prof. Gamiana prowadziłam badania dotyczące charakterystyki i różnorodności bakteryjnych antygenów białkowych i cukrowych przez określanie struktur chemicznych oraz właściwości immunochemicznych. W tym czasie zdobyłam doświadczenie w zakresie biochemii, immunochemii oraz spektrometrycznych metod analitycznych, które wykorzystałam w opisanych poniżej projektach.

Mimikra cząsteczkowa i toksyczność białek błony zewnętrznej bakterii

Celem projektu prowadzonego przez dr hab. Danutę Witkowską, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN) było zbadanie mimikry cząsteczkowej pomiędzy białkami enterobakteryjnych szczepów a tkankami ludzkimi. Wytwarzane autoprzeciwciała powstające po ekspozycji na antygeny bakteryjne mogą opóźnić odpowiedź immunologiczną i wywoływać auto reaktywność przeciwko tkankom gospodarza. Przykładem były oczyszczone królicze przeciwciała specyficzne dla ludzkiej enolazy mięśniowej przetestowane pod kątem immunoreaktywności z białkami błony zewnętrznej (tzw. outer membrane proteins, OMP) wyizolowanymi z wybranych szczepów *Enterobacteriaceae*. Zaobserwowaliśmy homologię ludzkiej enolazy z jednym z białek OMP, co wskazuje na jego potencjalną rolę w auto reaktywności. Kluczowa w projekcie była współpraca z dr Masłowską z Katedry i Kliniki Pediatrii, Alergologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz z Profesorem Adamem Jankowskim z Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Nasze badania zostały zaprezentowane na konferencji FEBS w 2001 (Załącznik 1a/I.IXA.3) i doprowadziły do identyfikacji bakteryjnego 45 kDa-białka enolazo-podobnego²³. Z uwagi na jego molekularną mimikrę z enolazą ludzką, nie powinno ono służyć jako nośnik szczepionkowy, ale może posłużyć jako marker diagnostyczny. W przeciwieństwie do niego, inne opisane przez nas 38 kDa-białko OMP z *Shigella flexneri* 3a, nie reagowało krzyżowo z białkami gospodarza i zapewniało ochronę przez indukcję przeciwciał klasy IgA i IgG. Sugeruje to diagnostyczny potencjał tego OMP i czyni je dobrym kandydatem na nośnik antygenów w szczepionce (Załącznik 1a/I.IXA.5, 1a/I.IA.3).

Struktury bakteryjnych polisacharydów O-swoistych

Ten projekt dotyczył analizy strukturalnej cukrowych antygenów obecnych na powierzchni komórek szczepów *Citrobacter*, wyjaśnienia ich serologicznego podobieństwa z innymi enterobakteriami i ulepszenia skomplikowanej klasyfikacji szczepów (Załącznik 1a/I.IA.1). Mój udział w tym projekcie obejmował analizę immunochemiczną i strukturalną szczepu *Citrobacter youngae* PCM1492, należącego do serogrupy O1, w której znajdują się patogeny często izolowane od pacjentów pediatrycznych z zapaleniem jelit i czerwonką. Badania te były uzupełnione o analizy NMR wykonane we współpracy z Instytutem Chemii

²³ Witkowska et al. Antibodies against human muscle enolase recognize a 45-kDa bacterial cell wall outer membrane enolase-like protein, FEMS Immunol Med Microbiol. (2005) 1; 45(1):53-62

Organicznej Rosyjskiej Akademii Nauk w Moskwie i pozwoliły na określenie unikalnej i rzadkiej u bakterii reszty α -D-ribofuranozowej wchodzącej w skład O-specyficznego antygenu badanego szczepu *Citrobacter*. Nasze wyniki mają znaczenie w kontekście enterobakteryjnych bakterii wykazujących związek ze szczepami *Citrobacter*, tak jak w przypadku enteropatogenego szczepu *E. coli* O9.

Znaczenie glikacji białek w patogenezie chorób związanych z wiekiem i cukrzycą

Naukowa ciekawość i zainteresowanie glikobiologią sprawiły, że podjęłam badania nad rolą modyfikacji białek przez cukry w przypadku komplikacji cukrzycowych i starczych. To zagadnienie wybrałam na temat mojej pracy doktorskiej.

Najpierw skupiłam się na zastosowaniu niekonwencjonalnych metod, czyli wysokiego ciśnienia i temperatury w celu wytworzenia modelowych produktów AGE. Badania te były finansowane ze środków grantowych, które otrzymałam w ramach konkursu Grant dla Młodych Naukowców z Komitetu Badań Naukowych (punkt VI.c2). Rezultaty tego projektu zostały przedstawione w **publikacji 1** opisanej tu wcześniej (Załącznik 1a/II.IA.1). Oprócz laktozy jako modelowego cukru zastosowałam kilka innych dwusacharydów, które generowały AGE mimikujące produkty glikacji tworzone *in vivo* w ludzkiej surowicy. Te nowe modelowe AGE zostały wykorzystane do opracowania metody pomiaru glikacji w próbkach ludzkiej surowicy. Metoda obejmuje 3 komplementarne testy do oznaczania poziomu AGE, odpowiadających im autoprzeciwciał oraz kompleksów immunologicznych. Szczegóły objęte są ochroną patentową (punkt VIIb.1).

Dzięki współpracy nawiązanej z Prof. Jerzym Leszkiem z Katedry i Kliniki Psychiatrii oraz dr Leszkiem Masłowskim z Katedry i Kliniki Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przeprowadziłam badania poziomu glikacji białek w surowicy pacjentów z chorobą Alzheimera oraz z powikłaniami cukrzycowymi, jak nefropatia i choroba zakrzepowa naczyń kończyn dolnych. Podstawą badań było użycie opisanego wcześniej testu, który okazał się przydatny w badaniu glikacji *in vivo*. Wyniki pokazały obniżony poziom krążących w surowicy AGE w przypadku choroby Alzheimera i nefropatii, natomiast podwyższony poziom w angiopatii cukrzycowej, co sugeruje znaczenie lokalnego procesu glikacji w patogenezie tych chorób.

Wyniki tych doświadczeń prezentowane na międzynarodowej konferencji (Załącznik 1a/I.IXA.4) oraz w 2 publikacjach (Załącznik 1a/I.IA.2, 1a/I.IB.1), zawarte zostały w mojej rozprawie doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Gamiana, która uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w 2003 roku.

Modyfikacje białek przez produkty utlenienia lipidów

Produkty utlenienia lipidów to kolejny obszar będący w obrębie mojego zainteresowania. Powstają one jako produkty uboczne podczas przetwarzania żywności i kowalencyjnie modyfikują białka. We współpracy z Department of Pure and Applied Biochemistry, Lund University w Szwecji badałam właściwości trans-2-nonenalu (T2N) powstającego przez utlenianie kwasu linolowego. Wykazaliśmy, że białka w obecności T2N zostają usieciowane i wykazują właściwości genotoksyczne prowadząc do apoptozy komórek (Załącznik 1a/I.XB.1). Te związki mają znaczenie w przemyśle spożywczym i należałoby brać pod uwagę ich poziom analizując skład przetwarzanej żywności.

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Modyfikacje białek w cukrzycy i powikłaniach związanych ze starzeniem

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych (w 2003 roku) kontynuowałam badania na temat modyfikacji białek. Odbyłam staż podoktorski w laboratorium Prof. Rama Nagaraja w Case Western Reserve University w Cleveland, OH, USA, który jest znanym naukowcem z licznymi osiągnięciami w dziedzinie glikacji. Podczas pobytu w jego laboratorium od 2003-2007 roku miałam możliwość poszerzyć swoje zainteresowania na temat modyfikacji białek i ich roli w chorobach wieku starczego przez uczestnictwo w wielu projektach finansowanych przez US National Institute of Health oraz fundacje naukowe. W 2004 roku zostałam także beneficjentką prestiżowego stypendium przyznanego przez Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

Moje badania mają znaczący wkład w poznanie modyfikacji białek. Oprócz badania glikacji białek byłam pionierem nowego kierunku, który częściowo został już opisany w niniejszej rozprawie (**Publikacje 4, 5, 6; Załącznik 1a/II.IA.3, 5, 6**), a który dotyczy roli indoloamino-2,3-dioxygenazy (IDO) w chorobach wieku starczego, w tym katarakcie i chorobie Alzheimera.

Do swoich najważniejszych osiągnięć w dziedzinie modyfikacji białek zaliczam:

- Wyjaśnienie roli GLO w metabolizmie wewnątrzkomórkowego MGO w hiperglikemii (**Publikacja 3, Załącznik 1a/II.IA.4**)
- Wykazanie pozytywnej roli metyloglioksalu, który konkurując z cukrami i kwasem askorbinowym chroni białka przed sieciowaniem oraz przyczynia się do podwyższenia właściwości czaperonowych krystalin (Załącznik 1a/I.IA.4)
- Wykazanie zależności procesu glikacji i kinureninacji białek; opisano modulatorowy i zależny od stężenia wpływ kinureniny na tworzenie AGE (Załącznik 1a/I.IA.6)
- Zebranie po raz pierwszy dowodów na udział wolnych kinurenin w powstawaniu katarakty (**Publikacja 4, Załącznik 1a/II.IA.3**)
- Wytworzenie nowych narzędzi opartych na przeciwciałach monoklonalnych, które znajdują szerokie zastosowanie w badaniach roli szlaku kinureninowego w mechanizmie procesów starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych (**Publikacja 4, 5; Załącznik 1a/II.IA.3, 5**)
- Dostarczenie danych na temat cytotoksycznych właściwości KYN obecnych w żywej tkance. W modelu zwierzęcym u myszy, w wyniku lokalnej nadprodukcji IDO, wywołano zmiany w soczewce, które przypominają takie zmiany jakie obserwuje się podczas powstawania katarakty (**Publikacja 6, Załącznik 1a/II.IA.6**)
- Wykazano obecność białek modyfikowanych kinureniną w obrazie mózgu charakterystycznym dla choroby Alzheimera, co wskazuje na ich rolę w patogenezie choroby (Załącznik 1a/I.IA.7).

Molekularne mechanizmy i markery chorób oczu związanych z angiogenezą

W 2007 roku, zainteresowana angiogenezą i biologią siatkówki rozpoczęłam drugi staż podoktorski w laboratorium Prof. Andriusa Kazlauskasa w Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School w Bostonie, MA, USA. Jako członek społeczności akademickiej Uniwersytetu Harvarda miałam możliwość aktywnego uczestnictwa w spotkaniach licznych grup tematycznych, prezentacjach wygłaszanych przez liderów naukowych oraz zdobycia doświadczenia w zakresie najnowszych technologii biologii molekularnej i komórkowej dotyczącej biologii siatkówki.

Celem projektów którymi kierowałam, było poznanie zmian powstających w mikronaczyniach związanych z chorobami oczu, takich jak retinopatia dotycząca wcześniaków (retinopatia wcześniaków), cukrzyków (retinopatia cukrzycowa) oraz osób starszych (starcza degeneracja plamki żółtej). Schorzenia te są najczęstszą przyczyną utraty wzroku w poszczególnych grupach wiekowych i charakteryzują się przerostem nieprawidłowych naczyń krwionośnych, co prowadzi do nieodwracalnych zmian w siatkówce. Moim głównym zadaniem było zbadanie molekularnych mechanizmów prowadzących do patologii naczyń i identyfikacji markerów wskazujących na nieprawidłowy proces angiogenezy. Posługiwałam się wieloma modelami, np. testem *in vitro* tworzenia naczyń, szczurzy model retinopatii indukowanej tlenem (oxygen-induced retinopathy – ROP), w których zmiany przypominały te obserwowane u pacjentów. Moje badania pokazały różnice w strukturze błony wewnętrznej oddzielającej siatkówkę od ciała szklanego (ang. ILM) oraz w składzie komórkowym patologicznych naczyń oka w szczurzym modelu retinopatii indukowanej tlenem (ang. OIR). Wyniki te były prezentowane na konferencji międzynarodowej (Załącznik 1a/I.IXA.14) i zyskały zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego, co zaowocowało długą współpracą i uzyskaniem środków finansowych na kontynuację badań. W rezultacie, posługując się techniką prezentacji fagowej („phage display”) stworzyliśmy peptydowe narzędzia identyfikujące komórki śródbłonkowe i makrofagi związane z patologicznymi naczyniami (Załącznik 1a/I.IA.8). Ta nowa metoda, która umożliwia analizę i celowaną terapię schorzeń wywołanych obecnością patologicznych naczyń krwionośnych, uzyskała ochronę patentową w USA (punkt VIIb.2).

Moje badania mające na celu identyfikację markerów znajdujących się na powierzchni komórek śródbłonka i charakteryzujące różne fazy angiogenezy zostały również docenione i wsparte finansowo przez grant z fundacji The Knights Templar Eye Foundation oraz One Sight Foundation.

Dziedziczne choroby siatkówki i nowe metody leczenia

Po ukończonym stażu podoktorskim kontynuowałam prace w dziedzinie biologii siatkówki na stanowisku Asystenta Naukowego i Starszego Technologa w laboratorium kierowanym przez Prof. Erica Pierce w Ocular Genomics Institute, MEEI i Harvard Medical School w Bostonie. Jest to wiodący szpital okulistyczny specjalizujący się w chorobach degeneracyjnych siatkówki (RD), w tym uwarunkowanych genetycznie. Wysokiej klasy specjaliści i nowoczesna aparatura pozwalają w tym ośrodku na zaawansowaną diagnostykę genetyczną oraz rozwijanie nowych metod regeneracji siatkówki. W laboratorium Prof. Pierca realizowałam projekty finansowane głównie przez US National Institute of Health oraz prywatne fundacje jako członek zespołu złożonego z lekarzy i naukowców specjalizujących się w dziedzinie genetyki, biologii komórki, diagnostyki i bioinformatyki. Naszym celem było badanie mechanizmów RD i wykorzystanie tej wiedzy do opracowania nowych terapii. Poza pracą naukową angażowałam się również w szkolenie studentów i stażystów, a także zarządzałam kolekcją komórkową oraz ponad 20 unikatowymi liniami zwierzęcymi.

Moje naukowe zainteresowania dotyczyły następujących obszarów:

- Mechanizmy dziedzicznych chorób degeneracyjnych siatkówki

Badania skupiały się na poznaniu nowych genów odpowiedzialnych za utratę wzroku w wyniku wrodzonej ślepoty Lebera (LCA) związanej z degeneracją fotoreceptorów. Dzięki współpracy z wieloma ośrodkami, wykorzystując nową technikę sekwencjonowania (next-generation sequencing) zidentyfikowaliśmy chorobowy gen – NMNAT1 odpowiedzialny za

LCA. Zastosowanie analizy sekwencji egzonowych u pacjentów z LCA pozwoliło na identyfikację szeregu mutacji wpływających na aktywność enzymu i syntezy NAD, potwierdzoną w hodowanych *in vitro* fibroblastach skóry pochodzących od pacjentów. Nasze wyniki po raz pierwszy łączyły NMNAT1 z chorobą u człowieka i wskazują, że mutacje w NMNAT1 wywołują LCA (Załącznik 1a/I.IA.9, 1a/I.IX.15). Ten gen może być wykorzystany jako cel przyszłych terapii.

- Modele zwierzęce dziedzicznych chorób degeneracyjnych siatkówki

Kolejną dziedziną moich badań było opracowanie modeli genetycznych służących do poznania molekularnych mechanizmów chorób oraz testowania nowych terapii. Modele zwierzęce, np. transgeniczne i zmutowane myszy są powszechnie akceptowanymi i używanymi modelami w medycynie translacyjnej. W naszym laboratorium wygenerowaliśmy i zgromadziliśmy ponad 20 unikalnych linii mysich służących do badania IRD. Mój udział dotyczył wielu z nich, między innymi linii mysiej V9M NMNAT1 z globalną mutacją odpowiadającą zmianie zidentyfikowanej u pacjenta z LCA (Załącznik 1a/I.IX.20). Ten model wiernie odzwierciedla wcześnie zaczynającą się chorobę zwyrodnieniową siatkówki i nadaje się do badania udziału NMNAT1 w chorobie siatkówki oraz potencjalnych terapii dla pacjentów z chorobą uwarunkowaną mutacją NMNAT1.

W obszarze moich zainteresowań było także białko Ttc21b i rola jaką ono odgrywa w degeneracji fotoreceptorów, prowadzącej do utraty wzroku u osób z ciliopatią. Sukcesem zakończyła się próba wygenerowania szczepu mysiego, u którego miejscowo w pręcikach usunięto gen kodujący Ttc21b (Załącznik 1a/I.IX.17, 18). Wywołało to obumieranie światłoczułych komórek siatkówki już we wczesnym etapie ich rozwoju, co wskazuje że TTC21B bierze aktywny udział w transporcie wstecznym wymaganym do normalnego rozwoju pręcików i zachowania prawidłowej budowy całej siatkówki. Powstały model jest obecnie wykorzystywany do badania i poznania biologii fotoreceptorów oraz dokładnego mechanizmu prowadzącego do utraty wzroku spowodowanego mutacjami TTC21B.

- Nowe metody leczenia degeneracji siatkówki

Obecne odkrycia i postęp w technologii pozwalają na tworzenie nowych i skuteczniejszych metod leczenia wrodzonych chorób siatkówki, takich jak medycyna regeneracyjna czy terapia genowa. Jednym ze sposobów, które brane są pod uwagę jest korekta genu w pochodzących od pacjenta, wyindukowanych komórkach macierzystych (ang. induced pluripotent stem cells – iPS cells). Moje badania polegały na testowaniu wydajności edycji genów wywołanej krótkimi oligonukleotydami (ODNs) w fibroblastach pacjentów z genetyczną wadą siatkówki. Problem detekcji niewielkiej ilości komórek ze skorygowanym genem został rozwiązany przez zastosowanie nowoczesnej metody sekwencjonowania Next Generation Sequencing (NGS). Wyniki pokazały, że ODN nadają się do korekty pojedynczych mutacji w pierwszorzędowych komórkach pacjentów, choć w związku z ograniczoną zdolnością proliferacji fibroblasty nie są optymalnymi komórkami do użycia w terapii (Załącznik 1a/I.IX.16). Wydaje się że komórki iPS mają lepsze szanse na wykorzystanie.

Alternatywną metodą korekcji genów jest augmentacja genu. W naszym instytucie OGI specjalizującym się w opracowywaniu nowych terapii genowych wykorzystywaliśmy wirusowe nośniki dostarczające terapeutyczne DNA. Testowaliśmy dostarczanie DNA na bazie wirusa AAV i lenti aby sprawdzić produkcję białka RP1 w fotoreceptorach. Użyliśmy wygenerowanego wcześniej modelu mysiego z lokalnie usuniętym genem RP1 aby sprawdzić wydajność transportu oraz prawidłową lokalizację nowo-ekspresjonowanego

białka RP1. Z powodu długiej sekwencji oraz nie w pełni poznanej funkcji tego białka kontynuowane są dalsze badania zmierzające do usprawnienia procesu transportu DNA do komórek światłoczułych siatkówki.

Nowe strategie celowanego dostarczania biocząsteczek

Po powrocie z długoterminowego stażu zagranicznego w październiku 2014 założyłam własny zespół przy Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN we Wrocławiu, prowadzący badania nad dostarczaniem cząsteczek aktywnych biologicznie oraz identyfikacją specyficznych antygenów powierzchniowych, które mogą zostać wykorzystane jako cel diagnostyczny i terapeutyczny w przypadku chorób zakaźnych. We współpracy z Prof. Andrzejem Gamianem z IITD PAN we Wrocławiu, Prof. Wiesławem Szeją z Wydziału Chemii Politechniki Śląskiej, Prof. Erickiem Pierce i dr Michaeliem Mansour z Harvard Medical School w Bostonie opracowujemy platformę do identyfikacji specyficznych peptydów służących jako nośnik leków lub znaczników. Te sondy znajdują zastosowanie w badaniu interakcji pomiędzy bakterią i gospodarzem, co pozwoli na lepsze poznanie mechanizmu infekcji.

Światłowodowe sondy do diagnostyki nowotworów

Problem wczesnej diagnostyki nowotworowej oraz rozwój nowych technologii detekcyjnych jest kolejnym obszarem moich obecnych zainteresowań. Jako Kierownik Projektu nadzoruję realizację zadań projektu prowadzonego przez spółkę SDS OPTIC w Lublinie. Projekt obejmuje konsorcjum dodatkowo dwóch uniwersytetów medycznych, uniwersytetu przyrodniczego i fundacji naukowej. Projekt niedawno uzyskał rekomendację do finansowania w II konkursie STRATEGMED. Celem jest opracowanie nowej technologii światłowodowej do diagnostyki chorób onkologicznych przez stworzenie urządzenia zdolnego do miejscowej analizy komórek i detekcji specyficznych markerów nowotworowych. Ta technologia będzie miała ogromny wpływ na diagnostykę nowotworową, usprawnienie i zminimalizowanie inwazyjności procedury, a także pozwoli na szybsze zastosowanie celowanej terapii. W konsekwencji wpłynie to na skuteczność terapii przeciwnowotworowych oraz polepszenie jakości życia pacjentów. Ta technologia również znajdzie zastosowanie przy testowaniu kinetyki i efektywności nowych leków przeciwnowotworowych przez tkankowe badanie stężenia stosowanych leków.

Podsumowanie pełnego dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w **18** pracach oryginalnych, w tym **16** w anglojęzycznych czasopismach znajdujących się w bazie danych Journal Citation Reports (**18** prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora; pierwszy autor – **7** publikacji), **4** prace przeglądowe **21** komunikatów zjazdowych, **7** prezentacji, **2** patenty międzynarodowe i **1** krajowy.

Sumaryczny impact factor (IF) publikacji oryginalnych to **71,250** (punkty MNiSW – **371**). Na dzień 23 lutego 2015 według bazy Web of Science Core Collection ilość cytowań z wyłączeniem własnych wynosiła **112**, Index h = **5** (całkowita ilość cytowań w oparciu o analizę Web of Science Core Collection włączając autocytowania – 162, index h=7).

Sumaryczny IF sześciu prac wybranych do oceny wynosi **17,425** (punkty MNiSW - **104**) przy ilości cytowań z wyłączeniem autocytowań **35**.

Poza tym, moja aktywność naukowa obejmuje uczestnictwo w **2** projektach finansowanych przez Komitet Badań Naukowych (KBN), **5** finansowanych przez US National Institute of Health, **6** sponsorowanych przez amerykańskie fundacje badawcze, w tym Fight For Sight, Knights Templar Eye Foundation, One Sight Foundation, Research to Prevent Blindness, Ohio Lions Eye Research Foundation oraz **1** projekt realizowany obecnie, który uzyskał rekomendacje do finansowania z programu NCBIr – STRATEGMED II. Byłam lub obecnie jestem Kierownikiem **6** z wymienionych projektów.

RAPORT CYTOWAŃ WEB OF SCIENCE

wliczając autocytowania, z dnia 24 lutego 2015

Web of Science [v.5.16.1] – Web of Science Core Collection Citation Report

24.02.2015 13:52

Web of Science™ | InCites™ | Journal Citation Reports® | Essential Science Indicators™ | EndNote® | Sign In | Help | English

WEB OF SCIENCE™



Search | Return to Search Results | My Tools | Search History | Marked List

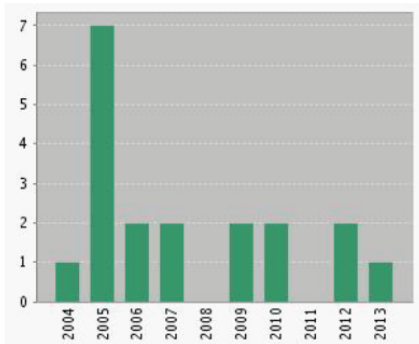
Citation Report: 19

(from Web of Science Core Collection)

You searched for: **AUTHOR:** (staniszewska m*) ...More

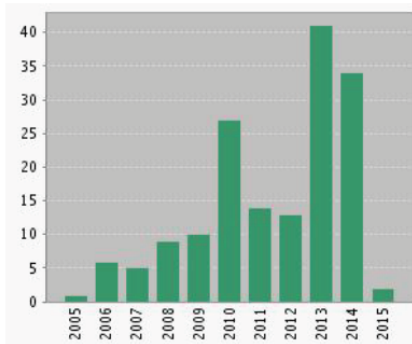
This report reflects citations to source items indexed within Web of Science Core Collection. Perform a Cited Reference Search to include citations to items not indexed within Web of Science Core Collection.

Published Items in Each Year



The latest 20 years are displayed.

Citations in Each Year



The latest 20 years are displayed.

Results found: 19
Sum of the Times Cited [?]: 162
Sum of Times Cited without self-citations [?]: 150
Citing Articles [?]: 140
Citing Articles without self-citations [?]: 133
Average Citations per Item [?]: 8.53
h-index [?]: 7

V. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej

a) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki

- 1) 2002, Wykład w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu
"Badanie właściwości biologicznych produktów glikacji białek"
- 2) 2004, Wystąpienie podczas Annual Meeting, Department of Ophthalmology, Case Western Reserve University, Cleveland OH, USA
"Hydroxykynurenine modification in the human lens: detection using monoclonal antibody"
- 3) 2005, Wystąpienie podczas Annual Meeting, Department of Ophthalmology, Case Western Reserve University, Cleveland OH, USA
"Glyoxalase I fails to prevent accumulation of methylglyoxal in mouse lens epithelial cells"
- 4) 2006, Wykład podczas spotkania Wrocławskiej Sekcji Polskiego Towarzystwa Immunologii Eksperymentalnej i Klinicznej, Wrocław, Poland
"Modyfikacje białek soczewki w katarakcie i procesach starzenia"
- 5) 2009, Wykład podczas spotkania NeuroVascular Biology Group, Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
"Identification of Markers for Proliferative Retinopathies"
- 6) 2010, Wykład podczas Trainees' Work-in-progress Seminar, Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
"Investigating angiogenic program"
- 7) 2011, Wystąpienie podczas Sponsor's Meeting, Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
"New approaches to identify angiogenic targets"

b) Opieka naukowa nad studentami i doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

- 1) 2000-2003, Opiekun naukowy podczas pracy magisterskiej studentki Ewy Sowuli, Politechnika Wroclawska, Wydział Chemii, Kierunek: Biotechnologia i Biokataliza
Promotor: Prof. Andrzej Gamian
Tytuł projektu: Synteza i badanie właściwości biologicznych produktów glikacji.
- 2) 2004, Opiekun naukowy podczas pracy badawczej studentki Ali Saba, Case Western Reserve University, Cleveland, OH
Promotor: Prof. Ram H Nagaraj
Tytuł projektu: Effect of the anticataract drugs on lens Glyoxalase.

- 3) Listopad 2013-Lipiec 2014, Opiekun naukowy stażysty Mao Li, MD, MEEI, Harvard Medical School, Boston, MA
Kierownik stażu: Qin Liu, PhD
Tytuł projektu: Animal models of retinal inherited degenerations

- 4) Lipiec-Sierpień 2014, Opiekun naukowy podczas pracy badawczej studentki Nicole Bavaro, College of Science, Northeastern University
Kierownik stażu: Qin Liu, PhD
Tytuł projektu: Role of Ttc21b in photoreceptor biology

VI. Współpraca z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi w kraju i za granicą

a) Uczestnictwo w Europejskich i innych międzynarodowych lub krajowych programach

- 1) 2003-2007, staż podoktorski, Case Western Reserve University, Cleveland, OH,
Mentor: Prof. Ram H Nagaraj
- 2) 2007-2011, staż podoktorski, Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, Mentor: Prof. Andrius Kazlauskas

b) Uczestnictwo w konsorcjach i sieciach naukowych

2015-2018, Kierownik Projektu
Grant rekomendowany do finansowania w programie Narodowego Centrum Badan i Rozwoju NCBiR-STRATEGMED II, nr. 269364
“Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania mikrosond laserowych służących do diagnostyki nowotworowej”
Konsorcjum: SDS-OPTIC Sp. Z o.o., Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Fundacja Polskie Centrum Fotoniki i Światłowodów.

c) Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

- 1) 2000-2003, Wykonawca
Grant finansowany przez Komitet Badań Naukowych (KBN) nr 4 P05A 04018
“Badania nad mimikrą cząsteczkową i toksycznością białek powierzchniowych i błony zewnętrznej bakterii chorobotwórczych”

- 2) 2000-2001, Kierownik Projektu
Grant dla Młodego Naukowca finansowany przez Komitet Badań Naukowych (KBN), nr 6 P04A 040 19
“Otrzymywanie produktów nieenzymatycznej glikacji, ich analiza oraz badania właściwości immunologicznych”

- 3) 2003-2007, Wykonawca
Grant finansowany przez National Eye Institute, USA (finansowany 1994-2011), NIH No. R01EY-09912
“Maillard Reactions And Oxidation In Cataractogenesis”

- 4) 2003-2007, Wykonawca
Grant finansowany przez National Eye Institute, USA (finansowany 2005-2011), NIH No. R01EY-016219
“Modifications Of Small Heat Shock Proteins In The Lens”
- 5) 2003-2007, Wykonawca
Grant finansowany przez National Eye Institute, USA (finansowany 2004-2007), NIH No. 5R21DK068045
“Novel Pathways Of Age Formation In Diabetes”
- 6) 2003-2007, Wykonawca
Grant finansowany przez National Eye Institute, USA (finansowany 1999-2018), NIH No. 5R01EY012910
“Novel Photoreceptor Proteins And Retinal Degenerations”
- 7) 2004-2005, Kierownik Projektu
Grant finansowany przez *Fight for Sight Foundation, USA*
“Protein Modification by Tryptophan Oxidation Products in the Human Lens”
- 8) 2005-2006, Kierownik Projektu
Grant finansowany przez *Ohio Lions Eye Research Foundation, USA*
“Protein Modification by Tryptophan Oxidation Products in the Human Lens: Role of Oxidative and Glycemic Stress”
- 9) 2009-2010, Kierownik Projektu
Grant finansowany przez *Knights Templar Eye Foundation, USA*
“Identification of endothelial cell markers for different angiogenic states”
- 10) 2010-2011, Kierownik Projektu
Grant finansowany przez *One Sight Foundation, USA*
“Investigation of the angiogenic program”
- 11) 2014, Wykonawca
Grant współfinansowany przez European Union under the Operational Program Innovative Economy, nr POIG.02.03.02-00-005/10 (finansowany: 2010-2014)
„Utworzenie interoperacyjnej elektronicznej platformy naukowej Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów”
- 12) 2015-2018, Kierownik Projektu
Grant rekomendowany do finansowania w programie Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NCBiR-STRATEGMED II, nr. 269364
“Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania mikrosond laserowych służących do diagnostyki nowotworowej”

d) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną

- 1) 2003, Wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Naukową IITD PAN

- 2) 2004, Stypendium American Association for Research in Vision and Ophthalmology – Alcon/ Fight for Sight Foundation, USA
- 3) 2005, Stypendium Ohio Lions Eye Research Foundation, USA
- 4) 2009, Stypendium Knights Templar Eye Foundation, USA

e) Krajowe i międzynarodowe staże naukowe

- 1) 2003-2007, staż podoktorski
Department of Ophthalmology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA
- 2) 2007-2011, staż podoktorski
Schepens Eye Research Institute, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
- 3) 2011-2014, staż naukowy
Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

f) Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
- American Diabetes Association (ADA)

g) Recenzowanie manuskryptów w czasopismach międzynarodowych lub krajowych

- 1) 2003, 1 recenzowany manuskrypt, *Biochimica et Biophysica Acta*
- 2) 2003, 1 recenzowany manuskrypt, *Diabetes*
- 3) 2005, 1 recenzowany manuskrypt, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*
- 4) 2006, 1 recenzowany manuskrypt, *Experimental Eye Research*
- 5) 2007, 1 recenzowany manuskrypt, *Journal of Pharmacological Sciences*
- 6) 2007, 1 recenzowany manuskrypt, *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*
- 7) 2007, 1 recenzowany manuskrypt, *Ophthalmic Research*
- 8) 2015, 1 recenzowany manuskrypt, *PLOS One*

VII. Popularyzacja nauki

a) Uczestnictwo w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

- 1) Gamian A, Witkowska D, Mieszala M, **Staniszewska M**, Przondo-Mordarska A, 20-22 January 1999, Fimbriae as a carrier for antibacterial vaccines, Leopoldina symposium "Bacterial pathogenesis – modern approaches", Wrocław, Poland
- 2) **Staniszewska M**, Gamian A, 30 June-5 July 2001, Studies on advanced glycation end products formed under high pressure, 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Lisbon, Portugal
- 3) Witkowska D, **Staniszewska M**, Gorczyca W, Pietkiewicz J, Maslowski L, Gamian A, 30 June-5 July 2001, Molecular mimicry of enterobacterial outer membrane proteins with some human tissue, 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Lisbon, Portugal
- 4) Leszek J, **Staniszewska M**, Gamian, A, Plasma protein glycation in Alzheimer's disease and Vascular dementia, 3rd International Congress on Vascular Dementia, OCT 23-26 2003 Prague, Czech Republic
- 5) Konopacka M, Rogoliński J, Maniakowski Z, **Staniszewska M**, Sowula E, Witkowska D, Gamian A, 16–20 September 2003, Estimation of the genotoxic properties of novel class of advanced glycation end products (AGE) by measuring micronuclei in human lymphocytes in vitro, 39th Meeting of the Polish Biochemical Society, Gdańsk, Poland
- 6) Bednarz I, Pietkiewicz J, **Staniszewska M**, Danielewicz R, Gamian A, 26 June -1 July 2004, Nonenzymatic glycation of human muscle-specific enolase by methylglyoxal, 29th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Wrocław, Poland
- 7) Witkowska D, Maslowska E, Mieszala M, **Staniszewska M**, Szostko B, Gamian A, 2-7 July 2005, Enterobacterial 38 kDa major outer membrane protein is immunoreactive with human IgG antibody of umbilical cord plasma and sera of children and adults, 30th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Budapest, Hungary
- 8) **Staniszewska M**, Picur B, Kaczmarek A, Gudra T, Gamian A, 2005, Advanced glycation end-products synthesized in the dry reaction at high temperature contain epitopes interacting with antibodies present in human serum, 13th European Carbohydrate Symposium, Bratislava, Slovakia
- 9) **Staniszewska M**, Nagaraj R, 1-5 May 2005, 3-Hydroxykynurenine-Mediated Modification of Lens Proteins: Detection by a Monoclonal Antibody, ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA

AUTOREFERAT
Z WYKAZEM INNYCH OSIĄGNIĘĆ ZAWODOWYCH
Magdalena Staniszewska

- 10) **Staniszewska M**, Nagaraj R, 30 April-1 May 2006, Induction of Glyoxalase I in Diabetic Mouse Lenses, ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA

- 11) **Staniszewska M**, Nagaraj R, 6-10 May 2007, Detection of Kynurenine-Modified Proteins in the Human Lens Using a Monoclonal Antibody, ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA

- 12) Nagaraj RH, **Staniszewska M**, Biswas A, Butler H, Reneker L, 6-10 May 2007, Over-Expression of Glyoxalase I Inhibits AGE Formation in the Mouse Lens, ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA

- 13) Nagaraj R, **Staniszewska M**, Smith D, Matsuyama S, 6th June 2007, Anti-apoptotic Proteins in Human Retinal Capillary Cells: Role in High Glucose Induced Cell Death, 13th Annual Faculty, Resident & Alumni Research Day, CWRU, Cleveland, OH, USA

- 14) Mailankot M, **Staniszewska M**, Butler H, Reneker L, Nagaraj RH, December 1 – 5, 2007, Indoleamine 2,3-dioxygenase Over-expression in the Lens, US – Japan Cooperative Cataract Research Group Meeting, Kona, Hawaii, USA

- 15) **Staniszewska M**, Gu X, Romano C, Kazlauskas A, 2-6 May 2010, The composition of pathological vessels and changes in the ILM that are caused by oxygen-induced retinopathy in rats, ARVO, Fort Lauderdale, FL, USA

- 16) Pierce E, Falk MJ, Nakamaru-Ogiso E, Kannabrian C, Fonseca-Kelly Z, Chakarova C, Audo I, Waseem N, Zeitz C, **Staniszewska M**, Shukla R, Palavalli L, Mohand-Said S, Jalali S, Webster AR, Moore AT, Perin JC, Place E, Ostrovsky J, Consugar M, Sahel J-A, Bhattacharya S, Berson EL, Liu Q, Gai X, Zhang Q, July 16 - 21, 2012, NMNAT1 Mutations Cause Leber Congenital Amaurosis at the LCA9 Locus, XV international symposium on retinal degeneration RD2012, Bad Gögging, Bavaria, Germany

- 17) Katzenellenbogen E, Gorska-Fraczek S, Kocharova NA, Knirel YA, **Staniszewska M**, Shashkov AS, Gamian A, 2-7 September 2012, Immunochemical Studies on the O-antigens of complex Citrobacter serogroups O3 and O8, 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Suzdal, Russia

- 18) **Staniszewska M**, Consugar M, Farkas M, Pierce E, 5-9 May 2013, Oligonucleotide-mediated gene correction in human primary fibroblasts, ARVO Seattle, WA, USA

- 19) **Staniszewska M**, Taub D, Pierce E, Liu Q, May 3-8 2014, Deficiency of tetratricopeptide repeat domain 21B (Ttc21B) leads to early onset of photoreceptor cell death, ARVO, Orlando FL, USA

- 20) Liu Q, **Staniszewska M**, Taub D, Pierce E, Tetratricopeptide repeat domain 21B (TTC21B) is required for the organization and maintenance of outer segment structure, XVI International Symposium On Retinal Degeneration RD2014, July 13–18, 2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, CA, USA

- 21) Greenwald SH, Bowl M, **Staniszewska M**, Pierce E, A model of NMNAT Leber Congenital Amaurosis, XVI International Symposium On Retinal Degeneration RD2014, July 13–18, 2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, CA, USA

b) Przyznane międzynarodowe i krajowe patenty

- 1) Gamian A, **Staniszewska M**, 2005, Sposób otrzymywania diagnostycznego preparatu immunologicznego i oznaczania poziomu zaawansowanej glikacji w surowicy i próbkach biologicznych z użyciem specyficznych testów immunologicznych.
Patent krajowy PAT202257
Indywidualny wkład w wynalazek: 70%, główny udział w opracowaniu pomysłu testu, metodologii pomiaru, opracowania testu oraz przygotowaniu aplikacji.
- 2) Kazlauskas A, **Staniszewska M**, Romano C, Landers R, Bingaman, 2011, Compositions and Methods For Treatment of Angiogenesis-Associated Ocular Disorders,
Patent międzynarodowy US8722015
Indywidualny wkład w wynalazek: 60%, główny udział w opracowaniu pomysłu i testu oraz przygotowaniu aplikacji.
- 3) Pietkiewicz J, Szydelko A, Dzierzba K, Danielewicz R, **Staniszewska M**, Bartys A, Gamian A, 2013, Pure albumin and its method of preparation and detection,
Patent międzynarodowy WO2013050830 A1C
Indywidualny wkład w wynalazek: 15%, udział w opracowaniu metodologii oczyszczania albuminy.

25 lutego 2015 roku
Data

Magdalena Staniszewska

dr Magdalena Staniszewska