



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

**Dr Agnieszka Robaszkiewicz**

# **AUTOREFERAT**

Katedra Biofizyki Ogólnej  
Instytut Biofizyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, styczeń 2019

**1. Imię i Nazwisko**

Agnieszka Robaszkiewicz

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

- 2007 – magister biologii w dyscyplinie biofizyka

Praca wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego na temat: „Morfologiczne i funkcjonalne zmiany w erytrocytach i komórkach linii A549 poddanych działaniu N -chloroaminokwasów i kwasu podchloraowego.” pod kierunkiem prof. dr hab. Mirosława Soszyńskiego

- 2012 – doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka

Praca wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego na temat: „Charakterystyka cytotoksycznego działania chlorohydrynu fosfatydylochiny w wybranych komórkach ludzkich w warunkach *in vitro*.” pod kierunkiem prof. dr hab. Mirosława Soszyńskiego

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

2007 – 2012	doktorantka, Stacjonarne Studium Doktoranckie Biochemiczno-Biofizyczne Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
2009 – 2010	asystent w Katedrze Genetyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
2011 – 2013	pracownik naukowy w Katedrze Chemii Medycznej Uniwersytetu w Debreczynie, Węgry
2012 - 2016	adiunkt w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
2013 – 2014	pracownik naukowy/stypendysta w Instytucie Biochemii Weterynaryjnej i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Zurychu, Szwajcaria
Od 2016 r	adiunkt w Katedrze Biofizyki Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
08-12.2017	pracownik naukowy w Katedrze Chemii Medycznej Uniwersytetu w Debreczynie, Węgry

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**4a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Zmiany poziomu PARP1 warunkowane przebiegiem cyklu komórkowego i ich rola  
w regulowaniu procesu różnicowania i fenotypu komórek**

Na prezentowane osiągnięcie naukowe składa się cykl 9-ciu prac wymienionych w punkcie 4b (kopie publikacji znajdują się w Załączniku 4, a oświadczenie współautorów w Załączniku 5).

**4b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

- 4b1) Tokarz P., Płoszaj T., Regdon Z., Virág L., **Robaszkiewicz A.**, "PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human pro-inflammatory macrophages from death under an oxidative condition", *Free Radic Biol Med.* 2019; 131: 218-224; doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.004.

IF<sub>2017</sub>= 6.020, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu środków finansowych na ich wykonanie, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej i bioinformatycznej) przedstawionych na wykresach 1A-B, 2, 3A-B i 3D-E, 4A-E oraz w suplementach, koordynowaniu pracy pozostałych współautorów, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

- 4b2) Pietrzak J., Płoszaj T., Pułaski Ł., **Robaszkiewicz A.**, "EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages" *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019; doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.10.019.

IF<sub>2017</sub>= 5.179, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu środków finansowych na ich wykonanie, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej i bioinformatycznej) przedstawionych na wykresach 1C, 1F, 1G, 1I-J, 2A-F, 2H-I, 2K-N, 3, 4A-E, 4G-J oraz w suplementach (poza wykresem 1A), koordynowaniu pracy pozostałych współautorów, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

- 4b3) Pietrzak J., Spickett C.M., Płoszaj T., Virág L., **Robaszkiewicz A.**, "PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment." *Redox Biol.* 2018; 18:1-5; doi: 10.1016/j.redox.2018.05.017.

IF<sub>2017</sub>= 7.126, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji publikacji, wybraniu opisywanych zagadnień, przygotowaniu tekstu publikacji oraz rysunków 1 i 2, koordynowaniu pracy pozostałych współautorów, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 55%.*

- 4b4) **Robaszkiewicz A.**, Wiśnik E., Regdon Z., Chmielewska K., Virág L. „PARP1 facilitates EP300 recruitment to the promoters of the subset of RBL2-dependent genes.” *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018; 1861(1):41-53; doi: 10.1016/j.bbagr.2017.12.001.

IF<sub>2017</sub>= 5.179, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu środków finansowych na ich wykonanie, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej i bioinformatycznej) przedstawionych na wykresach 1A-C, 2E-J, 3A-C, 3F-K, 4C-T, 5A-I oraz w suplementach (poza suplementem Tabela 1, suplementem wykres 1A, 4A-E), koordynowaniu pracy pozostałych współautorów i weryfikowaniu uzyskiwanych wyników, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

- 4b5) Tempka D., Tokarz P., Chmielewska K., Kluska M., Pietrzak J., Rygielska Ż., Virág L., **Robaszkiewicz A.**, "Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to anticancer drug-induced death by impairing OGG1-dependent base excision repair." *Redox Biol.* 2018; 15:316-326; doi: 10.1016/j.redox.2017.12.017.

IF<sub>2017</sub>= 7.126, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu środków finansowych na ich wykonanie, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej) przedstawionych na wykresach 1A-B, 1D, 1F, 2A-E, 3, 4C-D oraz w suplementach (poza wykresami suplement 1D, 3C i 3E), koordynowaniu pracy pozostałych współautorów i weryfikowaniu uzyskiwanych wyników, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

- 4b6) Wiśnik E., Płoszaj T., **Robaszkiewicz A.**, „Downregulation of PARP1 transcription by promoter-associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of pluripotency stem cell factors in human monocytes.” *Sci Rep.* 2017; 25;7(1):9483; doi: 10.1038/s41598-017-10307-z.

IF<sub>2017</sub>= 4.122, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zdobyciu środków finansowych na ich wykonanie, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej i bioinformatycznej) przedstawionych na wykresach 1, 2A, 2C, 3A-B, 3G-R, 4K-T, 5 oraz w suplementach (poza wykresami suplement 1B-C, 1E-K, 2D, 3A-B, 3A-B, 3F-H, 3M, 4E-H, 4L, 7A-D i tabelką 1), koordynowaniu pracy pozostałych współautorów i weryfikowaniu uzyskiwanych wyników, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 78%.*

- 4b7) Robaszkiewicz A.,** Qu C., Wisnik E., Ploszaj T., Mirsaidi A., Kunze F.A., Richards P.J., Cinelli P., Mbalaviele G., Hottiger M.O., "ARTD1 regulates osteoclastogenesis and bone homeostasis by dampening NF- $\kappa$ B-dependent transcription of IL-1 $\beta$ ." *Sci Rep.* 2016; 17;6:21131; doi: 10.1038/srep21131.

IF<sub>2016</sub>= 4.259, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu planu badań, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej) przedstawionych na wykresach 1-4 i 6 oraz w suplementach (poza wykresem 4) oraz na przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 40%.*

- 4b8) Robaszkiewicz A.,** Valkó Z., Kovács K., Hegedűs C., Bakondi E., Bai P., Virág L., "The role of p38 signaling and poly(ADP-ribose)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway." *Free Radic Biol Med.* 2014; 76:69-79; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.027.

IF<sub>2014</sub>= 5.736, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu planu badań, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej) przedstawionych na wykresach 1A, 2, 3, 4, 5 i 6 oraz w suplementach, a także na przygotowaniu manuskryptu.*

*Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

- 4b9) Robaszkiewicz A.,** Erdélyi K., Kovács K., Kovács I., Bai P., Rajnavölgyi E., Virág L., "Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribose)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death." *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(8):1552-64; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.567.

IF<sub>2012</sub>= 5.271, MNiSW<sub>2016</sub>= 40 pkt

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu planu badań, przeprowadzeniu eksperymentów i opracowaniu danych (w tym analizy statystycznej) przedstawionych na wykresach 1- 3, 5-7 oraz w suplementach, a także na przygotowaniu manuskryptu.*

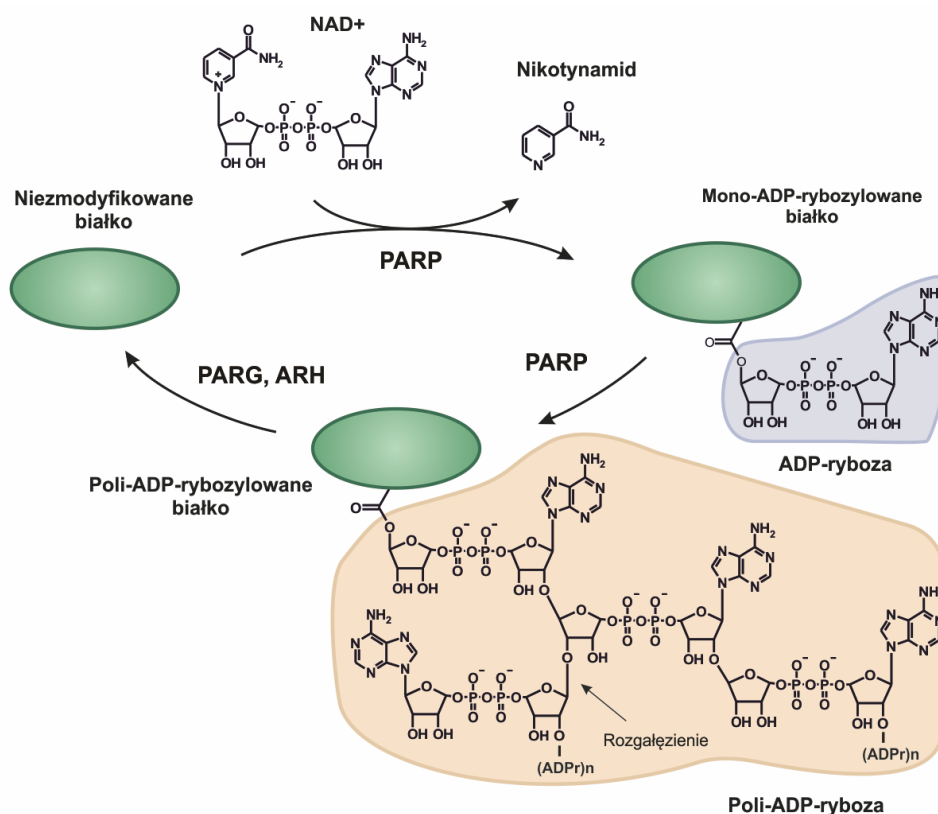
*Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

Łączny współczynnik oddziaływania publikacji (zgodny z rokiem ich opublikowania) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego IF = 50.018; MNiSW = 360 pkt; liczba cytowań (bez autocytowań): 41

**4c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

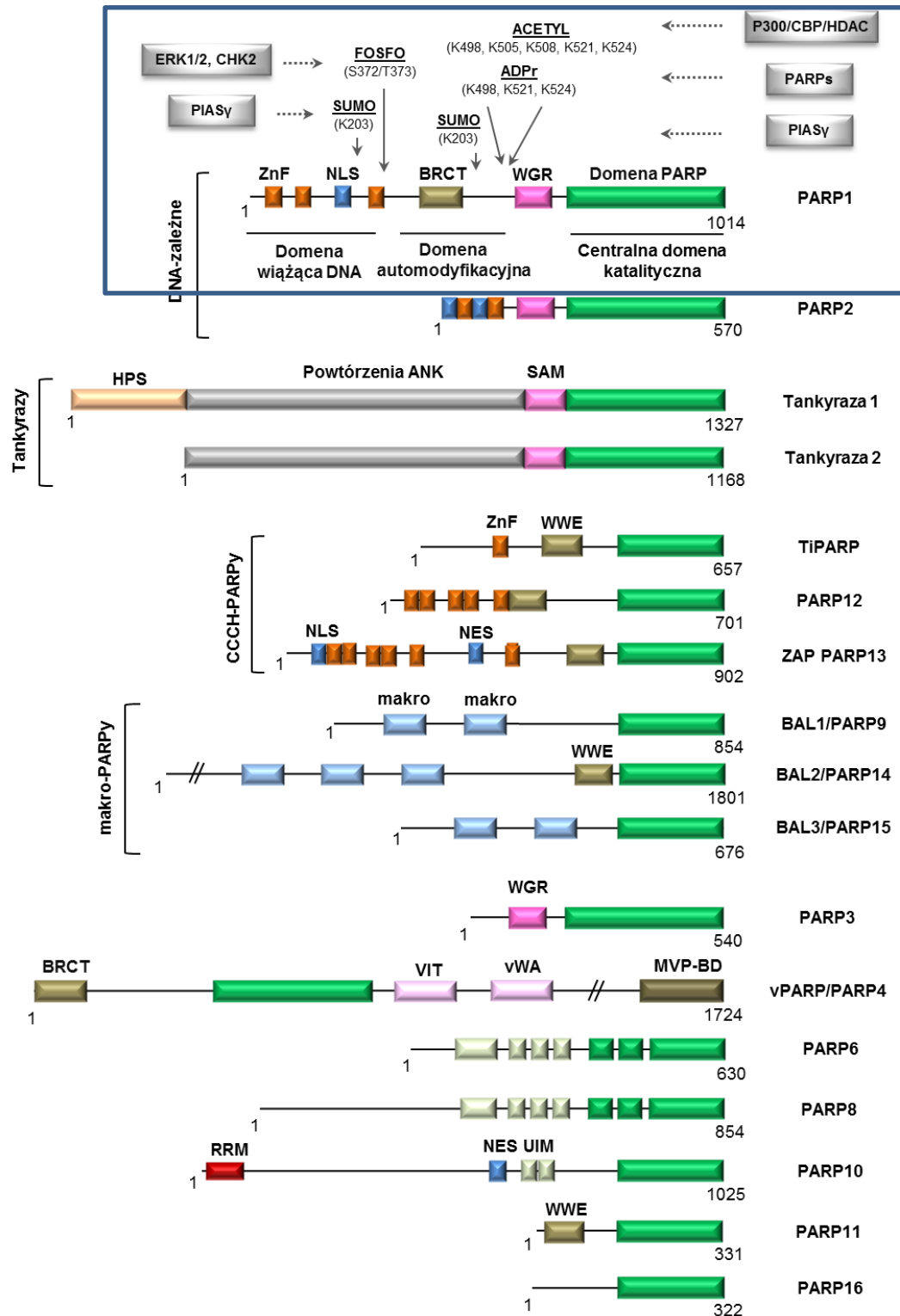
**Wprowadzenie do tematyki badań:**

Pierwsze doniesienia o procesie ADP-rybozylacji, a co za tym idzie o enzymach zaangażowanych w metabolizm tej potranslacyjnej modyfikacji, pochodzą z lat sześćdziesiątych poprzedniego wieku, kiedy to zaobserwowano, że cząsteczka ADP-rybozy może hamować syntezę białek i formować polimery w obecności DNA [1]. Reakcje ADP-rybozylacji przeprowadzają ADP-rybozylotransferazy, które katalizują przeniesienie cząsteczki ADP-rybozy pochodzącej z NAD<sup>+</sup> na reszty asparaginy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, argininy, lizyny, cysteiny i seryny. Enzymy posiadające zdolność do poli-ADP-rybozylacji przyłączają kolejne cząsteczki ADP-rybozy tworząc łańcuchy i polimery, które powstają dzięki wiązaniom glikozydowym między C1 rybozy monomeru ADP-rybozy (powstającego z NAD<sup>+</sup> po odłączeniu amidu kwasu nikotynowego), a C2' rybozy kolejnego przyłączonego monomeru (ryboza – ryboza 1'' – 2'') (Rycina 1). W warunkach *in vitro* polimery osiągają długość 200-400 jednostek ADP-rybozy, a rozgałęzienia pojawiają co 20-50 jednostek [2]. ADP-rybozy usuwane są przez glikohydrolazę poli-ADP-rybozy (PARG), terminalną glikohydrolazę ADP-rybozy 1 (TARG1), ADP-rybozohydrolasę 1 i 3 (ARH1 i ARH3), makrodomeny D1 i D2 oraz hydrolazy nudix 9 i 16 (NUDT9 i NUDT16).



Rycina 1. Schemat tworzenia i usuwania mono- i poli-ADP-rybozy z reszt aminokwasów

U ludzi rodzina enzymów posiadających domenę katalityczną do przeprowadzania reakcji mono-i poli-ADP-rybozylacji składa się z 16 białek występujących pod wspólną nazwą polimeraz poli-ADP-rybozy (PARP1-16), chociaż niektóre enzymy posiadają wyłącznie zdolność do mono-ADP-rybozylacji. Dwa białka z tej rodziny: PARP5a i PARP5b znane są jako tankyrazy (odpowiednio tankyaza 1 i tankyaza 2), a PARP9 i PARP13 nie wykazują aktywności enzymatycznej (Rycina 2) [3].



Rycina 2. Schemat budowy enzymów z rodziny PARP oraz modyfikacje potranslacyjne, które mogą pojawiać się w cząsteczce PARP1 i wpływać na aktywność enzymu

Według danych literaturowych opartych na próbach eksperymentalnego oszacowania udziału poszczególnych enzymów w procesie ADP-rybozylacji białko PARP1 odpowiada za syntezę około 80% polimerów ADP-rybozy w komórkach. W swojej strukturze białko to oprócz centrum katalitycznego posiada także domenę oddziałującą z DNA, a w jej obrębie 3 palce cynkowe (ZnF) oraz sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) warunkujący występowanie większości cząsteczek białka na terenie jądra komórkowego. Fragment pomiędzy domeną katalityczną a oddziałującą z DNA obejmuje kolejny funkcjonalny element – domenę automodyfikacyjną (BRCT), która jest akceptorem polimerów ADP-rybozy syntetyzowanych w następstwie aktywacji enzymu oraz platformą do bezpośrednich interakcji z białkami zaangażowanymi m.in. w naprawę uszkodzeń DNA (np. XRCC1, topoiizomerazy 1) oraz w sygnalizację komórkową [4, 5].

Aktywacja enzymu jest najczęściej indukowana modyfikacjami struktury DNA takimi jak pęknięcia jedno- i dwuniciowe, struktury krzyżowe, superzwinięcia, szpilki do włosów czy addukty spowodowane przez czynniki alkilujące. Są one rozpoznawane przez dwa N-terminalne palce cynkowe powodujące zmianę konformacji enzymu i aktywację domeny katalitycznej [6]. Domena WGR bogata w tryptofan, glicynę i argininę umożliwia aktywację PARP1 przez RNA [7]. Na aktywność enzymu wpływają również modyfikacje potranslacyjne takie jak mono- i poli-ADP-rybozylacja, fosforylacja, acetylacja i deacetylacja, sumoilacja oraz interakcje z białkami takimi jak HES1 czy KIF4 (Rycina 2) [8-11].

Dzięki wymienionym wyżej domenom strukturalnym i funkcjonalnym umożliwiającym białku PARP1 bezpośrednią fizyczną interakcję z DNA i białkami oraz poli-ADP-rybozylację tych ostatnich, która wpływa na właściwości białek akceptorowych (strukturę, ładunek, aktywność), enzym ten uczestniczy w przebiegu wielu wewnątrzkomórkowych procesów [12]. W poprzedniej dekadzie najwięcej uwagi poświęcono badaniu roli PARP1 w naprawie uszkodzeń DNA przez wzgląd na potencjalne znaczenie kliniczne i możliwość praktycznego zastosowania inhibitorów PARP1 w terapiach przeciwnowotworowych. Wykazano, że enzym ten jest ważnym elementem większości znanych systemów usuwających uszkodzone zasady azotowe (z ang. base excision repair - BER), naprawy pęknięć jednoniciowych (z ang. single strand break repair - SSB), homologicznej rekombinacji (z ang. homologous recombination – HR), alternatywnej naprawy przez niehomologiczne łączenie końców (alternative nonhomologous end-joining - alt-NHEJ), ale zapobiega aktywacji klasycznej ścieżki NHEJ powodującej utratę fragmentów genomu [13]. Badania w układach *in vitro* potwierdziły przeciwnowotworowe właściwości inhibitorów PARP1. Do chwili obecnej 4 z nich (olaparib – Lynparza<sup>®</sup>, niraparib – Zejula<sup>®</sup>, rukaparib - Rubraka<sup>®</sup>, talazoparib – Talzenna<sup>®</sup>) znalazły zastosowanie w monoterapiach i terapiach skojarzonych nowotworów piersi i jajników, a kilka innych inhibitorów (veliparib, BMN673) znajduje się w fazie badań klinicznych, które rozszerzane są na inne typy nowotworów m.in. głowy i szyi, hematologiczne czy glejaki [14, 15]. Związki te są dobrze tolerowane przez pacjentów, chociaż ze względu na stosunkowo krótki okres jaki upłynął od ich wprowadzenia do leczenia nowotworów nie można wykluczyć nieznanych dotąd efektów ubocznych, szczególnie w przypadku ich długiego stosowania. Część inhibitorów oprócz obniżania aktywności PARP1 wykazuje właściwości „pułapek” DNA wiążących enzym w kwasem nukleinowym, co daje dodatkowo możliwość modulowania ekspresją genów, których aktywność transkrypcyjna uwarunkowana jest obecnością białka PARP1 na chromatynie w regionach regulatorowych genów [16].



PARP1 jest udokumentowanym kofaktorem i komponentem maszynerii transkrypcyjnej oraz elementem determinującym oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z regionami regulatorowymi genów. Działanie PARP1 na chromatynie obejmuje zarówno fizyczne interakcje z białkami i DNA, które mogą być regulowane na poziomie chromatyny przez wspomniane wcześniej inhibitory o działaniu pułapkującym, jak i aktywność enzymatyczną [5]. Poli-ADP-rybozylacja definiuje skład chromatyny, działanie enzymów remodelujących chromatynę i aktywność polimerazy RNA, a ostatnio jest rozważana także jako nowy element kodu epigenetycznego, który podobnie jak inne potranslacyjne modyfikacje histonów reguluje dostępność DNA dla maszynerii transkrypcyjnej. Regulowanie ekspresji genów przez PARP1 odbywa się również na etapie splicingu, ponieważ obecność enzymu na granicy pomiędzy eksonami i intronami umożliwia powstawanie alternatywnych transkryptów [17]. Regulowanie ekspresji genów na różnych poziomach wpływa na skład wewnątrzkomórkowego proteomu, w tym na kompozycję mediatorów przekazujących sygnały ze środowiska do wnętrza komórki, które także oddziałują z PARP1 i ulegają ADP-rybozylacji zmieniając strukturę, aktywność lub interakcje. Dalej, reakcje ADP-rybozylacji wykorzystujące jako substrat NAD<sup>+</sup> pełniący funkcję kofaktora glikolizy, cyku Krebsa czy łańcucha oddechowego wpływają na metabolizm komórki, a pośrednio także na stopień acetylacji białek poprzez hamowanie aktywności NAD-zależnych deacetylaz – sirtuin kontrolujących oprócz metabolizmu również ekspresję genów [18]. Tych kilka przykładów uwidacznia zakres wzajemnych zależności pomiędzy wewnątrzkomórkowymi procesami regulowanymi przez PARP1, co daje możliwość ich modulowania poprzez regulowanie poziomu i aktywności białka PARP1.

PARP1 decyduje o losie komórek: o ich śmierci lub przeżyciu, zachowaniu pluripotencji lub rozpoczęciu procesu różnicowania. Intensywna poli-ADP-rybozylacja powoduje przemieszczenie czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów do jądra komórkowego inicjując w ten sposób kondensację chromatyny i śmierć komórki na drodze nekroptozy zależnej od obecności polimeru PAR (o nazwie parthanatos). Aczkolwiek, dane literaturowe wskazują na udział PARP1 w przebiegu innych typów śmierci komórek m.in. apoptozy i autofagii [19]. W proliferujących komórkach embrionalnych wysoki poziom PARP1 zapobiega ich różnicowaniu i pomaga im zachować pluripotencję, czyli zdolność do dawania początku różnym typom komórek efektorowych. PARP1 podtrzymuje ekspresję czynników transkrypcyjnych *Nanog*, *Pou5f1*, *Sella* i *Zfp43*, a spadek poziomu PARP1 nasila różnicowanie komórek embrionalnych we wszystkie trzy listki zarodkowe [20]. Za udziałem tego enzymu w determinowaniu losu komórek przemawia również fakt, że indukowana pluripotencja może zostać uzyskana jedynie w obecności białka PARP1, które umożliwia aktywację transkrypcji genów warunkujących pluripotencję (*Nanog* and *Esrrb*), a w komórkach proliferujących enzym ten nasila transkrypcję czynnika wzrostu FGF4, który odpowiedzialny jest m.in. za samoodnawianie się komórek [21, 22]. Różnicowaniu przynajmniej niektórych typów komórek towarzyszy znaczny spadek poziomu ekspresji genu *PARP1*, który pozwala komórkom różnicującym się osiągnięcie pożądanego fenotypu i sprawowanie ściśle określonej funkcji w organizmie [23].

Warunkiem niezbędnym do zachodzenia procesu różnicowania wszystkich typów komórek jest zmiana epigenomu, a w konsekwencji transkryptomu i proteomu. Zmiana zestawu białek w powstających komórkach efektorowych wymaga aktywacji sekwencji promotorowych kodujących je genów a często również dystalnych wzmacniaczy, w obrębie których dochodzi do zmian struktury

chromatyny przez modyfikacje potranslacyjne histonów oraz przez zmianę kompozycji czynników transkrypcyjnych i kompleksów remodelujących chromatynę. Jednocześnie wyciszeniu ulegają czynniki transkrypcyjne warunkujące pluripotencję, a w większości przypadków również geny kodujące białka odpowiedzialne za proliferację [24-26].

#### Literatura:

1. Liu, C., X. Yu, *ADP-ribosyltransferases and poly ADP-ribosylation*. *Curr Protein Pept Sci*, 2015. **16**(6): p. 491-501.
2. Li, M., X. Yu, *The role of poly(ADP-ribosylation) in DNA damage response and cancer chemotherapy*. *Oncogene*, 2015. **34**(26): p. 3349-56.
3. Hakme, A., H.K. Wong, F. Dantzer, V. Schreiber, *The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series*. *EMBO Rep*, 2008. **9**(11): p. 1094-100.
4. Loeffler, P.A., M.J. Cuneo, G.A. Mueller, E.F. DeRose, S.A. Gabel, R.E. London, *Structural studies of the PARP-1 BRCT domain*. *BMC Struct Biol*, 2011. **11**: p. 37.
5. Ciccarone, F., M. Zampieri, P. Caiafa, *PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains*. *Semin Cell Dev Biol*, 2017. **63**: p. 123-134.
6. Eustermann, S., W.F. Wu, M.F. Langelier, J.C. Yang, L.E. Easton, A.A. Riccio, J.M. Pascal, D. Neuhaus, *Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1*. *Mol Cell*, 2015. **60**(5): p. 742-754.
7. Huambachano, O., F. Herrera, A. Rancourt, M.S. Satoh, *Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(9): p. 7149-60.
8. Hsu, P.C., R.K. Gopinath, Y.A. Hsueh, S.Y. Shieh, *CHK2-mediated regulation of PARP1 in oxidative DNA damage response*. *Oncogene*, 2018.
9. Kauppinen, T.M., W.Y. Chan, S.W. Suh, A.K. Wiggins, E.J. Huang, R.A. Swanson, *Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(18): p. 7136-41.
10. Zilio, N., C.T. Williamson, S. Eustermann, R. Shah, S.C. West, D. Neuhaus, H.D. Ulrich, *DNA-dependent SUMO modification of PARP-1*. *DNA Repair (Amst)*, 2013. **12**(9): p. 761-73.
11. Kannan, S., W. Fang, G. Song, C.G. Mullighan, R. Hammitt, J. McMurray, P.A. Zweidler-McKay, *Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type-specific mechanism for tumor suppression*. *Blood*, 2011. **117**(10): p. 2891-900.
12. Gupte, R., Z. Liu, W.L. Kraus, *PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes*. *Genes Dev*, 2017. **31**(2): p. 101-126.
13. Pietrzak, J., C.M. Spickett, T. Ploszaj, L. Virag, A. Robaszkiewicz, *PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment*. *Redox Biol*, 2018. **18**: p. 1-5.

14. Administration, U.S.F.a.D., <https://www.fda.gov/>. 2018.
15. Medicine, N.U.N.L.o., <https://clinicaltrials.gov/>. 2018.
16. Shen, Y., M. Aoyagi-Scharber, B. Wang, *Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **353**(3): p. 446-57.
17. Matveeva, E., J. Maiorano, Q. Zhang, A.M. Eteleeb, P. Convertini, J. Chen, V. Infantino, S. Stamm, J. Wang, E.C. Rouchka, Y.N. Fondufe-Mittendorf, *Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing*. Cell Discov, 2016. **2**: p. 15046.
18. Luna, A., M.I. Aladjem, K.W. Kohn, *SIRT1/PARP1 crosstalk: connecting DNA damage and metabolism*. Genome Integr, 2013. **4**(1): p. 6.
19. Virag, L., A. Robaszkiewicz, J.M. Rodriguez-Vargas, F.J. Oliver, *Poly(ADP-ribose) signaling in cell death*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(6): p. 1153-67.
20. Roper, S.J., S. Chrysanthou, C.E. Senner, A. Sienerth, S. Gnan, A. Murray, M. Masutani, P. Latos, M. Hemberger, *ADP-ribosyltransferases Parp1 and Parp7 safeguard pluripotency of ES cells*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(14): p. 8914-27.
21. Gao, F., S.W. Kwon, Y. Zhao, Y. Jin, *PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22263-73.
22. Doege, C.A., K. Inoue, T. Yamashita, D.B. Rhee, S. Travis, R. Fujita, P. Guarnieri, G. Bhagat, W.B. Vanti, A. Shih, R.L. Levine, S. Nik, E.I. Chen, A. Abeliovich, *Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 652-5.
23. Olah, G., B. Szczesny, A. Brunyanski, I.A. Lopez-Garcia, D. Gero, Z. Radak, C. Szabo, *Differentiation-Associated Downregulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Expression in Myoblasts Serves to Increase Their Resistance to Oxidative Stress*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134227.
24. Dixon, J.R., I. Jung, S. Selvaraj, Y. Shen, J.E. Antosiewicz-Bourget, A.Y. Lee, Z. Ye, A. Kim, N. Rajagopal, W. Xie, Y. Diao, J. Liang, H. Zhao, V.V. Lobanenko, J.R. Ecker, J.A. Thomson, B. Ren, *Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 331-6.
25. Huang, J., K. Li, W. Cai, X. Liu, Y. Zhang, S.H. Orkin, J. Xu, G.C. Yuan, *Dissecting super-enhancer hierarchy based on chromatin interactions*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 943.
26. Dalton, S., *Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(10): p. 592-600.

**Cel badań:**

Celem badań obejmujących cykl dziewięciu przedstawianych prac było określenie roli białka PARP1 w warunkowaniu fenotypu i funkcji wybranych komórek ze zwróceniem szczególnej uwagi na proces różnicowania osteoblastów, osteoklastów, monocytów i makrofagów. Brane pod uwagę aspekty dotyczyły głównie udziału PARP1 w wewnątrzkomórkowej sygnalizacji oraz w regulowaniu transkrypcji zarówno w trakcie zachodzenia procesu różnicowania i polaryzacji jak i w komórkach już zróżnicowanych.

Równolegle prowadzone były badania nad zmianami poziomu ekspresji PARP1 w trakcie różnicowania monocytów i makrofagów, które miały na celu weryfikację hipotezy o konieczności represji genu *PARP1* dla powstawania i prawidłowego funkcjonowania komórek efektorowych oraz ewentualnego szerszego ujęcia molekularnych mechanizmów kontrolujących jego transkrypcję z wewnątrzkomórkowymi zmianami typowymi dla utraty pluripotencji i definiowania nowego, pożądanego fenotypu i funkcji.

**Charakterystyka osiągnięcia:****Opublikowany cykl 9 prac stanowi opracowanie 3 głównych zagadnień:**

1. Przebieg cyklu komórkowego determinuje poziom ekspresji genu *PARP1* - poznanie mechanizmu regulującego transkrypcję *PARP1* daje możliwość intencjonalnego modulowania poziomu tego enzymu w komórkach

- 4b2) Pietrzak J., Płoszaj T., Pułaski Ł., **Robaszkiewicz A.**, "EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages" *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019; doi: 10.1016/j.bbagr.2018.10.019.
- 4b3) Pietrzak J., Spickett CM, Płoszaj T, Virág L., **Robaszkiewicz A.**, "PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment." *Redox Biol.* 2018; 18:1-5; doi: 10.1016/j.redox.2018.05.017.
- 4b5) Tempka D., Tokarz P., Chmielewska K., Kluska M., Pietrzak J., Rygielska Ż., Virág L., **Robaszkiewicz A.**, "Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to anticancer drug-induced death by impairing OGG1-dependent base excision repair." *Redox Biol.* 2018; 15:316-326; doi: 10.1016/j.redox.2017.12.017.
- 4b6) Wiśnik E., Płoszaj T., **Robaszkiewicz A.**, „Downregulation of PARP1 transcription by promoter-associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of pluripotency stem cell factors in human monocytes." *Sci Rep.* 2017; 25;7(1):9483; doi: 10.1038/s41598-017-10307-z.

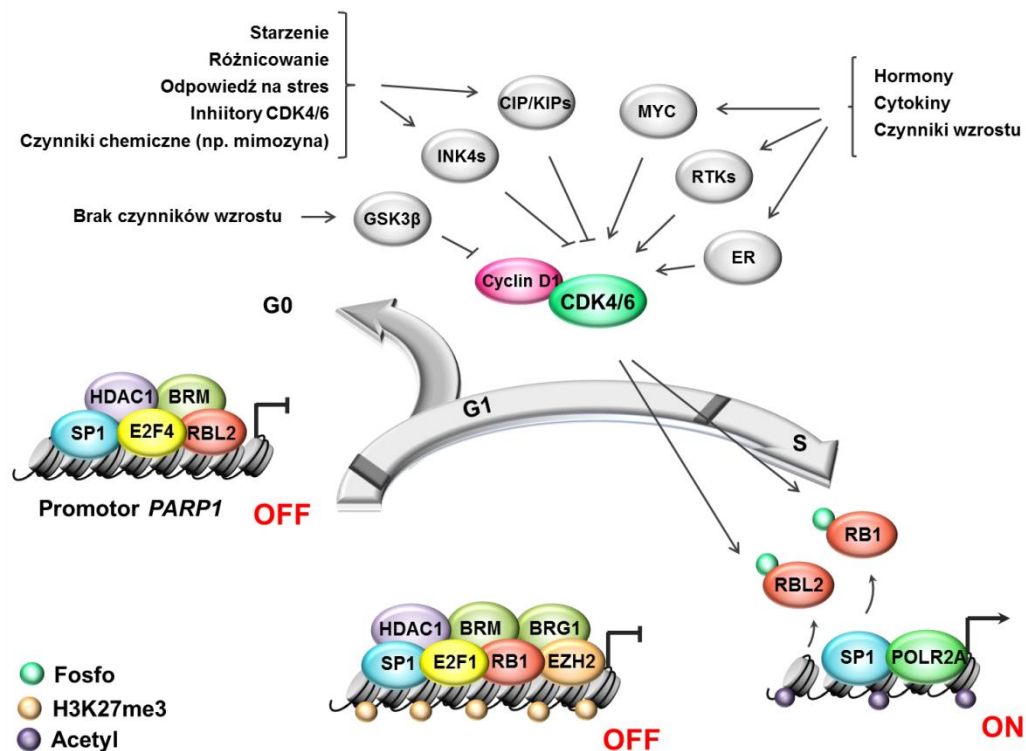
Jedną z cech charakterystycznych zachodzącego procesu różnicowania komórek macierzystych jest utrata zdolności do samoodtwarzania czyli proliferacji na rzecz nabierania nowych cech predysponujących nowopowstające komórki do pełnienia ściśle określonych funkcji w organizmie. Zatrzymanie cyklu komórkowego przed fazą S w fazie G1 lub G0 (przejście komórek w stan spoczynku) spowodowane jest hypofosforylacją białek z rodziny retinoblastoma (RB1, RBL2, RBL1), które w formie

defosforylowanej tworzą wielopodjednostkowe kompleksy represorów w obrębie sekwencji promotorowych genów znajdujących się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych E2F (E2F1-6) i kodujących białka odpowiedzialne m.in. za przejście komórek do fazy S [1]. Kompleksy zbudowane w oparciu o heterodimery RB1-E2F1-3 najczęściej wyciszają transkrypcję genów w komórkach zatrzymanych w fazie G1, podczas gdy kompleksy RBL1/2-E2F4/5 inhibują ekspresję w fazie G0 [2]. Heterodimerom RB-E2F towarzyszą inne białka i kompleksy enzymatyczne posiadające zdolność do remodelowania chromatyny (hBRM, BRG1, HDAC1, SUV39H1, LSD1) [1, 3].

Prowadzone przeze mnie badania wykazały, że różnicowaniu hemapoidalnych komórek macierzystych i progenitorowych (CD34+) oraz komórek linii THP-1 w monocytach towarzyszy obniżenie poziomu PARP1, które spowodowane jest represją kodującego go genu. Podobnie, zatrzymanie cyklu komórkowego proliferujących prekursorów przez pozbawienie komórek nukleotydów przed wejściem w fazę S (ale nie podczas zatrzymania podziałów w fazie G2) pociągało za sobą zahamowanie transkrypcji *PARP1* [4b6]. Sugerowało to, że aktywność transkrypcyjna badanego genu, którego produkt nie był bezpośrednio związany funkcjonalnie z przechodzeniem proliferujących komórek przez kolejne fazy cyklu, jest determinowana przebiegiem cyklu komórkowego. Analiza składu białkowego sekwencji promotorowej *PARP1* potwierdziła obecność kompleksów RBL2-E2F4 w komórkach, które opuściły cykl w wyniku różnicowania oraz kompleksów RB1-E2F1 w komórkach zatrzymanych w fazie G1. Zarówno w pierwszym jak i w drugim przypadku sekwencje promotorowe były deacetylowane przez deacetylazę histonów 1 (HDAC1) fizycznie oddziałującą z kompleksami retinoblastomy, ale jej inhibicja przywracała transkrypcję *PARP1* wyłącznie w komórkach zróżnicowanych sugerując obecność innego czynnika wyciszającego ekspresję genu w komórkach zatrzymanych w fazie G1. Tym elementem okazał się być kompleks Polycomb 2 (z ang. Polycomb Repressive Complex 2 – PRC2), a w szczególności metylaza EZH2 (z ang. Enhancer of Zeste Homolog 2), która metylując reszty lizyny 27 histonu H3 pozbawiała sekwencję promotorową aktywności transkrypcyjnej. Jednoczesna inhibicja HDAC1 i EZH2 w istotnym stopniu przywracała transkrypcję *PARP1*.

Zidentyfikowany w komórkach mieloidalnych mechanizm represji genu *PARP1* został zaobserwowany również w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (linia A549). W celu zatrzymania proliferacji komórek nowotworowych wykorzystano dobrze znane inhibitory kinaz zależnych od cyklin (CDK), które podobnie jak inhibitory PARP1 są stosowane w terapiach przeciwnowotworowych. Wiedząc, że aktywność kinazy 4 i 6 umożliwia komórkom przejście do fazy S dzięki hiperfosforylacji białek retinoblastomy prowadzącej do oddysocjowania kompleksów represora z sekwencji promotorowych genów E2F-zależnych, do zatrzymania komórek w fazie G1 wykorzystane zostały inhibitory CDK4/6: LEE011 (ribociclib) i PD0332991 (palbociclib). W przeciwieństwie do inhibitora CDK2 – NU6140, który uniemożliwiał podział komórek synchronizując je w fazie G2, obydwa inhibitory CDK4/6 powodowały znaczne ograniczenie transkrypcji *PARP1*, co przekładało się dalej na poziom białka [4b5]. Również w tych komórkach w skład kompleksu represora wchodziły białka RB1, E2F1, HDAC1 i kompleks PRC2, a sekwencja promotorowa *PARP1* ulegała deacetylacji przy jednoczesnym wzroście stopnia trzymetylacji lizyny 27 histonu H3. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że o ile poziom RB1 na promotorze *PARP1* był porównywalny bez względu na rodzaj zastosowanego inhibitora CDK4/6, to poziom E2F1, HDAC1, EZH2 i H3K27me3 był zdecydowanie

wyższy w komórkach traktowanych PD0332991 niż w komórkach traktowanych LEE011, przy jednocześnie porównywalnej deacetylacji histonów. Odzwierciedlało to stopień represji *PARP1*, który wyższy był dla inhibitora CDK4/6 indukującego silną trzymetylację histonu H3 w pozycji 27. Zestaw enzymów oraz poziom H3K27me3 doskonale odwzorowywał również wymagania, jakie musiały zostać spełnione w celu przywrócenia transkrypcji w komórkach zatrzymanych w fazie G1: dla komórek z niską trzymetylacją H3K27 wystarczający okazywał się inhibitor HDAC1, podczas gdy wysoka trzymetylacja H3K27 wymagała zastosowania inhibitora EZH2 w połączeniu z inhibitorem HDAC1.



Rycina 3. Zmiany zachodzące na promotorze *PARP1* w odpowiedzi komórek na zatrzymanie cyklu w fazie G1 oraz spowodowane różnicowaniem przejście do fazy G0 [4b3]

Dodatkowym elementem kompleksów represora opartych na białkach retinoblastoma występujących w obrębie sekwencji promotorowej *PARP1* w mieloidalnych komórkach zróżnicowanych i zatrzymanych w fazie G1 był kompleks enzymatyczny SWI/SNF, którego ATP-zależne enzymy (z ang. Brahma - BRM i Brahma-related gene 1 – BRG1) posiadają zdolność do zmiany gęstości nukleosomów poprzez ich usuwanie, wstawianie lub przesuwanie, co z kolei wpływa na wydajność transkrypcji. Choć komórki zróżnicowane różniły się od komórek zatrzymanych w cyklu rodzajem ATP-azy (BRM i BRG1 odpowiednio dla fazy G0 i G1) występującej na promotorze *PARP1*, żaden z enzymów nie wywierał wpływu na poziom transkrypcji *PARP1*, która silnie i negatywnie korelowała z gęstością histonów. Dopiero badanie mechanizmu odpowiedzialnego za derepresję *PARP1* podczas dalszego różnicowania monocytów w makrofagi ujawniło rolę kompleksu SWI/SNF. Okazał się on pełnić rolę aktywatora transkrypcji, którego działanie uwarunkowane jest stopniem acetylacji histonów. Ta z kolei była koregulowana przez acetylotransferazę histonów (EP300)



Najważniejsze informacje wynikające z badań nad opisywanym zagadnieniem:

- a) Transkrypcja genu *PARP1* ulega wyciszeniu w trakcie różnicowania hematopoidalnych komórek macierzystych i progenitorowych w monocyty, a następnie jest przywracana podczas różnicowania w makrofagi
- b) Zmiany te są ściśle uzależnione od przebiegu cyklu komórkowego: w komórkach zatrzymanych przed wejściem w fazę S kompleksy RB1-E2F1-HDAC1-SWI/SNF i RBL2-E2F4-HDAC1-SWI/SNF-PRC2 obniżają ekspresję *PARP1* poprzez deacetylację histonów i trzymetylację lizyny 27 histonu H3, podczas gdy w proliferujących makrofagach kompleksy EP300-HDAC1-SWI/SNF acetyluje, a następnie usuwają nukleosomy rozluźniając chromatynę i umożliwiając transkrypcję
- c) W przeciwieństwie do białek retinoblastomy, czynników E2F czy kompleksu PRC2, białka kompleksu EP300-HDAC1-SWI/SNF są stałymi elementami występującymi na promotorze *PARP1*, a zmiany statusu proliferacji komórek zmieniają aktywność poszczególnych podjednostek, przy czym to stopień acetylacji definiuje aktywność SWI/SNF
- d) Występowanie kompleksów EP300-HDAC1-SWI/SNF w sekwencjach promotorowych funkcjonalnie powiązanych genów, które charakteryzują się obecnością motywu dla czynników E2F oraz wysp CpG pozwala komórkom aktywować lub inaktywować określone szlaki w odpowiedzi na zmiany w przebiegu cyklu komórkowego
- e) Poznanie mechanizmu kontrolującego transkrypcję *PARP1* daje możliwość modulowania poziomu białka za pomocą niskocząsteczkowych inhibitorów enzymów występujących na chromatynie lub inhibitorów enzymów odpowiedzialnych za kontrolowanie przebiegu cyklu komórkowego

#### Literatura:

1. Giacinti, C., A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(38): p. 5220-7.
2. Liban, T.J., M.J. Thwaites, F.A. Dick, S.M. Rubin, *Structural Conservation and E2F Binding Specificity within the Retinoblastoma Pocket Protein Family*. *J Mol Biol*, 2016. **428**(20): p. 3960-3971.
3. Chau, C.M., Z. Deng, H. Kang, P.M. Lieberman, *Cell cycle association of the retinoblastoma protein Rb and the histone demethylase LSD1 with the Epstein-Barr virus latency promoter Cp*. *J Virol*, 2008. **82**(7): p. 3428-37.



## 2. Zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu PARP1 definiują fenotyp i funkcje komórek

- 4b1) Tokarz P., Płoszaj T., Regdon Z., Virág L., **Robaszekiewicz A.**, "PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human pro-inflammatory macrophages from death under an oxidative condition", *Free Radic Biol Med.* 2019; 131: 218-224; doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.004.
- 4b2) Pietrzak J., Płoszaj T., Pułaski Ł., **Robaszekiewicz A.**, "EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages" *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019; doi: 10.1016/j.bbagr.2018.10.019.
- 4b3) Pietrzak J., Spickett CM, Płoszaj T, Virág L., **Robaszekiewicz A.**, "PARP1 promoter links cell cycle progression with adaptation to oxidative environment." *Redox Biol.* 2018; 18:1-5; doi: 10.1016/j.redox.2018.05.017.
- 4b4) **Robaszekiewicz A.**, Wiśnik E., Regdon Z., Chmielewska K., Virág L. „PARP1 facilitates EP300 recruitment to the promoters of the subset of RBL2-dependent genes." *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018; 1861(1):41-53; doi: 10.1016/j.bbagr.2017.12.001.
- 4b5) Tempka D., Tokarz P., Chmielewska K., Kluska M., Pietrzak J., Rygielska Ż., Virág L., **Robaszekiewicz A.**, "Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to anticancer drug-induced death by impairing OGG1-dependent base excision repair." *Redox Biol.* 2018; 15:316-326; doi: 10.1016/j.redox.2017.12.017.
- 4b6) Wiśnik E., Płoszaj T., **Robaszekiewicz A.**, „Downregulation of PARP1 transcription by promoter-associated E2F4-RBL2-HDAC1-BRM complex contributes to repression of pluripotency stem cell factors in human monocytes." *Sci Rep.* 2017; 25;7(1):9483; doi: 10.1038/s41598-017-10307-z.

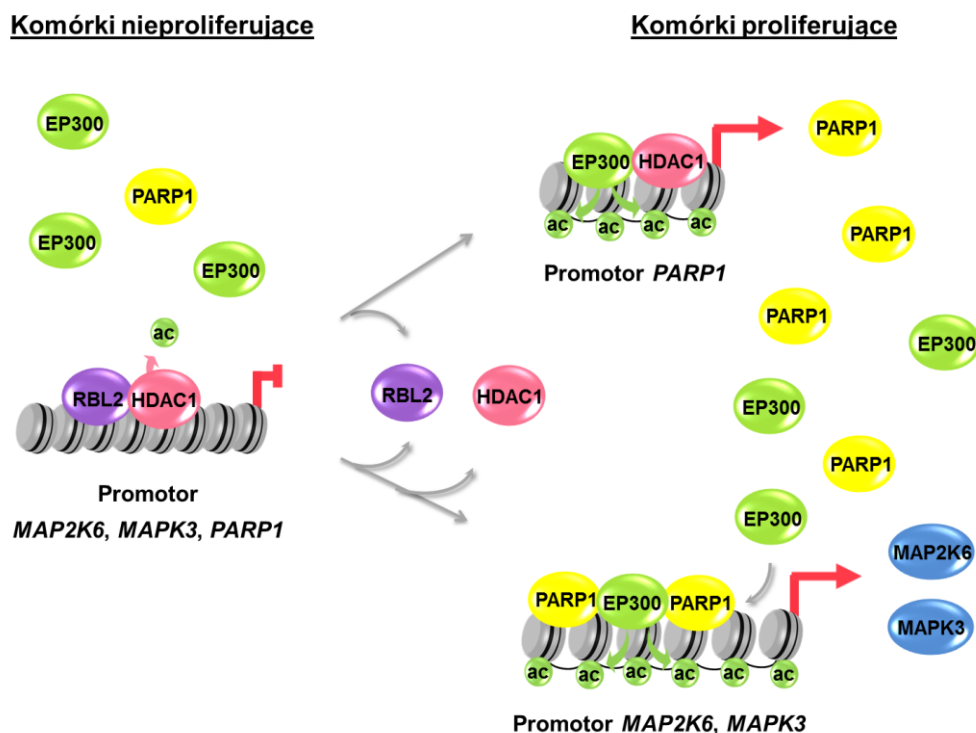
Jak opisano w poprzednim rozdziale, towarzyszące różnicowaniu lub intencjonalne zatrzymanie podziałów komórek powoduje zmiany w funkcjonowaniu komórek m.in. poprzez obniżenie ekspresji PARP1. Ze względu na udział tego enzymu w różnych wewnątrzkomórkowych procesach efekty jego braku przejawiają się na wielu płaszczyznach [4b3][1].

Samo zahamowanie proliferacji pozbawia komórki jednego z ważnych i bezbłędnych szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA – homologicznej rekombinacji [2]. Niski poziom PARP1 może w istotny sposób wpływać na systemy naprawy, których działanie oparte jest na fizycznym oddziaływaniu z enzymem lub na jego aktywności enzymatycznej. Badania prowadzone przez mój zespół wykazały, że represja *PARP1* wywołana inhibitorami CDK4/6 znacznie zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na działanie stresu oksydacyjnego wywołanego bezpośrednio działającym oksydantem ( $H_2O_2$ ) oraz lekami przeciwnowotworowymi (etopozydem i antracykliną nowej generacji – WP631) [4b5]. Wyciszenie *PARP1* obniżało aktywność glikozylazy 8-oxoguaniny (OGG1), zwiększając tym samym poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA wywołanych testowanymi oksydantami. Pociągało to za sobą zmniejszenie liczby żywych komórek w hodowli. Upośledzenie zależnej od OGG1 naprawy poprzez wycinanie zasad (OGG1-BER) w komórkach zatrzymanych w fazie G1 wynikało z braku poli-ADP-rybozylacji, która okazała się być niezbędna dla prawidłowego działania OGG1. W komórkach proliferujących stres oksydacyjny indukował fizyczną interakcję PARP1 z OGG1, która powodowała skuteczne usuwanie uszkodzonych zasad. Co ważne, wbrew powszechnie przyjętym założeniom opartym na fakcie, że OGG1 posiada właściwości endonukleazy, inhibicja tego enzymu w komórkach

zatrzymanych w fazie G1 powodowała istotny i porównywalny do działania inhibitora PARP1 wzrost pęknięć jednoniciowych DNA sugerując, że (a) inny i mniej swoisty enzym przejmuje rolę OGG1 lub (b) że aktywność OGG1 jest niezbędna do usuwania 8-oxoguaniny powstałej na końcach 3' pęknięć DNA wywołanych przez stres oksydacyjny i późniejszej ligacji dwóch końców [3].

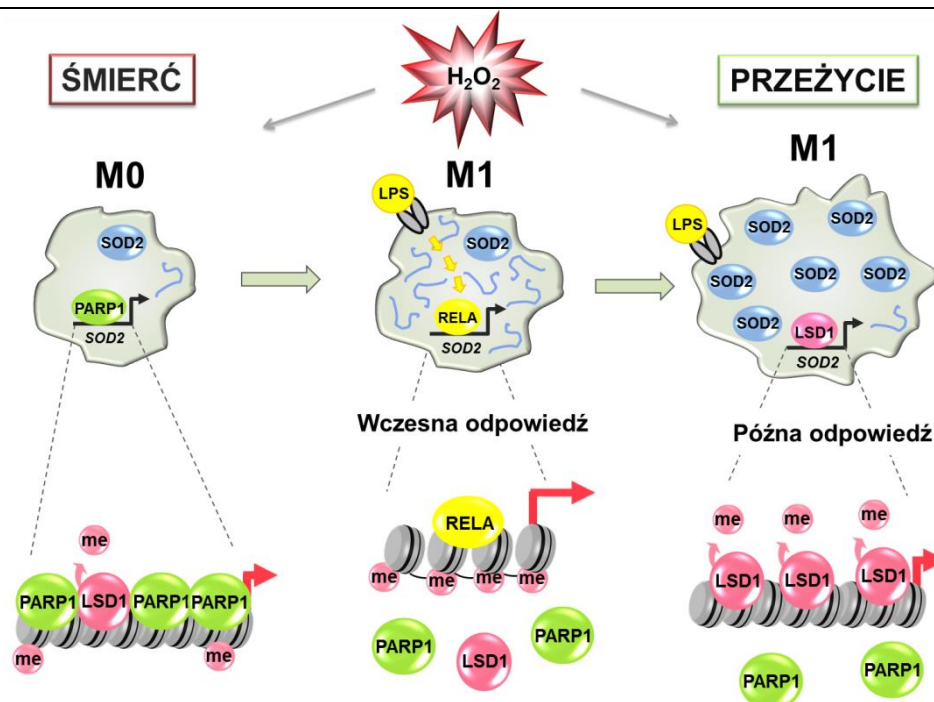
Kolejnym istotnym zagadnieniem jest zależne od PARP1 transkrypcyjne przeprogramowanie zachodzące w trakcie różnicowania komórek. Jak opisano w poprzednim rozdziale, poziom transkrypcji *PARP1* zmienia się na ścieżce różnicowania: hematopoidalne komórki macierzyste – monocyty – makrofagi ulegając najpierw represji, a później reaktywacji w wyniku zmian potencjału komórek do proliferacji. W trakcie różnicowania się ludzkich monocytów spadkowi ekspresji PARP1 towarzyszy wyciszenie genów kodujących czynniki odpowiedzialne za pluripotencję (*POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*, *ZFP42*) oraz fenotyp i właściwości prekursorów CD34+ (*RUNX1*, *GATA2*, *PAX5*) [4b6]. Zwiększenie poziomu białka PARP1 w monocytach poprzez wyciszenie białka RBL2 i inhibicję HDAC1 lub przez przejściową transfekcję wektorem ekspresyjnym w zróżnicowanych komórkach THP1 w istotny sposób zwiększało transkrypcję wszystkich genów, których produkty warunkują pluripotencję i samoodnawianie się komórek macierzystych. Wynik ten sugerował, że PARP1 pełni funkcję aktywatora ich transkrypcji, a represja PARP1 do której dochodzi w trakcie różnicowania monocytów pomaga wyciszyć ich ekspresję w trakcie różnicowania i utrzymać ją na bardzo niskim poziomie w komórkach zróżnicowanych.

PARP1 pełni funkcję zarówno aktywatora jak i represora ekspresji genów związanych ze szlakami biegnącymi w dół od receptorów TLR oraz receptorów powierzchniowych w monocytach, co wykazane zostało poprzez dalsze wyciszenie PARP1 [4b4]. Pomimo indukowanej różnicowaniem represji pozostający w monocytach poziom PARP1 okazał się być wystarczający do podtrzymywania ekspresji wielu genów związanych z prozapalnymi właściwościami tych komórek (m.in. cytokin, receptorów dla cytokin, i kinaz takich jak *IL1R2*, *IL18R1*, *IL1 $\beta$* , *MAPK1*, *AKT1* i wielu innych). Wyciszenie RBL2 i PARP1 w nieproliferujących monocytach pozwoliło wyłonić geny, których transkrypcja regulowana była przez PARP1 w sposób zależny od przebiegu cyklu komórkowego. Przykładami takich genów były kinazy *MAP2K6* i *MAPK3* oraz receptor *CD80*. W opisywanym modelu regulowania transkrypcji derepresja *PARP1* spowodowana wyciszeniem RBL2 powodowała wzrost poziomu białka PARP1, które wiązało się z sekwencjami promotorowymi wymienionych wyżej genów E2F-zależnych, powodowało ich acetylację i w konsekwencji transkrypcję, ponieważ przyczyniało się do wiązania acetylazy EP300. W proliferujących komórkach nowotworowych było ono niezbędnym elementem dla utrzymania EP300 na chromatynie i acetylacji sekwencji promotorowych genów, których ekspresja warunkowana była przebiegiem cyklu komórkowego i formowaniem kompleksów retinoblastomy. Ponieważ opisywana interakcja PARP1-EP300 obserwowana była w genomie także w sekwencjach promotorowych genów E2F-niezależnych uzasadnione jest przypuszczenie, że represja *PARP1* w monocytach utrzymuje niski poziom ekspresji przynajmniej części genów, których transkrypcja wymaga acetylacji sekwencji promotorowych przez EP300 niezależnie od przebiegu cyklu komórkowego. Analiza bioinformatyczna rozkładu EP300 i PARP1 w genomie w oparciu o dane uzyskane za pomocą metody ChIP-Seq wykazała, że tylko część genów aktywowanych przez EP300 wymaga obecności PARP1 na chromatynie. Czynnikiem uzależniający obecność EP300 w wybranych obszarach chromatyny od PARP1 pozostaje nieznan.



Rycina 5. PARP1 umożliwia wiązanie EP300 i acetylację sekwencji promotorowych genów, których transkrypcja uzależniona jest od przebiegu cyklu komórkowego i kompleksów retinoblastomy

Oprócz prawdopodobnie wielu innych efektów, przywrócenie ekspresji PARP1 w makrofagach wiąże się ze zwiększeniem odporności tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego, na który komórki te są w szczególności narażone przez wzgląd na pełnioną przez nie funkcję fizjologiczną. Zachodzący w ich wnętrzu wybuch oddechowy w odpowiedzi na wniknięcie patogenów, któremu towarzyszy masowe uwalnianie reaktywnych form tlenu oraz występowanie makrofagów w tkankach objętych stanami zapalnymi wymusza na tych komórkach wykształcenie skutecznych mechanizmów eliminujących zarówno reaktywne formy tlenu jak i uszkodzenia powstające w następstwie działania oksydantów. Jak wykazały prowadzone przeze mnie badania białko PARP1 pełni w makrofagach funkcję aktywatora transkrypcji dysmutazy ponadtlenkowej 2 (*SOD2*), a polaryzacja makrofagów w kierunku prozapalnym wywołana bakteryjną endotoksyną powoduje dalszy i znaczny wzrost NFκB-zależnej transkrypcji *SOD2*. Towarzyszy temu oddysocjowanie PARP1 od promotora *SOD2* i wzrost metylacji lizyny 4 histonu H3, która nasila transkrypcję [4b1]. Odłączenie PARP1 w następstwie aktywacji receptora TLR4 okazało się pełnić ważną rolę w procesie wyciszenia ekspresji *SOD2* w polaryzujących się makrofagach, ponieważ umożliwiało przyłączenie się specyficznej dla lizyny demetylazy 1A histonu (*LSD1*) i usunięcie di- i monometylacji z lizyny 4 histonu H3. To z kolei pociągało za sobą wzrost gęstości nukleosomów i obniżenie aktywności transkrypcyjnej. Co ważne, wzrost ekspresji *SOD2* w trakcie polaryzacji prozapalnych makrofagów odpowiedzialny był za zwiększenie ich odporności i żywotności w warunkach stresu oksydacyjnego. Utrzymanie białka PARP1 na chromatynie za pomocą inhibitorów wiążących to białko z DNA lub inhibicja *LSD1* w istotny sposób zwiększały poziom zarówno mRNA jak i białka *SOD2*, a przez to powodowały dalsze obniżenie cytoksycyzności indukowanej przez stres oksydacyjny.



Rycina 6. Zmiany zachodzące na promotorze *SOD2* w trakcie polaryzacji makrofagów indukowanej bakteryjną endotoksyną

Najważniejsze informacje wynikające z badań nad opisywanym zagadnieniem:

1. Obniżenie ekspresji PARP1 spowodowane zatrzymaniem podziałów komórek upośledza przynajmniej jeden z systemów naprawy DNA i wpływa na transkrypcję genów PARP1-zależnych
2. W badanych komórkach PARP1 pełni rolę aktywatora transkrypcji wchodząc w funkcjonalną interakcję z enzymami definiującymi modyfikacje potranslacyjne: aktywującą transkrypcję acetylazę EP300 oraz wyciszającą transkrypcję demetylazę LSD1
3. Wysoka ekspresja PARP1 w proliferujących komórkach umożliwia transkrypcję innych E2F-zależnych genów
4. Wzrost oporności prozapalnych makrofagów na działanie stresu oksydacyjnego jest wynikiem aktywacji ścieżki LPS/TLR4/NFκB/PARP1-LSD1/SOD2

#### Literatura:

1. Gupte, R., Z. Liu, W.L. Kraus, *PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes*. *Genes Dev*, 2017. **31**(2): p. 101-126.
2. Zhao, X., C. Wei, J. Li, P. Xing, J. Li, S. Zheng, X. Chen, *Cell cycle-dependent control of homologous recombination*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017. **49**(8): p. 655-668.
3. Parsons, J.L., Dianova, II, G.L. Dianov, *APE1-dependent repair of DNA single-strand breaks containing 3'-end 8-oxoguanine*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(7): p. 2204-9.

3. Poli-ADP-rybozylacja zachodząca na wczesnym etapie różnicowania osteoblastów i osteoklastów chroni kości przed rozwojem osteoporozy – inhibitory PARP1 mogą być czynnikami zwiększającymi ryzyko ubytków kości

4b7) **Robaszkiewicz A.**, Qu C., Wisnik E., Ploszaj T., Mirsaidi A., Kunze F.A., Richards P.J., Cinelli P., Mbalaviele G., Hottiger M.O., “ARTD1 regulates osteoclastogenesis and bone homeostasis by dampening NF- $\kappa$ B-dependent transcription of IL-1 $\beta$ .” *Sci Rep.* 2016; 17:6:21131; doi: 10.1038/srep21131.

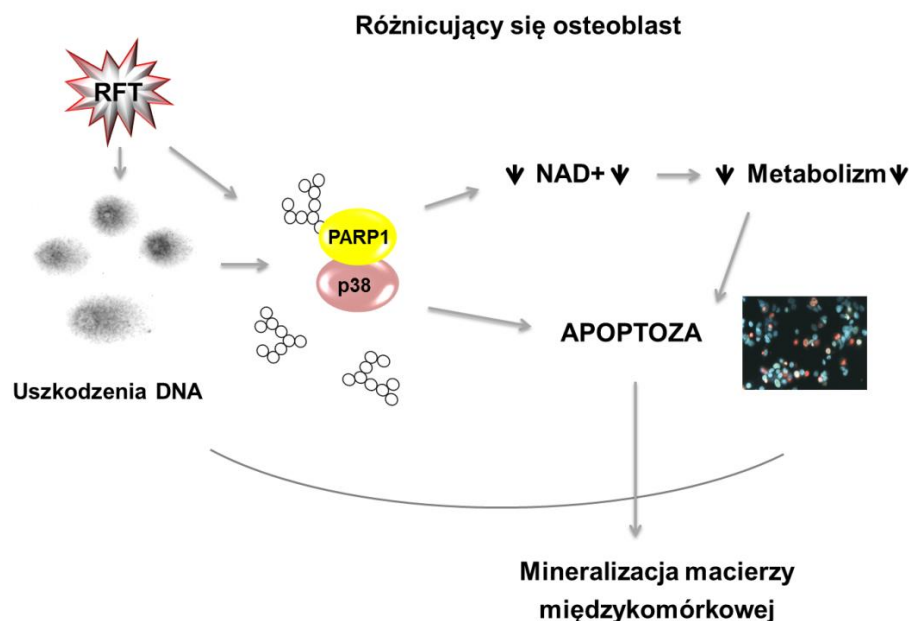
4b8) **Robaszkiewicz A.**, Valkó Z., Kovács K., Hegedűs C., Bakondi E., Bai P., Virág L., “The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway.” *Free Radic Biol Med.* 2014; 76:69-79; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.027.

4b9) **Robaszkiewicz A.**, Erdélyi K., Kovács K., Kovács I., Bai P., Rajnavölgyi E., Virág L., “Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death.” *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(8):1552-64; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.567.

Pierwszym istotnym wynikiem z tego zakresu było wykazanie, że ADP-rybozylacja jest istotnym procesem dla różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych oraz modelowych komórek – linii nowotworowej SAOS2 w osteoblasty [4b9]. Zarówno zahamowanie ADP-rybozylacji za pomocą inhibitorów jak i wyciszenie ekspresji genu *PARP1* w znacznym stopniu ograniczało zdolność prekursorów do różnicowania się w osteoblasty, co przejawiało się zmniejszoną ekspresją czynników transkrypcyjnych promujących osteoblastogenezę (*RUNX2*, *OSTERIX*) i markerów osteoblastów (*BMP2*, *OSTEOPONTIN*), zmniejszoną aktywnością alkalicznej fosfatazy i mineralizacją macierzy międzykomórkowej. Aktywacji *PARP1* towarzyszyły uszkodzenia DNA, które wywoływane były przez reaktywne formy tlenu produkowane przed oksydazę NADPH 4 (NOX4). Jej ekspresja wzrastała stopniowo wraz z postępem rozwoju osteoblastów.

Zachodząca w trybie ciągłym poli-ADP-rybozylacja na względnie wczesnych etapach różnicowania powodowała zużycie wewnątrzkomórkowego NAD<sup>+</sup> a przez to załamanie wewnątrzkomórkowego metabolizmu (zahamowanie glikolizy oraz oddychania mitochondrialnego) prowadząc ostatecznie do śmierci różnicujących się komórek na szlaku niezależnym od AIF [4b8, 4b9]. Przeważający udział apoptozy w obserwowanej śmierci powstających osteoblastów (niezbędnej dla prawidłowej mineralizacji tkanki kostnej [1, 2]) zwrócił uwagę na możliwość udziału *PARP1* w sygnalizacji komórkowej opartej na przekazywaniu sygnałów przez kinazy MAP. Pomimo zaobserwowanej aktywacji wszystkich trzech głównych ścieżek zależnych od kinaz JNK, ERK1/2 oraz p38, tylko ostatnia z wymienionych pozostawała pod wpływem ADP-rybozylacji. Kinaza p38 w trakcie różnicowania osteoblastów ulegała przemieszczeniu z cytoplazmy do jądra komórkowego, fosforylacji i tworzyła heterodimery z *PARP1*. Aktywacja kinazy p38, podobnie jak poli-ADP-rybozylacja, wywierała negatywny wpływ na wewnątrzkomórkowy metabolizm oraz znacznie obniżała przeżywalność osteoblastów. Zahamowanie aktywności p38 odzwierciedlało efekty inhibicji i wyciszenia *PARP1* sugerując, że (a) to kinaza jest mediatorem efektów wywoływanych przez poli-ADP-rybozylację indukowaną łagodnym stresem oksydacyjnym lub (b) poli-ADP-rybozylacji jest stymulowana interakcją

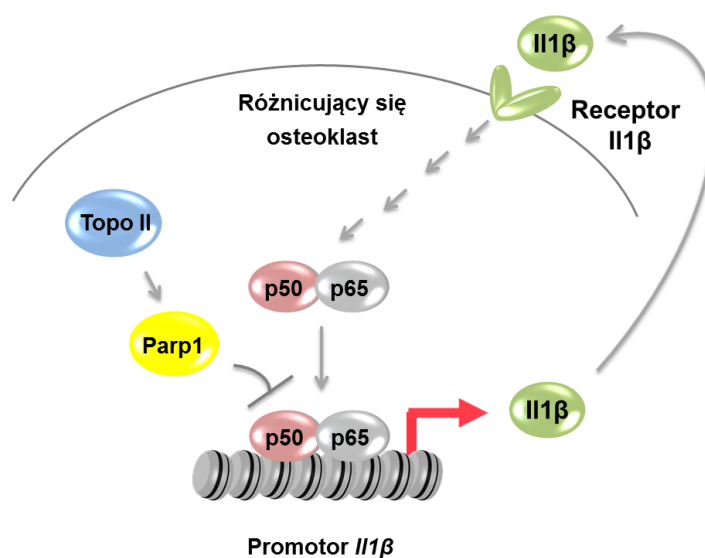
PARP1 z kinazą p38, która posiada właściwości sensora równowagi oksydacyjno-redukcyjnej [3, 4]. Pomimo dobrze znanego mechanizmu indukowania poli-ADP-rybozylacji przez uszkodzenia DNA wywołane utratą równowagi red-ox za opcją (b) wydaje się przemawiać fakt utrzymania wysokiego poziomu metabolizmu i kofaktora NAD<sup>+</sup> w wyniku działania inhibitora p38. Wskazuje na nadrzędną pozycję kinazy w ścieżce sygnałowej w stosunku do PARP1 – "konsumenta" NAD<sup>+</sup>. Ponadto, podobnie jak w opisanych wyżej przykładach komórek mieloidalnych i nowotworowych, zatrzymanie podziałów w trakcie różnicowania się osteoblastów oraz zachodząca w tym przypadku apoptoza powodowały obniżenie poziomu PARP1, a co za tym idzie i poziomu polimerów poli-ADP-rybozy.



Rycina 7. Interakcja pomiędzy PARP1 i p38 nasila proces różnicowania osteoblastów. Powstające reaktywne formy tlenu (RFT) indukują bezpośrednie oddziaływanie białek i ich aktywację, co powoduje zużycie wewnątrzkomórkowej puli NAD<sup>+</sup> i prowadzi do apoptozy komórek.

Wykorzystanie inhibitorów białka PARP1 w badaniach nad różnicowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych w osteoblasty i zaobserwowany w efekcie ich działania spadek liczby funkcjonalnych komórek kościotwórczych w hodowli po raz pierwszy zwróciły moją uwagę na możliwość pojawienia się zaburzeń struktury kości w rezultacie terapii opartych na inhibitorach tego enzymu. Hipoteza ta została pozytywnie zweryfikowana na mysim modelu dzięki porównaniu struktury kości myszy dzikich i pozbawionych genu *Parp1* (-/-) oraz myszy dzikich, którym w karmie podawano olaparib. Brak aktywności *Parp1* powodował istotne upośledzenie tkanki gąbczastej w kościach udowych i piszczelowych [4b7]. Pomimo podjętych prób niepowodzenia metodyczne uniemożliwiły ocenę liczby osteoblastów i osteocytów w tkance kostnej, a tym samym potwierdzenie wpływu olaparibu i/lub delecji *Parp1* na różnicowanie komórek kościotwórczych. Badania wykonane we współpracy z Zakładem Chorób Kości Akademii Medycznej Uniwersytetu Waszyngton i z Oddziałem Chirurgii Urazowej, Centrum Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego w Zurychu wykazały znaczny wzrost liczby osteoklastów w tkance kości udowych i piszczelowych u myszy o genotypie *Parp1* (-/-), czemu towarzyszyła wzmocniona ekspresja receptora dla czynnika wywołującego

różnicowanie komórek kościogubnych (*Rank*), czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego za różnicowanie osteoklastów (*Nfatc1a*), a także markerów osteoklastów (*Ctsk*, *Trap*). W badaniach na modelowych systemach różnicowania komórek kościogubnych (linia RAW264.7 oraz makrofagi wyizolowane ze szpiku kostnego myszy stymulowane fizjologicznym czynnikiem RANKL inicjującym osteoklastogenezę) poli-ADP-rybozylacja obserwowana była na wczesnym etapie formowania się wielojądrzastych osteoklastów (dzień 2 po stymulacji czynnikiem Rankl). Inhibicja poli-ADP-rybozylacji lub wyciszenie i delecja genu *PARP1* istotnie zwiększały wydajność różnicowania i nasilały resorpcję podłoż mineralnych, na których prowadzone były hodowle komórkowe. Znaczący spadek liczby osteoklastów oraz zniesienie efektu olaparibu oraz wyciszenia ekspresji *Parp1* w komórkach ze zredukowanym poziomem białka p65, które razem z p50 stanowi czynnik transkrypcyjny znajdujący się na końcu kanonicznej ścieżki sygnałowej Nfkb, sugerowały, że PARP1 może wpływać na transkrypcję genu/-ów aktywowanych przez czynnik transkrypcyjny Nfkb, których ekspresja nasilała rozwój osteoklastów [5, 6]. Taki sam efekt zaobserwowany został w komórkach pozbawionych kaspazy 1, która jest elementem inflamasomu odpowiedzialnego m.in. za dojrzewanie (proteolityczną obróbkę) prekursora dla interleukiny 1 $\beta$  (*Il1 $\beta$* ) – prozapalnej cytokiny pozostającej pod transkrypcyjną kontrolą czynnika Nfkb. Dalsze badania wykazały, że *Parp1* pełnił funkcję represora Rankl- i Nfkb-zależnej transkrypcji genu *Il1 $\beta$*  w różnicujących komórkach, którego produkt – uwalniana przez komórki cytokina działała autokrynnie i osteoklastogennie. Stąd brak poli-ADP-rybozylacji zwiększał stężenie *Il1 $\beta$*  w hodowli, a przez to liczbę komórek kościogubnych.



Rycina 8. PARP1 pełni funkcję represora *Il1 $\beta$*  w różnicujących się osteoklastach. Aktywowana przez topoiomerazę 2 aktywność *Parp1* utrudnia wiązanie czynnika Nfkb z promotorem *Il1 $\beta$* . Powstająca cytokina działając w sposób autokrynnie nasila różnicowanie osteoklastów.

W prekursorach nie obserwowano wpływu Parp1 na indukowaną Rankl-em transkrypcję cytokiny prozapalnej co świadczy o zmianach w maszynerii transkrypcyjnej w obrębie sekwencji promotorowej i/lub wzmacniacza, które towarzyszą procesowi różnicowania i które uzależniają transkrypcję *I11β* od poli-ADP-rybozylacji. Obecność polimerów poli-ADP-rybozy w powstających osteoklastach powodowała obniżenie poziomu modyfikacji histonów związanych z aktywną transkrypcją (H3K4me3 i acH4), zwiększenie gęstości nukleosomów oraz brak p65 na promotorze *I11β*. Represja *Parp1* w końcowych etapach różnicowania mysich osteoklastów, a przez to obniżenie stopnia poli-ADP-rybozylacji wewnątrzkomórkowych białek może ułatwiać powstającym osteoklastom ukończenie procesu różnicowania i osiągnięcie ostatecznego fenotypu.

Podsumowując, poli-ADP-rybozylacja zachodząca na wczesnym etapie różnicowania osteoblastów i osteoklastów decyduje o losie tych komórek (brak aktywności PARP1 podtrzymuje prekursorów osteoblastów w formie nieodróżnionej, ale zwiększa liczbę prekursorów osteoklastów, które finalizują proces różnicowania dając funkcjonalne komórki kościogubne). Chociaż mechanizm aktywujący PARP1 w obydwu typach różnicowania jest inny (reaktywne formy tlenu/kinaza p38 w osteoblastach i pęknięcia DNA będące efektem działania topoizomerazy 2 w osteoklastach), to stopień poli-ADP-rybozylacji może być postrzegany jako molekularny przełącznik faworyzujący dany typ różnicowania.

Najważniejsze informacje wynikające z badań nad opisywanym zagadnieniem:

- a) Aktywność białka PARP1 jest niezbędna dla uzyskania i zachowania homeostazy kości u myszy
- b) Poli-ADP-rybozylacja pełni przeciwstawne role podczas różnicowania osteoblastów i osteoklastów: nasila powstawanie komórek kościotwórczych, ale hamuje rozwój komórek kościogubnych
- c) W różnicujących się osteoblastach PARP1 fizycznie i funkcjonalnie oddziałuje z kinazą p38, co powoduje załamanie metabolizmu i śmierć komórek, która jest niezbędna dla prawidłowej mineralizacji macierzy międzykomórkowej
- d) W różnicujących się mysich osteoklastach Parp1 zapobiega nasilającym transkrypcję zmianom w obrębie sekwencji promotorowej *I11β* i oddziaływaniu z nią czynnika transkrypcyjnego Nfkb przez co działa jako represor osteoklastogennej cytokiny
- e) Istnieje podstawa żeby przypuszczać, że inhibitory PARP1 stosowane w terapiach przeciwnowotworowych (szczególnie długoterminowych) mogą powodować zaburzenia równowagi pomiędzy osteoblastogenezą i osteoklastogenezą u ludzi. Hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji, jednak zwraca uwagę na ważny aspekt możliwych i nieznanych dotąd skutków ubocznych terapii opartych na inhibitorach PARP1.

#### Literatura:

1. Javed, A., H. Chen, F.Y. Ghorri, *Genetic and transcriptional control of bone formation*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2010. **22**(3): p. 283-93, v.



2. Huitema, L.F., A.B. Vaandrager, *What triggers cell-mediated mineralization?* Front Biosci, 2007. **12**: p. 2631-45.
3. Dolado, I., A. Swat, N. Ajenjo, G. De Vita, A. Cuadrado, A.R. Nebreda, *p38 $\alpha$  MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis.* Cancer Cell, 2007. **11**(2): p. 191-205.
4. Sato, A., M. Okada, K. Shibuya, E. Watanabe, S. Seino, Y. Narita, S. Shibui, T. Kayama, C. Kitanaka, *Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells.* Stem Cell Res, 2014. **12**(1): p. 119-31.
5. Boyce, B.F., Y. Xiu, J. Li, L. Xing, Z. Yao, *NF-kappaB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis.* Endocrinol Metab (Seoul), 2015. **30**(1): p. 35-44.
6. Amarasekara, D.S., H. Yun, S. Kim, N. Lee, H. Kim, J. Rho, *Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks.* Immune Netw, 2018. **18**(1): p. e8.

#### 4. Znaczenie wyników badań oraz perspektywy ich wykorzystania (najważniejsze aspekty)

Podjęta tematyka badań i omówione zagadnienia będące podstawą osiągnięcia naukowego dowodzą udziału PARP1 w różnicowaniu wybranych typów komórek. Z uzyskanych danych wynika, że zatrzymanie proliferacji komórek, które towarzyszy ich różnicowaniu lub intencjonalne za pomocą związków uniemożliwiających komórkom przejście z fazy G1 do S może wywoływać wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe poprzez represję *PARP1*. Gen ten okazał się łączyć zdolność komórek do proliferacji z wydajnością przynajmniej jednego systemu naprawy uszkodzeń DNA w warunkach stresu oksydacyjnego a także z ekspresją genów, których transkrypcja aktywowana jest przez modyfikującą histony acetylazę EP300 oraz z sygnalizacją komórkową, ponieważ część genów *PARP1*-*EP300*-*E2F*-zależnych stanowią mediatory wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych oraz receptory powierzchniowe umożliwiające komórce odbiór informacji ze środowiska pozakomórkowego. Efekty działania *PARP1* na poziomie chromatyny są zatem przenoszone na teren cytoplazmy, gdzie białko to nie występuje lub nawet poza komórkę, czego przykładem w różnicujących się osteoklastach może być wpływ *PARP1* na wiązanie się czynnika transkrypcyjnego NFκB w obrębie sekwencji promotorowej *Ilβ*, która dalej wydzielana jest do przestrzeni międzykomórkowej gdzie działa w sposób autokryny i parakryny.

W regulowaniu transkrypcji rola *PARP1* wykracza poza dobrze znane aspekty związane z pełnieniem funkcji kofaktora czynników transkrypcyjnych czy regulowaniem struktury chromatyny przez poli-ADP-rybozylację nukleosomów i białek związanych z elementami regulatorowymi genów. Jak wykazały przeprowadzone przeze mnie badania *PARP1* w sposób niezależny od aktywności enzymatycznej warunkuje stopień acetylacji i metylacji histonów poprzez funkcjonalną interakcję z enzymami posiadającymi zdolność do wprowadzania i usuwania potranslacyjnych modyfikacji. Dalsze badania mające na celu identyfikację genów, których transkrypcja kontrolowana jest przez opisane mechanizmy umożliwić może intencjonalną interwencję w ich ekspresję za pomocą inhibitorów *PARP1* posiadających zdolność do wiązania tego białka z DNA. Przykładem może być tutaj zastosowanie wymienionych wyżej inhibitorów *PARP1* w celu podtrzymania transkrypcji *SOD2*, a tym samym zwiększania odporności i wydłużenie życia prozapalnych makrofagów na działanie stresu oksydacyjnego w warunkach *in vitro*.

Podobnie, poznanie elementów chromatyny w obrębie promotora genu *PARP1* i opisanie mechanizmów kontrolujących jego transkrypcję w komórkach proliferujących i zatrzymanych w fazie G1 lub G0 stwarza podstawy do zastosowania niskocząsteczkowych inhibitorów enzymów remodelujących chromatynę lub nadrzędnych w stosunku do nich białek będących ogniwami szlaków sygnałowych w celu zmian poziomu ekspresji *PARP1*. Wydaje się to mieć szczególnie istotne znaczenie dla modulowania wewnątrzkomórkowych procesów, których przebieg zależy od obecności białka *PARP1*. Do chwili obecnej regulowano wyłącznie procesami zależnymi od aktywności enzymatycznej *PARP1*, która może być skutecznie obniżana za pomocą szerokiej gamy komercyjnie dostępnych inhibitorów. Daje to także nieograniczone możliwości stworzenia skutecznych kombinacji związków wywołujących represję *PARP1* z czynnikami wywołującymi śmierć komórek nowotworowych. Jednym z przykładów praktycznego zastosowania wiedzy o regulowaniu transkrypcji *PARP1* i jej zależności

od proliferacji komórek jest opisany w osiągnięciu wzrost wrażliwości komórek nowotworowych poddanych działaniu inhibitorów CDK4/6 na działanie stresu oksydacyjnego.

Ostatnim zagadnieniem, na jakie warto zwrócić uwagę są efekty uboczne stosowania inhibitorów PARP1, których zakres potencjalnego stosowania jest rozszerzany o kolejne choroby, także nienowotworowe. Chociaż w dalszym ciągu brakuje danych o działaniu niepożądanym tych związków to uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na konieczność rozważenia ewentualnych zmian zachodzących w tkance kostnej. Jeśli nawet negatywnych efektów inhibitorów PARP1 nie zaobserwuje się u osób dorosłych, w których tkanka kostna jest w zasadzie w pełni zmineralizowana, w dalszym ciągu wątpliwości budzić może stosowanie tych związków u szybko rosnących dzieci, których kości ulegają stosunkowo silnej przebudowie.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

### 5a) Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Mój kontakt z pracą naukową rozpoczął się w momencie, kiedy zostałam aktywną członkinią Studenckiego Koła Naukowego Młodych Biofizyków. Prowadzone przeze mnie badania pod opieką mgr Anety Balcerczyk (obecnie dr hab.) na trzecim i czwartym roku studiów dotyczyły właściwości antyoksydacyjnych kwercetyny i obaliły wcześniejszy mit o wyłącznie ochronnych właściwościach tego polifenolu, który w układach pozakomórkowych (m.in. w medium wzrostowym) generował reaktywne formy tlenu pozostając jednocześnie skutecznym zmiataczem oksydantów wewnątrz komórek. Ten etap mojej pracy badawczej zakończył się opublikowaniem pierwszego artykułu [5a12].

Wykonana przeze mnie praca magisterska i doktorska pod opieką prof. dr hab. Mirosława Soszyńskiego stanowiły jeden szeroki cykl badań poświęcony poznaniu funkcji biologicznej oraz stopnia modyfikacji lipidów oraz białek/aminokwasów przez kwas chlorowy I (HClO), który produkowany jest podczas stanów zapalnych przez komórki fagocytyjące. Doprowadził on do kompleksowej charakterystyki monochloroaminokwasów (związane z nimi zagadnienia były tematem pracy magisterskiej) oraz chlorohydrin fosfatydylocholiny (związane z nimi zagadnienia były tematem rozprawy doktorskiej zrealizowanej w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego). Oprócz dokładnej charakterystyki powstających organicznych pochodnych kwasu chlorowego I (określenia ich czystości, stabilności, reaktywności z białkami, wpływu na stabilność błon biologicznych) wykazałam również ich aktywność biologiczną i cytotoksyczność [5a4, 5a5, 5a10, 5a11]. Ta ostatnia w przypadku chlorohydrin warunkowana była liczbą cząsteczek kwasu chlorowego I przyłączonych do wiązań nienasyconych w badanych fosfolipidach, podczas gdy w grupie monochloroaminokwasów determinowana była przez stabilność tych związków w roztworach wodnych sugerując, że powstające podczas ich rozpadu produkty mogą powodować śmierć komórek. Co istotne, niektóre z badanych monochloroaminokwasów okazały się bardziej toksyczne od ich prekursora – HClO, który wykazuje silnie utleniające właściwości i zdolność do zmniejszania aktywności enzymów antyoksydacyjnych [5a2, 5a7].

W trakcie doktoratu opracowałam czułą metodę detekcji i ilościowego pomiaru poziomu markera aktywności HClO - 3-chlorotyrozyny z wykorzystaniem przeciwciał i cytometrii przepływowej [5a1]. Ponadto, wraz z prof. dr hab. Grzegorzem Bartoszem przetestowałam i zwalidowałam dwie metody umożliwiające ocenę pojemności antyoksydacyjnej płynów ustrojowych oraz roztworów organicznych i nieorganicznych [5a8, 5a9].

Ponieważ moje zainteresowania naukowe skupiały się wokół zagadnień związanych ze stresem oksydacyjnym, wykonałam analizę porównawczą właściwości antyoksydacyjnych wybranych gatunków jadalnych grzybów suszonych [5a3].

Współpracując z Zakładem Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wzięłam udział w przygotowaniu artykułu przeglądowego tematycznie związanego z interesującymi mnie zagadnieniami [5a6], a będąc asystentem w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego miałam możliwość opracować rozdział w książce „Na pograniczu chemii i biologii” [5a13].

Odbyty na początku doktoratu miesięczny staż naukowy w zespole prof. CM Spickett na Uniwersytecie Strathclyde w Glasgow zaowocował nie tylko opublikowaniem wspólnych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, ale także wieloletnią współpracą naukową, która jest do chwili obecnej kontynuowana. Syntetyczny opis właściwości biofizycznych chlorohydrin i powiązanie ich z wpływem zmodyfikowanych lipidów na błony biologiczne nagrodzony został w trakcie Kongresu Europejskich Towarzystw Biofizycznych, który odbył się w 2009 r w Genui. Cykl prac eksperymentalnych i przeglądowych opublikowanych w oparciu o uzyskane wyniki został wyróżniony w 2013 roku przez J.M Rektora Uniwersytetu Łódzkiego nagrodą indywidualną.

**Artykuły naukowe opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:**

- 5a1) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G., Soszynski M. "Detection of 3-chlorinated tyrosine residues in human cells by flow cytometry." *J Immunol Methods*. 2011 Jun 30; 369(1-2):141-5; doi: 10.1016/j.jim.2011.05.006.
- 5a2) **Robaszkiewicz A.**, Pogorzelska M., Bartosz G., Soszyński M. "Chloric acid(I) affects antioxidant defense of lung epithelial cells." *Toxicol In Vitro*. 2011 Oct; 25(7):1328-34; doi: 10.1016/j.tiv.2011.04.025.
- 5a3) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G., Lawrynowicz M., Soszyński M. "The Role of Polyphenols,  $\beta$ -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms." *J Nutr Metab*. 2010; 2010:173274; doi: 10.1155/2010/173274.
- 5a4) **Robaszkiewicz A.**, Greig F.H., Pitt A.R., Spickett C.M., Bartosz G., Soszyński M. "Effect of phosphatidylcholine chlorohydrins on human erythrocytes." *Chem Phys Lipids*. 2010 Sep; 163(7):639-47; doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.05.201.
- 5a5) **Robaszkiewicz A.** "Markers of chloric acid (I) in biological systems--identification and properties" *Postepy Biochem*. 2010; 56(2):201-8.
- 5a6) Płoszaj T., **Robaszkiewicz A.**, Witas H. "Oxidative damage of mitochondrial DNA: the result or consequence of enhanced generation of reactive oxygen species." *Postepy Biochem*. 2010; 56(2):139-46.
- 5a7) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G., Soszyński M. "N-Chloroamino acids mediate the action of hypochlorite on A549 lung cancer cells in culture." *Toxicology*. 2010 Apr 11; 270(2-3):112-20; doi: 10.1016/j.tox.2010.02.003.
- 5a8) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G. "Estimation of antioxidant capacity against peroxyxynitrite and hypochlorite with fluorescein." *Talanta*. 2010 Mar 15; 80(5):2196-8; doi: 10.1016/j.talanta.2009.11.004.
- 5a9) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G. "Estimation of antioxidant capacity against pathophysiologically relevant oxidants using Pyrogallol Red." *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18; 390(3):659-61; doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.023.

- 5a10) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G., Soszyński M. "N-chloroamino acids cause oxidative protein modifications in the erythrocyte membrane." *Mech Ageing Dev.* 2008 Oct; 129(10):572-9; doi: 10.1016/j.mad.2008.05.007.
- 5a11) **Robaszkiewicz A.**, Bartosz G., Soszyński M. "Effect of N-chloroamino acids on the erythrocyte." *Free Radic Res.* 2008 Jan; 42(1):30-9; doi: 10.1080/10715760701774873.
- 5a12) **Robaszkiewicz A.**, Balcerczyk A., Bartosz G. "Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells." *Cell Biol Int.* 2007 Oct; 31(10):1245-50.

#### **Pozostałe publikacje naukowe**

- 5a13) **Robaszkiewicz A.**, Blasiak J. "Fluorofory specyficzne dla DNA", rozdział w podręczniku z cyklu "Na pograniczu chemii i biologii", 2010, Wydawnictwo Naukowe UAM, tom 24, strony: 493-515

#### **Doniesienia konferencyjne:**

- Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. "The redox imbalance in cells treated with phosphatidylcholine chlorohydrins" 15-17 czerwca 2011 – Meeting of the Oxygen Club California "Free Radicals, Nutrition and Aging: From Fundamental Aspects to Clinical Applications", Paryż, Francja
- Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. „Chlorohydrins induce oxidative stress, phosphorylation of p38 kinase and apoptosis of HUVEC-ST cells” 23-27 sierpnia 2011 - Kongres Europejskich Towarzystw Biofizycznych (EBSA), Budapeszt, Węgry
- Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. "The use of FITC-conjugated antibodies combined with flow cytometry analysis for detection of 3-chlorinated tyrosines in human cells" 12-15 września 2010 – Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe "Free Radical and the Environment" Oslo, Norwegia
- Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszyński M "Phosphatidylcholine chlorohydrins induce caspase-3 dependent apoptosis" 28–30 września 2010 - XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Łódź, Polska
- Grosbart M., Robaszkiewicz A., Soszyński M. "The extract from parasitic fungi used in the unconventional medicine affect the red blood cells by disruption of the membrane structure" 28–30 września 2010 - XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Łódź, Polska
- Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. "The antioxidative activity of the most frequently consumed Polish mushrooms" 8-10 kwietnia 2009 – Oxygen Club of California „Micronutrients, Exercise, Energy and Aging Disorders", Paryż, Francja
- Robaszkiewicz A., Grosbart M., Bartosz G., Soszyński M. "Tamoxifen and raloxifen in the protection against the oxidative action of hypochlorite, peroxyxynitrite and AAPH" 8-10 kwietnia 2009 – Oxygen Club of California „Micronutrients, Exercise, Energy and Aging Disorders", Paryż, Francja

- Rywaniak J., Robaszekiewicz A., Wachowicz B. "Changes of blood platelets apoptotic markers induced by hydrogen peroxide" 8-10 kwietnia 2009 – Oxygen Club of California „Micronutrients, Exercise, Energy and Aging Disorders”, Paryż, Francja
- Robaszekiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. "Two assays for estimation of total antioxidant capacity against pathophysiologically relevant oxidants, peroxynitrite and hypochlorite" 26-29 sierpnia 2009 – Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe "Free radicals, Health and Lifestyle: from cell signaling to disease prevention", Rzym, Włochy
- Robaszekiewicz A., Grosbart M., Bartosz G., Soszyński M. „Serum antioxidants in protection against the oxidative action of hypochlorite” 16-19 września 2009 – XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź, Polska
- Sicińska P., Bartosz G., Soszyński M. „The results of incorporation of phosphatidylcholine chlorohydrins into erythrocytes” Robaszekiewicz A., 16-19 września 2009 – XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź, Polska
- Robaszekiewicz A., Spickett CM., Bartosz G., Soszyński M. „Chlorite leads to formation of chlorohydrins in phosphatidylcholine vesicles containing unsaturated fatty acid residues” 21-22 listopada 2008 – XII Gliwickie Spotkanie Naukowe, Gliwice, Polska
- Robaszekiewicz A., Bartosz G., Soszyński M. „The comparison of antioxidant properties between 17- $\alpha$ - and 17- $\beta$ -estradiol” 7-11 września 2008 – Kongres Biochemii i Biologii Komórki, Olsztyn, Polska
- Robaszekiewicz A., Sicińska P., Bartosz G., Soszyński M. „The influence of selective estrogen receptor modulators in anthracyclines accumulation inside erythrocytes” 7-11 września 2008 – Kongres Biochemii i Biologii Komórki, Olsztyn, Polska
- Robaszekiewicz A., Sicińska P., Bartosz G., Soszyński M. „Morphological and functional alterations of A549 cell after treatment with monochloroamino acids and hypochlorite” 18-21 września 2007 – 42 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, Polska
- Robaszekiewicz A. „The influence of quercetin on redox homeostasis of human non-small lung cancer cells” 12-15 września 2006 – 41 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, Polska
- Robaszekiewicz A. „Kwercytyna: utleniacz czy antyutleniacz” 9-10 maja 2006 – XXXV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, Polska
- Balcerzyk A., Robaszekiewicz A., Pułaski Ł., Soszyński M., Bartosz G. „Influence of glucocorticoids on the antioxidant defence of endothelial cells” 15-17 września 2005 – IX Kongres Biologii Komórki, Łódź, Polska

#### **Wygłoszone referaty na międzynarodowych konferencjach tematycznych**

- “The use of FITC-cojugated antibodies combined with flow cytometry for detection of 3-chlorinated tyrosines in human cells”, Robaszekiewicz A., warsztat zorganizowany przez FEBS pt. “Techniques in Free Radical Biology”, 27 sierpnia – 2 września 2010, Debrecen, Węgry

### 5b) Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Rok przed obroną rozprawy doktorskiej rozpoczęłam pracę w Katedrze Chemii Medycznej Uniwersytetu w Debreczynie, gdzie oprócz realizowania własnych projektów naukowych [4b8 i 4b9], które zapoczątkowały moje zainteresowanie rolą białka PARP1 w procesie różnicowania komórek, miałam możliwość uczestniczenia w badaniach i naukowych opracowaniach tamtejszej grupy, co zaowocowało wieloletnią i owocną współpracą. W jej wyniku opublikowane zostały trzy artykuły przeglądowe podsumowujące osiągnięcia naukowe tamtejszego zespołu oraz stan wiedzy na chwilę, kiedy publikowane były prace. Opublikowane prace przeglądowe poświęcone były zagadnieniom związanym z udziałem białka PARP1 w śmierci komórek [5b8], w utrzymaniu homeostazy kości [5b6] oraz z możliwościami zastosowania związków modulujących równowagę redox komórek w terapiach przeciwnowotworowych [5b3].

Pracując w tamtejszej jednostce uczestniczyłam w projekcie, który miał na celu identyfikację czynnika odpowiedzialnego za utrudnione gojenie się ran, które towarzyszy niektórym jednostkom chorobowym. Porównane zostały surowice osób cierpiących na owrzodzenia nóg (przewlekłe uszkodzenie skóry) oraz osób, które uległy oparzeniom drugiego stopnia (nagle uszkodzenie skóry). Badaniom poddane zostały także wysięki z ran. Wśród branych pod uwagę czynników znalazły się m.in. pojemność antyoksydacyjna badanych płynów, oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów, poziom glutationu, nitrotyrozyny i polimeru poli-ADP-rybozy, markery stanu zapalnego (cytokiny TNF $\alpha$  i IL8), waskularyzacji (VEGF) oraz poziom uszkodzeń tkanki. Wyższy poziom markerów zapalnych oraz waskularyzacji, któremu towarzyszyło podwyższone stężenie glutationu oraz zdolności antyoksydacyjnej sugerowało, że to zwiększona produkcja cytokin prozapalnych w miejscu występowania ran jest czynnikiem uniemożliwiającym ich gojenie. Wyniki badań opublikowane zostały w roku 2018 [5b2].

Dzięki zdobytemu doświadczeniu w hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych i ich różnicowaniu w osteoblasty miałam możliwość wzięcia udziału w badaniach prowadzonych przez Katedrę Biofizyki i Biologii Komórki oraz Wydział Stomatologiczny Uniwersytetu w Debreczynie w latach 2012-2013. Projekt miał na celu sprawdzenie wpływu białka morfogenetycznego kości 2 (BMP2) na przebieg różnicowania prekursorów osteoblastów pochodzących z różnych źródeł (linia nowotworowa SAOS2, mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z miazgi zęba, mezenchymalne podniebienne komórki zarodkowe). Okazało się, że samo białko BMP2 nie było w stanie wywołać procesu różnicowania, ale nasilało różnicowanie komórek z miazgi zęba i linii SAOS2 w obecności innych czynników indukujących różnicowanie ( $\beta$ -glicerofosforan, kwas askorbinowy, witamina D3, deksametazon). Wyniki tego projektu zostały opublikowane w czasopiśmie Human Cell w roku 2018 [5b4].

Równolegle kontynuowałam rozpoczęte w trakcie realizowania założeń rozprawy doktorskiej badania nad poznaniem podstaw cytotoksyczności chlorohydrin fosfatydylocholiny w hodowlach komórkowych. Etap ten umożliwił mi uzupełnienie uzyskanych wcześniej wyników świadczących o pro-apoptycznym i cytostatycznym działaniu chlorohydrin o aspekty związane z homeostazą redox oraz sygnalizacją komórkową. Uzyskane wyniki wykazały, że wraz ze wzrostem liczby cząsteczek HClO przyłączonych do fosfolipidu wzrasta jego zdolność do indukowania stresu



oksydacyjnego, który z kolei aktywuje kinazę p38 wywołując w ten sposób apoptozę. Na tym etapie, dzięki współpracy z zespołem prof. CM Spiccktt, do analizy statystycznej wyników wykorzystana została trzyczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), która umożliwiła wielokierunkowe porównanie uzyskanych danych. Praca będąca uwieńczeniem wieloletnich badań ukazała się w roku 2014 [5b7].

Wyniki uzyskane w trakcie stażu na Uniwersytecie w Debreczynie wskazujące na upośledzenie różnicowania osteoblastów w konsekwencji ograniczenia wewnątrzkomórkowej poli-ADP-rybozylacji pozwoliły mi wysunąć hipotezę o możliwych negatywnych skutkach braku białka PARP1 lub zahamowaniu jego aktywności dla prawidłowego rozwoju i/lub funkcjonowania tkanki kostnej. Hipoteza ta oraz zagadnienia związane z wpływem poli-ADP-rybozylacji na powstawanie osteoklastów zweryfikowane zostały na Uniwersytecie w Zurychu, dzięki uzyskanemu przeze mnie stypendium naukowemu w ramach programu ScixNMS. Etap ten zakończył się wspólną publikacją, która ukazała się w roku 2016 [4b7].

Po powrocie do kraju rozpoczęłam samodzielne badania jako kierownik zakwalifikowanego do finansowania projektu pt. „Transkrypcyjno-epigenetyczna rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w warunkowaniu ekspresji czynników prozapalnych kontrolowanych przez oś NF-kappaB w mieloidalnych komórkach efektorowych” w programie SONATA. W ramach projektu prowadzone były badania stanowiące część osiągnięcia naukowego i opublikowanych zostało 5 prac eksperymentalnych i jedna przeglądowa [4b1-4b6]. Poza zagadnieniami będącymi podstawą wymienionych publikacji, w ramach uzyskanego finansowania prowadzone były badania nad udziałem białka PARP1 w regulowaniu ekspresji cytokin prozapalnych oraz wpływu obserwowanych zmian w poziomie PARP1 towarzyszących procesowi różnicowania monocytów i makrofagów na warunkowanie struktury chromatyny w obrębie sekwencji promotorowych i wzmacniaczy genów *IL1β* i *TNFα*. Wykazały one, że oddysocjowanie PARP1 od regionów regulatorowych wymienionych cytokin w wyniku różnicowania komórek pociąga za sobą wzrost m.in. acetylacji histonów, który z kolei umożliwia szybkie wiązanie czynników transkrypcyjnych i aktywację transkrypcji w odpowiedzi na stymulowanie receptorów powierzchniowych bakteryjnymi ligandami lub cytokinami prozapalnymi. Śledzenie zmian w sekwencji promotorowej genu *TNFα* zachodzących w trakcie różnicowania komórek i odpowiedzi tego regionu na bakteryjną endotoksynę umożliwiło wykazanie roli PARP1 w nabywaniu przez monocyty i makrofagi oporności na LPS. Prowadzone w tej chwili badania skupiają się na opracowaniu metody opartej na wykorzystaniu inhibitorów PARP1 w zapobieganiu nabywania tolerancji na LPS przez ludzkie monocyty i makrofagi. Wyniki tych prac opublikowane zostaną w roku 2019/2020.

W latach 2014 – 2016 brałam udział w badaniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi. Tematyka prowadzonych badań związana była z analizą kopalnego DNA w ludzkich szczątkach z terenów średniowiecznej Polski. Prowadzone analizy skupiały się na analizie linii matczynej, czyli mitochondrialnym DNA. Uzyskane wyniki wskazywały na prawdopodobny udział ludności z terenów dzisiejszej Skandynawii w tworzeniu polskiego państwa wczesnopiastowskiego. Wykonane eksperymenty opublikowane zostały w czasopiśmie *Annals of Human Biology* w 2017 roku [5b5].

Pomiędzy sierpniem a grudniem 2017 r ponownie wzięłam udział w badaniach prowadzonych w Katedrze Chemii Medycznej na Uniwersytecie w Debreczynie, których część tematycznie związana była z zagadnieniami, którymi zajmowałam się w ramach projektów realizowanych przeze mnie na Uniwersytecie Łódzkim. Przede wszystkim udało nam się wykazać, że polaryzacja makrofagów do fenotypu prozapalnego za pomocą bakteryjnej endotoksyny znacznie zwiększała odporność tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego. Nabywaniu oporności towarzyszyły zmiany wewnątrzkomórkowego metabolizmu oraz ekspresji enzymów wchodzących w skład bariery antyoksydacyjnej m.in. mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2). Wykonane we współpracy eksperymenty opublikowane zostały w czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine* [5b1]. Zaobserwowanie na modelu mysim zależności pomiędzy poziomem PARP1 a ekspresją SOD2 zostały przeniesione przeze mnie na ludzki model różnicowania i polaryzacji makrofagów, co zakończyło się opublikowaniem kolejnej pracy w tym samym czasopiśmie [4b1].

W trakcie mojego czteromiesięcznego pobytu na Uniwersytecie w Debreczynie uczestniczyłam również w dwóch innych projektach. Pierwszy z nich dotyczył roli adenylotransferazy 1 mononukleotydu nikotynamidowego (NMNAT1) w modulowaniu cytotoksyczności cisplatyny w komórkach nowotworowych linii U2OS. Ponieważ enzym ten bierze udział w syntezie NAD+ zakładano, że jego wycięcie z genomu za pomocą techniki CRISPR-Cas9 nasilać będzie toksyczność leku przeciwnowotworowego wywołującego maszyną poli-ADP-rybozylację. Wykonane przez mnie porównanie transkryptomów w oparciu o dane uzyskane za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (RNA-Seq) dla linii z normalnym poziomem NMNAT1 i pozbawionych genu *NMNAT1* wykazała, że brak tego enzymu zgodnie z przewidywaniami upośledzał metabolizm zarówno białek jak i lipidów, ale wpływał również na ekspresję genów stymulujących proliferację, kodujących czynniki transkrypcyjne i co ważne genów pro-apoptotycznych. Drugi projekt miał na celu identyfikację genów, których ekspresja jest regulowana przez poli-ADP-rybozylację zachodzącą w trakcie różnicowania i polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu przeciwzapalnego. Wykorzystując takie samo podejście (analizę danych RNA-Seq) udało mi się wykazać, że towarzysząca polaryzacji aktywacja PARP1 stymulowała ekspresję genów kodujących cytokiny przeciwzapalne i odpowiedzialnych m.in. za cytotoksyczność limfocytów T czy hamujących ścieżki sygnałowe od cytokin prozapalnych. Opracowane dane są podstawą dalszych eksperymentów i w formie dwóch oddzielnych prac zostaną opublikowane przez Katedrę Chemii Medycznej w najbliższym czasie.

#### **Artykuły naukowe opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:**

- 5b1) Regdon Z., **Robaszkiewicz A.**, Kovács K., Rygielska Ż., Hegedűs C., Bodoor K., Szabó É., Virág L., „LPS protects macrophages from AIF-independent parthanatos by downregulation of PARP1 expression, induction of SOD2 expression, and a metabolic shift to aerobic glycolysis” *Free Radic Biol Med* 2019 Feb; 131:184-196; doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.034
- 5b2) Bodnár E., Bakondi E., Kovács K., Hegedűs C., Lakatos P., **Robaszkiewicz A.**, Regdon Z., Virág L., Szabó É. “Redox profiling reveals clear differences between molecular patterns of wound fluids from acute and chronic wounds.” *Oxid Med Cell Longev*. Volume 2018, Article ID 5286785; doi: 10. 1155/2018/5286785.

- 5b3) Hegedűs C., Kovács K., Polgár Z., Regdon Z., Szabó É., **Robaszekiewicz A.**, Forman H.J., Martner A., Virág L. "Redox control of cancer cell destruction." *Redox Biol.* 2018 Jun; 16:59-74. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.015.
- 5b4) Hrubí E., Imre L., **Robaszekiewicz A.**, Virág L., Kerényi F., Nagy K., Varga G., Jenei A., Hegedűs C. "Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin." *Hum Cell.* 2018 Apr; 31(2):139-148; doi: 10.1007/s13577-018-0202-5
- 5b5) Płoszaj T., Jędrychowska-Dańska K., Masłowska A., Kozłowski T., Chudziak W., Bojarski J., **Robaszekiewicz A.**, Witas H.W. "Analysis of medieval mtDNA from Napole cemetery provides new insights into the early history of 1.Polish state." *Ann Hum Biol.* 2017 Feb; 44(1):91-94; doi: 10.3109/03014460.2016.1151550.
- 5b6) Hegedűs C., **Robaszekiewicz A.**, Lakatos P., Szabó É., Virág L. "Poly(ADP-ribose) in the bone: from oxidative stress signal to structural element." *Free Radic Biol Med.* 2015 May; 82:179-86; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.027.
- 5b7) **Robaszekiewicz A.**, Bartosz G., Pitt A.R., Thakker A., Armstrong R.A., Spickett C.M., Soszyński M. "HOCl-modified phosphatidylcholines induce apoptosis and redox imbalance in HUVEC-ST cells." *Arch Biochem Biophys.* 2014 Apr 15; 548:1-10; doi: 10.1016/j.abb.2014.02.013.
- 5b8) Virág L., **Robaszekiewicz A.**, Rodriguez-Vargas J.M., Oliver F.J. "Poly(ADP-ribose) signaling in cell death." *Mol Aspects Med.* 2013 Dec; 34(6):1153-67; doi: 10.1016/j.mam.2013.01.007.

#### **Pozostałe publikacje naukowe (monografie):**

- 5b9) **Robaszekiewicz A.** "Inhibitory enzymów modyfikujących histony jako narzędzia służące modulowaniu ekspresji genów determinujących pluripotencję komórek macierzystych oraz procesu różnicowania", rozdział w materiałach pozjazdowych pt. "Innowacje w polskiej nauce w obszarze life science i ochrony środowiska. Przegląd aktualnej tematyki badawczej", 2016, Wydawnictwo Nauka i Biznes, strony 5-15,
- 5b10) Wiśnik E., Kwiatkowska M., **Robaszekiewicz A.** "Modyfikacje epigenetyczne a rozwój transformacji nowotworowej." rozdział w materiałach pozjazdowych pt. "Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: Nauki Medyczne i Nauki o Zdrowiu", 2015, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy: ISBN: 978-83-942083-1-8, strony 173-178
- 5b11) Wiśnik E., Kwiatkowska M., **Robaszekiewicz A.** "Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych a inhibitory polimeraz poli(ADP-rybozy)." rozdział w materiałach pozjazdowych pt. "Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: Nauki Medyczne i Nauki o Zdrowiu", 2015, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy: ISBN: 978-83-942083-1-8, strony 165-172
- 5b12) **Robaszekiewicz A.**, Wiśnik E. "The search for molecular principles of PARP1 expression: *in silico* study." rozdział w materiałach pozjazdowych pt. "Badania i Rozwój Młodych

Naukowców w Polsce: Nauki Przyrodnicze”, 2015, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy: ISBN: 978-83-942083-1-8, strony 131-137

- 5b13) **Robaszkiewicz A.**, Wiśnik E. “Biochemical and cellular aspects of protein mono- and poly(ADP-ribosyl)ation” rozdział w materiałach pozjazdowych pt. “Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: Nauki Przyrodnicze”, 2015, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy: ISBN: 978-83-942083-1-8, strony 126-131

#### **Doniesienia konferencyjne:**

- Regdon Z., Robaszkiewicz A., Kiss A., Kovács K., Hegedűs C., Virág L. “Novel ways to control PARP1-mediated cell death” 2-5 września 2018 - FEBS3+ Meeting, “From molecules to living systems”, Siófok, Węgry
- Płoszaj T., Pietrzak J., Robaszkiewicz A. “Bioinformatic ChIP-Seq-based approach to identify PARP1 dependent genes in cancer cells” 7-12 lipca 2018 – 43 FEBS Congress “Biochemistry Forever”, Praga, Czechy
- Ionov M., Robaszkiewicz A. “Analysis of PARP1 and histone modifications by ChIP-Seq may allow to predict genes transcriptionally controlled by PARP1” 21-23 maja 2018 – Symposium and Summer School “Fundamental Principles of cancer biotherapy”, Kijów, Ukraina
- Pietrzak J., Bryszewska M., Robaszkiewicz A. “PARP1 inhibitors modulate cytokine transcription in THP-1 model of acute monocytic leukemia cells” 21-23 maja 2018 – Symposium and Summer School “Fundamental Principles of cancer biotherapy”, Kijów, Ukraina
- Bodnár E., Bakondi E., Kovács K., Hegedus C., Lakatos P., Robaszkiewicz A., Regdon Z., Virág L., Szabó E. “Role Of Oxidative Stress In Acute And Chronic Wound” 4-8 lutego 2018 - World Congress of Phlebology, Melbourne, Australia.
- Chmielewska K., Robaszkiewicz A. „Rola białka PARP1 w regulowaniu ekspresji eRNA dla IL1beta w ludzkich monocytach i makrofagach” 17 listopada 2017 – VI Ogólnokrajowa Konferencja “Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój”, Warszawa, Polska
- Tempka D., Tokarz P., Chmielewska K., Pietrzak J., Robaszkiewicz A. “By downregulating transcription of PARP1, CDK4/6 inhibitors sensitize human lung cancer cells to oxidative stress-induced DNA damage triggered by WP631 and etoposide” 21-23 czerwca 2017 - Oxygen Club of California (OCC) World Congress and Annual Society for Free Radical Research-Europe (SFRR-E) Conference 2017, Berlin, Niemcy
- Tempka D., Tokarz P., Chmielewska K., Pietrzak J., Robaszkiewicz A. “Downregulation of PARP1 transcription by CDK4/6 inhibitors sensitizes human lung cancer cells to oxidative stress-induced DNA damage induced by WP631 and etoposide” 17–19 maja 2017 – “PARP2017”, Budapeszt, Węgry,
- Robaszkiewicz A. „Wykorzystanie inhibitorów deacetylaz histonów w celu modulowania ekspresji genów warunkujących pluripotencję oraz ekspresję genów związanych

z funkcjonowaniem ludzkich monocytów” 28 października 2016 –II Ogólnopolska Konferencja Innowacyjni Naukowcy, Wrocław, Polska

- Virag L., Robaszekiewicz A., Kovacs K. “PARylation in the bone: from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced signal to structural element in the bone” 8-11 czerwca 2016 – SFRR Europe Meeting, Budapeszt, Węgry
- Wiśnik E., Robaszekiewicz A. “ADP-ribosylation of distal cis-regulatory chromatin regions of proinflammatory cytokines as a mechanism, which determines their transcription in proinflammatory macrophages M1” 21–24 maja 2016 - European Human Genetics Conference, Barcelona, Hiszpania
- Robaszekiewicz A., Wiśnik E. “Physiological repression of PARP1 transcription during proinflammatory macrophages development results from differentiation-associated cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase” 21–24 maja 2016 - European Human Genetics Conference, Barcelona, Hiszpania
- Wiśnik E., Pikus E., Robaszekiewicz A. „ADP-rybozylacja dystalnych regionów cis-regulatorowych cytokin prozapalnych jako mechanizm determinujący ich transkrypcję w prozapalnych makrofagach o fenotypie M1” 12-14 maja 2016 – BIOOPEN II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, Łódź, Polska
- Pikus E., Wiśnik E., Robaszekiewicz A. „Wpływ białka PARP1 na powstawanie immunotolerancji ludzkich monocytów wywołanej działaniem endotoksyny bakteryjnej” 12-14 maja 2016 – BIOOPEN II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, Łódź, Polska
- Wiśnik E., Pikus E., Robaszekiewicz A. „Udział PARP1 w regulacji ekspresji genów *IL1β* i *TNFα* kontrolowanej przez czynnik NFκB w makrofagach” 25 listopada 2015 – Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce (Nauki Przyrodnicze), Wrocław, Polska
- Pikus E., Wiśnik E., Robaszekiewicz A. „Epigenetyczne zmiany w obrębie sekwencji promotorowych genów kodujących cytokiny prozapalne w odpowiedzi na LPS” 25 listopada 2015 – Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce (Nauki Przyrodnicze), Wrocław, Polska
- Robaszekiewicz A. “ADP-ribosylation of histones shapes epigenetic landscape in core promoters of cytokines” 29 września - 2 października 2015 EMBL Advanced Course “Whole Transcriptome Data Analysis”, Heidelberg, Niemcy
- Hrubí E., Imre L., Robaszekiewicz A., Virág L., Kerényi F., Nagy K., Varga G., Jenei A., Hegedűs C. „Investigation of BMP2 impact on bone formation in vitro” 24–26 września 2015 – XXI Congress of the Association of Hungarian Dentists, Pécs, Węgry
- Wiśnik E., Robaszekiewicz A. “Differentiation of monocytes into macrophages as the mechanism predisposing to synthesis of proinflammatory cytokines” 12-19 września 2015 – FEBS Advanced Lecture Course “18<sup>th</sup> International Summer School on Immunology: Immune system: genes, receptors and regulation”, Rabac, Chorwacja

- Robaszkiewicz A., Kovacs K., Lakatos P., Szabo E., Virag L. "DNA damage signaling in mesenchymal stem cell differentiation" 4-9 lipca 2015 – 40<sup>th</sup> FEBS Congress "The Biochemical Basis of Life", Berlin, Niemcy
- Hrubí E., Imre L., Robaszkiewicz A., Virág L., Kerényi F., Nagy K., Varga G., Jenei A., Hegedűs C. "Effect of BMP-2 in vitro on bone formation" 16-18 kwietnia 2015 – XVI Dental Days, Debrecen, Węgry
- Hrubí E., Imre L., Robaszkiewicz A., Virág L., Kerényi F., Pahalocsek M., Bíró S., Nagy K., Varga G., Jenei A., Hegedűs C. "BMP-2 homodimeric effect on osteogenic differentiation cell lines" 3 – 5 kwietnia 2014 - XV Dental Days, Debrecen, Węgry
- Hrubí E., Imre L., Robaszkiewicz A., Virág L., Jenei A., Hegedűs C. "BMP-2 homodimeric effect on osteogenic differentiation cell lines" 27-28 września 2013 - XX Congress of the Association of Hungarian Dentists, Debrecen, Węgry
- Robaszkiewicz A., Virag L. "Reactive oxygen species stimulate TGFbeta expression during osteogenic differentiation" 2-5 września 2013 – 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego "Od Sekwencji Kwasów Nukleinowych do Medycyny Naturalnej", Toruń, Polska
- Hrubí E., Imre L., Robaszkiewicz A., Virág L., Jenei A., Hegedűs C. "BMP-2 homodimeric effect on osteogenic differentiation on HEPM and Saos-2 cell lines" 12-13 kwietnia 2013, XIV Dental Days, Debrecen, Węgry

#### **Wygłoszone referaty na międzynarodowych konferencjach naukowych**

- Wykład plenarny (przewodnicząca sesji): "PARP1 Links Transcription of a Subset of RBL2-Dependent Genes with Cell Cycle Progression", Wiśnik E, Regdon Z, Chmielewska K, Virag L, Robaszkiewicz A, ICECT 2018: 20 Międzynarodowy Kongres Epigenetyki, Chromatyny i Transkrypcji, 8-9 stycznia 2018, Singapur
- Wykład plenarny: "PARP1-dependent chromatin remodeling during osteoblast and osteoclast differentiation shapes expression of autocrine-acting cytokines", Robaszkiewicz A, Coroczny Zjazd Europejskiego Towarzystwa do Badań nad Wolnymi Rodnikami (SFRR-E), 8-11 czerwca 2016, Budapeszt, Węgry
- "ADP-ribosylation of distal cis-regulatory chromatin elements of pro-inflammatory cytokines determines their transcription by modulating promoter-enhancer interaction in proinflammatory macrophages", Wiśnik E., Robaszkiewicz A., warsztat zorganizowany przez FEBS/IUBMB pt. "Biointeractomics: from bimolecular interactions to networks", 17–20 maja 2016, Sevilla, Hiszpania
- "The use of FITC-cojugated antibodies combined with flow cytometry for detection of 3-chlorinated tyrosines in human cells", Robaszkiewicz A., warsztat zorganizowany przez FEBS pt. "Techniques in Free Radical Biology", 27 sierpnia – 2 września 2010, Debrecen, Węgry

### 5c) Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych

Autorska i współautorka 27 badawczych i przeglądowych prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, o łącznym indeksie cytowań 344 (Web of Science) i indeksie Hirscha = 9. Autorka i współautorka dwóch prac przeglądowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu krajowym, jednego rozdziału w książce oraz 5 monografii.

Liczba opublikowanych prac w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym	27
Sumaryczny impact factor*	114.68
Punkty MNiSW	865
Liczba cytowań bez autocytowań	344
Indeks Hirscha	9
Liczba opublikowanych prac będących podstawą osiągnięcia naukowego	9
Sumaryczny impact factor* osiągnięcia naukowego	50.02
Punkty MNiSW osiągnięcia naukowego	360
Liczba cytowań bez autocytowań osiągnięcia naukowego	41

\* impact factor zgodnie z rokiem opublikowania

### 5d) Udział w projektach badawczych

- „Poszukiwanie molekularnych podstaw niestabilności genomu i karcynogenezy - MolMedEx TUMORDNS ” GINOP-2.3.2-15-2016-00020, okres realizacji: 2016-2019, budżet: 1 000 000 EUR, miejsce realizacji: Katedra Chemii Medycznej, Uniwersytet w Debreczynie, Węgry, charakter udziału w projekcie – wykonawca
- „Rola białka PARP1 w regulowaniu ekspresji eRNA dla *IL1β* w ludzkich monocytach i makrofagach” Studenckie Granty Badawcze, Uniwersytet Łódzki, beneficjent: p. Kinga Chmielewska (studentka kierunku Biotechnologia Medyczna, UŁ), okres realizacji: lipiec-grudzień 2017, miejsce realizacji: Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, charakter udziału w projekcie - opiekun naukowy

- „Fizjologiczne znaczenie obniżenia ekspresji białka PARP1 dla aktywowania proksymalnych i dystalnych (wzmacniaczy) regionów cis-regulatorowych NF-κB zależnych genów IL1b oraz TNFa w trakcie różnicowania i polaryzacji fenotypu prozapalnych makrofagów M1.” PRELUDIUM 10 Narodowe Centrum Nauki, UMO-2015/19/N/NZ2/01735, okres realizacji: 2016-2018, budżet: 150 000 zł, miejsce realizacji: Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki – **opiekun naukowy**
- „Transkrypcyjno-epigenetyczna rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w warunkowaniu ekspresji czynników prozapalnych kontrolowanych przez os NF-κappaB w mieloidalnych komórkach efektorowych.” SONATA 6 Narodowe Centrum Nauki, UMO-2013/11/D/NZ2/00033, okres realizacji: 2014-2019, budżet: 495 000 zł, miejsce realizacji: Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki – **kierownik**
- „Rola białek ARTD1 (PARP1) i SIRT1/2 jako regulatorów ekspresji genów zależnych od NF-κappaB w trakcie osteoklastogenezy”. SciexNMS – program wymiany naukowej między Szwajcarią a nowymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej, CCO-CRUS 12.193, okres realizacji: 2013-2014, budżet: 80 000 CHF, miejsce realizacji: Katedra Biochemii Weterynaryjnej i Biologii Molekularnej, Uniwersytet w Zurychu, Szwajcaria **Beneficjent**
- „Molekularna Medycyna Regionalne Centrum Doskonałości (MOLMEDREX)”, MOLMEDREX FP7-REGPOT-2008-1 (FP7-PEOPLE-2009-RG), okres realizacji: 2009-2012, budżet: 957 000 EUR, miejsce realizacji: Katedra Chemii Medycznej, Uniwersytet w Debreczynie, Węgry - **wykonawca**
- "Rola poli(ADP-rybozylacji) w regulowaniu różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych”, Węgierski Fundusz Naukowy, OTKA K82009, okres realizacji: 2010-2013, budżet: 80 000 EUR, miejsce realizacji: Katedra Chemii Medycznej, Uniwersytet w Debreczynie, Węgry – **wykonawca**
- "Molekularna onkologia: identyfikacja celów dla rozwoju terapii przeciwnowotworowych” Węgierski Program Operacyjny Odnowy Społecznej, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, okres realizacji: 2012-2014, budżet: 3 000 000 EUR, miejsce realizacji: Katedra Chemii Medycznej, Uniwersytet w Debreczynie, Węgry – **wykonawca**
- „Mechanizmy cytotoksycznego działania chlorohydrzyn.” Grant Promotorski Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, NN301283737, okres realizacji: 2009-2012, budżet 50 000 zł, miejsce realizacji: Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki - **beneficjent/wykonawca**
- „Liposomy jako nośniki chlorohydrzyn lipidowych. Charakterystyka 3-chlorotyrozyny jako markera kwasu chlorowego (I)” Europejski Fundusz Społeczny i Budżet Państwa, 3/S-UŁ/2009, okres realizacji: 2009, budżet 20 000 zł, miejsce realizacji: Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki – **kierownik**



## **5e) Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych**

### 5e1) Dłuższe pobyty naukowe

- FEBS Short-Term Fellowship – stypendium przyznane na odbycie stażu naukowego Wnioskodawczyni pomiędzy 08.10.2018-22.11.2018 w zespole naukowym Molekularnych Badań Biomedycznych na Uniwersytecie Aston w Birmingham, Wielka Brytania
- SciexNMS – program wymiany naukowej między Szwajcarią a nowymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej, CCO-CRUS 12.193, okres realizacji: 16.09.2013-15.09.2014, miejsce realizacji: Katedra Biochemii Weterynaryjnej i Biologii Molekularnej, Uniwersytet w Zurychu, Szwajcaria
- COST-B35 Lipid peroxidation – stypendium przyznane na odbycie stażu naukowego Wnioskodawczyni pomiędzy 01.05-31.05.2008 w Instytucie Farmacji i Nauk Biologicznych na Uniwersytecie Starthclyde w Glasgow, Szkocja

### 5e2) Krótsze pobyty naukowe i stypendia na udział w konferencjach i warsztatach naukowych

- program wymiany naukowej między Szwajcarią a nowymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej (Sciex-NMS) - stypendium przyznane na udział w 39-tym Kongresie FEBS/EMBO, 30 sierpnia – 4 września 2014, Paryż, Francja
- program wymiany naukowej między Szwajcarią a nowymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej (Sciex-NMS) - stypendium przyznane na udział w 11-tym zjeździe EMBL “Transcription and Chromatin”, 23-26 sierpnia 2014, Heidelberg, Niemcy
- Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) - stypendium przyznane na udział w 38-mym Kongresie FEBS „Mechanisms in Biology”, 6–11 lipca 2013, St. Petersburg, Rosja
- Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) - stypendium przyznane na udział w 35-tym Kongresie FEBS „Molecules of Life”, 26 czerwca –1 lipca 2010, Gothenburg, Szwecja
- Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) - stypendium przyznane na udział w warsztacie eksperymentalnym „Technics in Free Radical Biology”, 27 sierpnia – 2 września 2010, Debreczyn, Węgry
- Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) - stypendium przyznane na udział w kursie “Mechanisms, consequences and detection of free radical mediated oxidative protein modifications”, 15-20 kwietnia 2009, Kemer Antalya, Turcja
- Europejskie Stowarzyszenie Towarzystw Biofizycznych (EBSA) - stypendium przyznane na udział w 7-mym Europejskim Kongresie Biofizycznym 11-15 lipca 2009, Genua, Włochy

- COST-B35 Peroksydacja Lipidów - stypendium przyznane na udział w szkole letniej "Lipid peroxidation and free radical signaling: role in pathophysiology" 30 sierpnia - 5 września 2008, Spetses, Grecja
- Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej - program „Stypendia konferencyjne” – stypendium przyznane na udział w Europejskim Kongresie Towarzystwa do Badań nad Wolnymi Rodnikami (SFRR-E) 5–9 lipca 2008, Berlin, Niemcy

#### 5e3) Programy kształcące umiejętności miękkie

- Program SKILLS Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - „Zarządzanie Zespołem Naukowym”, stypendium przyznane na udział w szkoleniu, 12-13 luty 2015 Warszawa, Polska
- Program SKILLS Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - „Komercjalizacja Wyników Prac Badawczych”, stypendium przyznane na udział w szkoleniu, 28-30 stycznia 2015, Warszawa, Polska

#### 5f) Staże zagraniczne

- Centrum Molekularnych Badań Biomedycznych na Uniwersytecie Aston w Birmingham, Wielka Brytania, październik-listopad 2018
- Katedra Chemii Medycznej Uniwersytetu w Debreczynie, Węgry, sierpień-grudzień 2017
- Instytucie Biochemii Weterynaryjnej i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Zurychu, Szwajcaria, 2013-2014
- Katedra Chemii Medycznej Uniwersytetu w Debreczynie, Węgry, 2011–2013
- Instytut Farmacji i Nauk Biologicznych Uniwersytetu Starthclyde w Glasgow, Szkocja, maj 2008

#### 5g) Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda za najlepszy wykład w trakcie kongresu ICECT 2018: 20 Międzynarodowy Kongres Epigenetyki, Chromatyny i Transkrypcji, Singapur 2018, przyznana przez komitet organizacyjny
- **Stypendium naukowe dla wybitnych młodych naukowców przyznane na lata 2017-2019 przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego**
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego przyznana w roku 2012 za cykl prac związanych z rozprawą doktorską
- Nagroda za najlepszy plakat przyznana w roku 2009 przez Europejskie Stowarzyszenie Towarzystw Biofizycznych w trakcie Kongresu EBSA w Genewie
- **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia przyznane na rok akademicki 2006/2007**

- Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla studentów przyznana za rok akademicki 2004/2005 oraz 2005/2006

#### 5h) Recenzje artykułów

- Epigenetics and Chromatin - 1
- Scientific Reports – 2
- Journal of Cancer Treatment and Diagnosis - 2
- Toxicology in Vitro – 2
- Global Research Journal of Microbiology (GRJM) – 2
- Free Radical Research – 2
- PlosONE - 1

### 6. Działalność dydaktyczna i organizatorska

#### 6a) Opieka naukowa nad magistrantami i licencjuszami:

- Promotor pracy magisterskiej, rok akademicki 2017/2018, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, student: Kinga Chmielewska, data obrony pracy: czerwiec 2018, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, tytuł pracy: „Rola białka PARP1 w regulowaniu ekspresji eRNA dla IL1 $\beta$  w ludzkich monocytach i makrofagach.” recenzent: dr hab. Maksim Ionov
- Promotor pracy licencjackiej, rok akademicki 2016/2018, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, student: Klaudia Kornat, data obrony: lipiec 2018, kierunek: biologia, tytuł pracy: „Udział białka PARP1 w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych DNA” recenzent: dr Anna Pieniążek
- Promotor pracy magisterskiej, rok akademicki 2016/2017, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, student: Dominika Tempka, data obrony pracy: czerwiec 2017, kierunek: biologia, specjalność: biofizyka medyczna i bioinformatyka, tytuł pracy: „Ocena możliwości zastosowania inhibitorów cyklin zależnych od kinaz 4 i 6 w celu uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie leków generujących stres oksydacyjny.” recenzent: dr hab. Aleksandra Rodacka,
- Promotor pracy magisterskiej, rok akademicki 2015/2016, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, student: Marcin Jaras, data obrony pracy: czerwiec 2016, kierunek: biotechnologia, specjalność: biofizyka, tytuł pracy: „Detekcja ADP-rybozylacji białek związanych z chromatyną w obrębie sekwencji promotorowych wybranych cytokin prozapalnych.” recenzent: dr hab. Magdalena Łabieniec-Watała

**6b) Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze bezpośredniego opiekuna w ramach realizowanych na Uniwersytecie Łódzkim projektów:**

- Mgr Maciej Sobczak, od 01.10.2018, „Zastosowanie analizy bioinformatycznej danych uzyskanych za pomocą sekwencjonowania nowej generacji w poszukiwaniu molekularnych podstaw wzrostu i inwazyjności komórek nowotworowych”, Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, program Interdoc STArT, charakter opieki naukowej – opiekun
- Mgr Julita Pietrzak, od 01.10.2017, „Dynamika struktury chromatyny warunkowana inhibicją białka PARP1 w indukowanej endotoksyną immunotolerancji ludzkich prozapalnych makrofagów”, Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, charakter opieki naukowej – opiekun
- Mgr Ewelina Wiśnik, 01.10.2014-23.05.2017, „Udział polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1) w potranslacyjnych modyfikacjach histonów w makrofagach”, Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, charakter opieki naukowej – promotor pomocniczy, przewód zamknięty bez obrony doktorantki

**6c) Opieka naukowa nad zagranicznym stypendystą:**

- Purvi Shrivastava, studentka drugiego roku studiów pierwszego stopnia na Uniwersytecie JECRC w Jaipur w Indiach, kierunek: biotechnologia, okres praktyk: 1 czerwca – 24 lipca 2018

**6d) Działalność dydaktyczna (od roku 2012):**

- Przygotowanie przedmiotu „Bioinformatyka w genomice i proteomice” (wykład – 13 godzin i ćwiczenia – 13 godzin) dla pierwszego roku studiów drugiego stopnia na kierunku: biologia, specjalność: biofizyka medyczna i bioinformatyka
- Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Chemia fizyczna” dla pierwszego roku studiów pierwszego stopnia na kierunku: biologia oraz dla drugiego roku zaocznych studiów drugiego stopnia kierunku: biologia
- Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Postawy fizyki i biofizyki” dla pierwszego roku studiów pierwszego stopnia na kierunku: mikrobiologia
- Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Technologie informacyjne” dla pierwszego roku studiów pierwszego stopnia na kierunku: biologia oraz zaocznych studiów pierwszego stopnia na kierunku: biologia

**6e) Działalność w zakresie popularyzacji nauki:**

- Warsztat przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Elektroforeza DNA w żelu agarozowym” dla Liceum Ogólnokształcącego

---

w Poddębicach, data warsztatu: październik 2018, prowadzący: dr Agnieszka Robaszkiewicz, mgr Julita Pietrzak, mgr Maciej Sobczak

- Warsztaty w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Dziedziczenie na przykładzie muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*)”, data warsztatu: 4 jednogodzinne spotkania pomiędzy październikiem 2017 a kwietniem 2018, prowadzący: dr Agnieszka Robaszkiewicz, dr hab. Maksim Ionov, mgr Sylwia Michlewska, mgr Julita Pietrzak, mgr Żaneta Rygielska, Kinga Chmielewska
- Warsztaty w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Molekularne nożyczki DNA”, data warsztatu: 4 jednogodzinne spotkania pomiędzy październikiem 2016 a kwietniem 2017, prowadzący: dr Agnieszka Robaszkiewicz, dr hab. Piotr Duchnowicz
- Warsztat w ramach Nocy Biologów przeprowadzony na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pt. „Elektroforeza DNA”, data warsztatu: styczeń 2017, prowadzący: dr Agnieszka Robaszkiewicz, dr hab. Piotr Duchnowicz, mgr Ewelina Wiśnik, mgr Ewa Pikus, mgr Aneta Wolska

*Agnieszka Robaszkiewicz*