

1. Imię i Nazwisko Michał Błażej Ponczek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania o raz tytułu rozprawy doktorskiej

- Dyplom i stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych, dyscyplina biochemia, Studium doktoranckie Biochemiczno-Biofizyczne, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, październik 2007. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Zmiany aktywności koagulacyjnej fibrynogenu wywołane reaktywnymi formami azotu i tlenu”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Wachowicz.
- Dyplom ukończenia studiów podyplomowych z informatyki, Wydział Matematyki i Informatyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź, czerwiec 2007.
- Dyplom i tytuł zawodowy magistra biologii, specjalność biochemia, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Tytuł pracy magisterskiej „Wpływ nadtlenoazotynu na właściwości polimeryzacyjne monomerów fibryny”, Łódź, czerwiec 2003 roku.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

- Zatrudnienie na etacie adiunkta w Katedrze Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska - od 1 grudnia 2007 roku do chwili obecnej.
- Staż naukowy na Uniwersytecie Kalifornijskim San Diego (UCSD), La Jolla, USA, w ramach stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej w laboratorium Prof. Russella Doolittle'a od 11 kwietnia 2008 roku do 11 lipca 2008 roku. Tytuł projektu: „*Studies on the sequences of published trace DNA to localize and analyze genes for clotting proteins of Chordata, the evolutionary and functional aspects*”.

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego: „Zastosowanie metod bioinformatyki i chemii obliczeniowej w badaniu ewolucji i procesów biochemicznych proteaz serynowych krzepnięcia krwi i fibrynolizy”

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF): **19.137**

Punktacja MNiSW (2016): **186**

Liczba cytowań (Web of Science Core Collection, luty 2017): **56**

bez autocytań: **54**

Oryginalne prace badawcze:

- 1. Ponczek MB**, Gailani D, Doolittle RF. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. (2008) 6: 1876-1883 (IF=6.291, pkt. MNiSW=40, liczba cytowań bez autocytań=48)
- 2. Ponczek MB**, Bijak MZ, Nowak PZ. Evolution of Thrombin and Other Hemostatic Proteases by Survey of Protochordate, Hemichordate, and Echinoderm Genomes. *Journal of Molecular Evolution* (2012) 74: 319–331 (IF=2.145, pkt. MNiSW=15, liczba cytowań bez autocytań=4)
- 3. Kolodziejczyk-Czepas J, Ponczek MB**, Nowak P. Peroxynitrite and fibrinolytic system - the effects of peroxynitrite on t-PA-induced plasmin activity. *International Journal of Biological Macromolecules* (2015) 81: 212-219 (IF=3.138, pkt. MNiSW=35, liczba cytowań bez autocytań=1)
- 4. Ponczek MB**. The susceptibility of plasma coagulation factor XI to nitration and peroxynitrite action. *International Journal of Biological Macromolecules* (2016) 91: 589-597 (IF=3.138, pkt. MNiSW=35)
- 5. Kasperkiewicz K, Malecka M, Ponczek MB**, Nowak P, Budzisz E. Design, synthesis, X-ray structures of the new coumarin derivatives and perspectives of binding them to albumin and vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Crystal Growth & Design* (2016) 16: 456-466 (IF=4.891, pkt. MNiSW=35, liczba cytowań bez autocytań=1)

Prace przeglądowe:

6. **Ponczek MB.** Czynniki kontaktu układu hemostazy: badanie ewolucji molekularnej oraz nowe perspektywy terapeutyczne. [ang. *The contact factors of hemostasis: examination of molecular evolution and new therapeutic perspectives*] *Postępy Biochemii* (2010) 56: 67-74 (pkt. MNiSW=5)
7. **Ponczek MB.** Ewolucja układu hemostazy kręgowców. [ang. *Evolution of vertebrate hemostatic system*] *Kosmos* (2010) 59: 83-90 (pkt. MNiSW=12)
8. **Ponczek MB, Bijak M.** Czynniki kontaktu w fizjologicznym krzepnięciu krwi oraz w zakrzepicy. [ang. *Contact factors in blood clot formation and in thrombosis*]. *Nowa Medycyna* (2013) 2: 72-79 (pkt. MNiSW=9)

Informacje dotyczące mojego wkładu i wkładu współautorów w poszczególnych pracach zawarte są w załącznikach 3 (wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych) i 5 (oświadczenia współautorów prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego).

c) Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Moje zainteresowania naukowe dotyczą białek uczestniczących w krzepnięciu krwi i fibrynolizie, w szczególności grupy białek zaliczanych do rodziny **proteaz serynowych** (Di Cera 2009). W mojej pracy badawczej wykorzystuję metody biochemiczne i bioinformatyczne. Biochemią krzepnięcia krwi zajmowałem się już w czasie realizacji pracy magisterskiej, a następnie doktorskiej. Krzepnięcie krwi jest zjawiskiem biochemicznym, które towarzyszy człowiekowi od urodzenia do śmierci, ratując od utraty krwi po zranieniu. Gdy u niektórych ludzi krew krzepnie słabiej lub nie krzepnie w ogóle, mamy do czynienia z zagrażającą życiu chorobą zwaną hemofilią. Jeśli krew krzepnie zbyt intensywnie, wtedy także pojawia się sytuacja mogąca doprowadzić do śmierci poprzez zakrzepy (skrzepliny), zatykające naczynia krwionośne. Krzepnięcie krwi obejmuje złożone procesy, w skład których wchodzi chemiczne czynniki białkowe i niebiałkowe (Ryc. 1) oraz biologiczne elementy morfotyczne – płytki krwi u ssaków, trombocyty u pozostałych kręgowców, zawieszane w osoczu krwi. U człowieka występuje osiem białek będących nieaktywną formą enzymów proteolitycznych (zymogenów) - **proteaz serynowych** (czynniki krzepnięcia VII, IX, X, protrombina inaczej czynnik II, białko C, czynnik XII, XI, prekalikreina osoczowa), które, wraz z dodatkowymi kofaktorami białkowymi (czynnik tkankowy, czynnik V, VIII, trombomodulina, białko S, wielkocząsteczkowy kininogen), w kaskadzie krzepnięcia odpowiadają

Nonaka i Yoshizaki 2004). Złożoność i zarazem bardzo dokładne dopasowanie hemostazy skłania do odniesień filozoficznych, gdzie dwie przeciwstawne siły Yin i Yang są warunkiem równowagi, ale każda z nich zawiera część tej drugiej (Doolittle 1993). Usposabia również do zadania pytania w jaki sposób tak skomplikowany system powstał. Zagadnienie to stało się podstawą do wieloletniej debaty między ewolucjonistami a kreacjonistami lub przedstawicielami łagodniejszej formy - zwolennikami „inteligentnego projektu”.
Emergencja ewolucyjna, czy boski projekt i kreacja (Ard 2003, Doolittle 1993, Doolittle 2009)? Przez lata naukowcy zdobyli wiele nowych danych na temat możliwej ewolucji układu krzepnięcia krwi dzięki częściowemu poznaniu mechanizmów, białek i genów zwierząt, które wcześniej oddzieliły się od wspólnego przodka prowadzącego do człowieka (Doolittle 1993, Davidson i współaut. 2003a, Davidson i współaut. 2003b). Ogromną rolę odegrała niewątpliwie rewolucja biologii molekularnej i informatyki formując nową dziedzinę bioinformatykę. W ostatnim dziesięcioleciu dokonano sekwencjonowania całych genomów różnych organizmów (Dehal i współaut. 2002, Putnam i współaut. 2008, Warren i współaut. 2008), dzięki opracowaniu nowych technik i automatyzacji sekwencjonowania kwasów nukleinowych, a postęp technologiczny przyniósł możliwość dokonywania analiz informatycznych w rozsądnym czasie, dzięki przyrostowi mocy obliczeniowej komputerów. Już opublikowanie pierwszych „surowych” sekwencji genomowych lancetnika umożliwiło dowiedzenie przez Doolittle i wsp. (Doolittle i współaut. 2008) między innymi, że czynnik IX powstał na skutek duplikacji genu dla czynnika X, a czynnik VIII duplikacji czynnika V, wskazując duplikacje genomowe i tasowanie eksonów jako niezmiernie istotne dla ewolucji układu hemostazy. Wymieniona praca naukowa zainspirowała mnie do skontaktowania się z jej głównym autorem, Profesorem Russelem Doolittle w celu podjęcia współpracy i badań nad ewolucją białek krzepnięcia i wnioskowania m.in. do Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej o staż podoktorski. Zainspirowało mnie to dalej do podjęcia tematu badawczego ewolucji **proteaz serynowych** krzepnięcia i fibrynolizy oraz jej znaczenia dla właściwości biochemicznych białek hemostazy. W pracach naukowych przedstawionych do oceny wykorzystałem metody bioinformatyczne analizy sekwencji genomów i białek, metody filogenetyki molekularnej oraz metody chemii obliczeniowej, tak aby poznać nieznaną do tej pory elementy układanki pochodzenia ewolucyjnego proteaz krzepnięcia i fibrynolizy, wpływające na właściwości biochemiczne tych białek. Celem przedkładanego do oceny osiągnięcia naukowego, w postaci cyklu publikacji powiązanych tematycznie, było zatem poszerzenie wiedzy o ewolucji i procesach biochemicznych, w tym przede wszystkim przebiegających w stresie nitracyjnym, dotyczących **proteaz serynowych** krzepnięcia i fibrynolizy z zastosowaniem metod bioinformatycznych i chemii obliczeniowej, co mogłoby się przyczynić do opracowania w przyszłości nowych terapii przeciwzakrzepowych u człowieka. Do realizacji tak nakreślonego celu zastosowałem metody takie jak: przeszukiwanie standardowych baz danych sekwencji białkowych i genowych, a w przypadku braku takich danych przeszukiwanie i rekonstrukcja sekwencji kodujących homologi białek hemostazy w genomach zsekwencjonowanych organizmów, analizę uzyskanych sekwencji poprzez uliniowienia wielosekwencyjne, badania budowy domenowej,

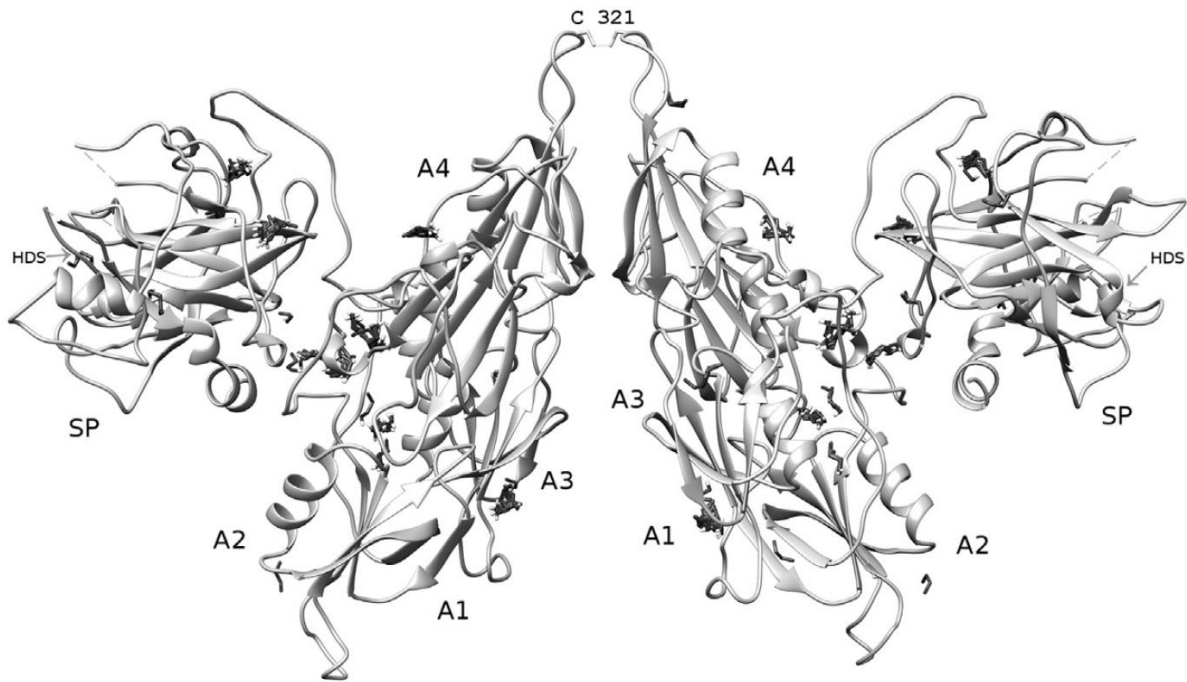
analizy filogenetyczne, budowanie hipotetycznych modeli przestrzennych w oparciu o modelowanie homologiczne, symulacje oddziaływań białek hemostazy kręgowców i ich homologów z potencjalnymi ligandami, dzięki metodom dokowania *in silico* oraz przewidywanie nitrowania białek za pomocą programu GPS-YNO2 (<http://yno2.biocuckoo.org/>). Wnioski opracowane na podstawie moich badań rozszerzają wiedzę w zakresie biochemii krzepnięcia krwi człowieka w aspekcie ewolucyjnym. Poniżej zamieszczam opracowanie szczegółowych celów naukowych, osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania, poprzez skrócony opis poszczególnych prac, co zawarte jest w poniżej zamieszczonych punktach.

1. Ewolucja proteaz serynowych wewnątrzpochodnego i zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia krwi oraz układu fibrynolizy

Celem naukowym badań było pogłębienie odpowiedzi na pytanie kiedy w ewolucji zwierząt kręgowych pojawiają się oznaki świadczące o obecności białek podobnych do poszczególnych czynników krzepnięcia kręgowców należących do zymogenów **proteaz serynowych**.

1.1. Wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi

W pracy „Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. **Ponczek MB**, Gailani D, Doolittle RF, *Journal of Thrombosis Haemostasis*. (2008) 6: 1876-1883”, zrealizowanej w ramach wnioskowanego przeze mnie zaraz po obronie doktoratu krótkoterminowego stażu naukowego Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO ASTF 83.00-2008) na Uniwersytecie Kalifornijskim w San Diego (USA), pod opieką Profesora Russela Doolittle, w oparciu o bioinformatyczne badania dostępnych sekwencji genomowych kręgowców potwierdziliśmy, że wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi, nazywany także aktywacją krzepnięcia krwi przez kontakt jest nowym elementem charakterystycznym wyłącznie dla ssaków. W opisywanej pracy wskazaliśmy, że czynnik XI nie występuje u ptaków, płazów i ryb. Stwierdziliśmy także brak tego czynnika u ssaka jajorodnego – dziobaka, którego genom został udostępniony w tym samym roku (Warren i współaut. 2008). Niewystępowanie dimerycznego czynnika XI (Ryc. 2), i co za tym idzie także brak aktywacji na drodze wewnątrzpochodnej u stekowców, wykazaliśmy jednakże błędnie, z powodu udostępnianej wówczas niedoskonałej i pełnej luk sekwencji genomowej dziobaka oraz złej interpretacji danych dotyczących wykrytych domen jabłkowych homologicznych z prekallikreiną osoczową i czynnikiem XI. Wykazanie występowania, mimo wszystko, czynnika XI u stekowców, stało się dla mnie możliwe dzięki pojawieniu się nowych sekwencji SRA (ang. *Sequence Read Archives*) dziobaka i kolczatki po 2011 roku, dzięki czemu zrekonstruowałem sekwencję aminokwasową czwartej domeny jabłkowej dla tych stekowców.



Ryc. 2. Struktura przestrzenna homodimeru zymogenu czynnika XI na podstawie struktury krystalicznej 2F83 (Papagrigoriou i współaut. 2006). Domeny: SP- domena katalityczna, A1, A2, A3 i A4 – kolejne domeny jabłkowe. HDS – triada katalityczna – His-Asp-Ser (rycina opublikowana w pracy: Ponczek MB. The susceptibility of plasma coagulation factor XI to nitration and peroxyxynitrite action. *International Journal of Biological Macromolecules* (2016) 91: 589-597).

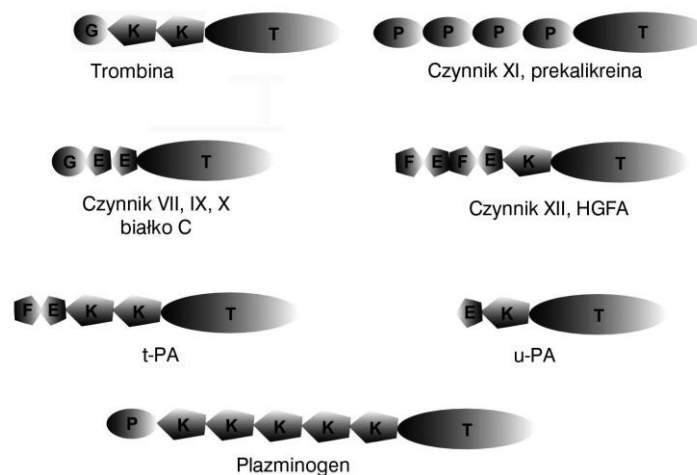
Szlak wewnątrzpochodny kształtując się zatem u przodka wszystkich obecnie istniejących ssaków, poprzez pojawienie się dodatkowego czynnika krzepnięcia (czynnika XI), na skutek duplikacji genu dla prekalikreiny, umożliwił sprzężenie krzepnięcia z układem kinin, pomocniczą aktywację przez kontakt na ujemnie naładowanej powierzchni oraz wspomagające dodatnie sprzężenie zwrotne w generowaniu trombiny, właśnie poprzez XI czynnik krzepnięcia (Ryc. 1). Mimo, że inne proteazy kontaktu oraz wielkocząsteczkowy kininogen pojawiają się znacznie wcześniej w toku ewolucji – czynnik IX u ryb na skutek duplikacji czynnika X, a czynnik XII u płazów na skutek duplikacji aktywatora czynnika wzrostów hepatocytów (HGFA), bez czynnika XI taki układ u kręgowców, przed pojawieniem ssaków, nie ma znaczenia w krzepnięciu krwi, a jest raczej elementem pierwotnego układu kalikreina-kinina, tym bardziej, że nawet u współczesnych ssaków czynnik XII nie wydaje się być niezbędny dla prawidłowego krzepnięcia. Niedobór czynnika XII u człowieka nie powoduje praktycznie żadnych zaburzeń krzepnięcia krwi. Na małe znaczenie czynnika XII wskazywać może także dodatkowo utrata genu dla tego białka przez linię prowadzącą do ptaków oraz zamiana genu czynnika XII u waleni w pseudogen. Bardziej istotny zatem dla prawidłowego krzepnięcia jest jedynie czynnik XI i sprzężony z nim czynnik IX, który w pewnym stopniu może być także aktywowany na drodze zewnątrzpochodnej tj. przez aktywny czynnik VII, podobnie jak paralog czynnika IX czynnik X. Pojawienie się czynnika XI

wyduje się mieć szczególne znaczenie w dodatkowym wzmocnieniu aktywacji krzepnięcia krwi u ssaków, z jednej strony w przypadku zranienia, dając korzyść adaptacyjną aktywnym nocą ssakom ewoluującym „w cieniu dinozaurów”, a z drugiej zwiększając potencjalne ryzyko zakrzepów i zatorów (Gailani i Renne 2007), jako efekt uboczny konieczności przetrwania młodego osobnika i wydania potomstwa. Dlatego czynnik XI wydaje się być dobrym celem dla terapii przeciwzakrzepowych u człowieka (Brenner i Hoffman 2011, Gailani 2014, Gailani i Gruber 2016, Gailani i współaut. 2015, Karuturi i współaut. 2013, Muller i współaut. 2011, Younis i współaut. 2012), tym bardziej, że niedobory czynnika IX oraz jego kofaktora czynnika VII powodują poważne skazy krwotoczne, odpowiednio hemofilię B i hemofilię A, a zaburzenia w produkcji czynnika XI powodują hemofilię C, która charakteryzuje się znacznie łagodniejszym przebiegiem niż dwie poprzednie. Do groźnych krwawień dochodzi zwykle tylko w przypadku zabiegów chirurgicznych i dentystrycznych oraz przy poważnych urazach. Z drugiej strony czynnik XI może być aktywowany zarówno przez aktywny czynnik XII oraz trombinę, szczególnie w trakcie nieprawidłowych procesów prowadzących do formowania zakrzepów. Dochodzi do powstania sprzężenia zwrotnego, które dalej poprzez czynniki IX i X powoduje wzmożone generowanie trombiny, pobudzającej zarówno polimeryzację fibrynogenu i aktywację płytek krwi, jak i generowanie kolejnych porcji aktywnego czynnika XI. Z tego powodu białko to było już od pewnego czasu rozpatrywane jako nowy cel terapii przeciwzakrzepowych. Zagadnienia związane z opisywanymi powyżej problemami naukowymi były celem napisania prac przeglądowych „Czynniki kontaktu układu hemostazy: badanie ewolucji molekularnej oraz nowe perspektywy terapeutyczne, **Ponczek MB**, *Postępy Biochemii* (2010) 56: 67-74”, „Ewolucja układu hemostazy kręgowców, **Ponczek MB**, *Kosmos* (2010) 59: 83-90” oraz „Czynniki kontaktu w fizjologicznym krzepnięciu krwi oraz w zakrzepicy, **Ponczek MB**, *Nowa Medycyna* (2013) 2: 72-79”, w których nakreśliłem ówczesny stan wiedzy na temat ewolucji układu hemostazy, powiązań z układem fibrynolitycznym i znaczenia czynników kontaktu w powstawaniu zakrzepic.

1.2. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi

W pracy przeglądowej „Ewolucja układu hemostazy kręgowców, **Ponczek MB**, *Kosmos* (2010) 59: 83-90” opisałem dostępne w ówczesnej literaturze światowej informacje na temat ewolucji zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia, ograniczające się do spostrzeżeń o obecności uproszczonej kaskady krzepnięcia krwi u prymitywnych kręgowców takich jak bezżuchwowiec minóg (*Petromyzon marinus* L.), nieposiadający czynników VIII i IX (Doolittle i Jiang 2008) oraz pewnych wcześniejszych informacji na temat białek krzepnięcia u ryby rozdymki (*Fugu rubripes* T. et S.) oraz pewnych elementów przypominających domeny białek krzepnięcia u żachwy (Jiang i Doolittle 2003). Skłoniło mnie to do podjęcia badań w celu sprawdzenia jak daleko można się cofnąć w czasie analizując dostępne sekwencje aminokwasowe, aby sprawdzić obecność lub brak białek podobnych do czynników krzepnięcia. Dzięki dostępności dopiero co zsekwencjonowanych genomów prymitywnych strunowców (lancetnika *Branchiostoma floridae* H. i żachwy *Ciona intestinalis* L.), półstrunowca (*Saccoglossus kowalevskii* G.) i szkarłupnia (*Strongylocentrotus purpuratus* S.)

realizacja tego zamierzenia stała się realna. W pracy „Evolution of Thrombin and Other Hemostatic Proteases by Survey of Protochordate, Hemichordate, and Echinoderm Genomes, **Ponczek MB**, Bijak MZ, Nowak PZ, *Journal of Molecular Evolution* (2012) 74: 319–331” opublikowałem wyniki badań, w których wykazałem, stosując różnorodne narzędzia bioinformatyczne, że u wszystkich przebadanych wtóroustych, nie tylko u bezciaszkowców jak *B. floridae* (Putnam i współaut., 2008), ale także u półstrunowców *S. kowalevskii* i u szkarłupni (*S. purpuratus*) występują domeny białkowe wykazujące homologię z proteazami kaskady krzepnięcia i fibrynolizy. Możliwa była także ocena identyczności sekwencji aminokwasowej, za pomocą uliniowienia sekwencji, jak i zbadanie podobieństwa ułożenia sekwencji (synteni) budujących domeny w białkach oraz genów w genomach, w stosunku do wielodomenowych proteaz serynowych układu hemostazy kręgowców (Ryc. 3).



Ryc. 3. Budowa domenowa proteaz układu hemostazy kręgowców. G - domena GLA (ang. *Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxyglutamic domain*), K – domena kringlowa (ang. *Kringle domain*), P- domena PAN (ang. *Plasminogen apple nematode domain*), w przypadku czynnika XI I prekalikreiny osoczowej nazywana domeną jabłkową (ang. *apple domain*), E – domena EGF (ang. *Epidermal growth factor-like domain*), F - domena fibronektynowa (ang. *fibronectin-type domain*), T – domena proteazy serynowej (ang. *Serine protease domain*), domena katalityczna. Rycina opublikowana w pracy Ponczek MB, Bijak M. Czynniki kontaktu w fizjologicznym krzepnięciu krwi oraz w zakrzepicy. *Nowa Medycyna* (2013) 2: 72-79.

Stwierdziłem u bezciaszkowców, półstrunowców i szkarłupni obecność wszystkich domen charakterystycznych dla protez układu hemostazy, ale żadna z nich nie występowała w konfiguracji charakterystycznej dla białek kręgowców. Domeny należące do rodziny proteaz serynowych wykazywały 34-43% identyczność w stosunku do domen człowieka, przy czym największe podobieństwo można było zaobserwować dla homologów domeny protrombiny i plazminogenu. Część z nich występowała samotnie, inne z domenami

nie występującymi w białkach hemostazy kręgowców, przy czym niektóre z nich z N-końcowymi domenami kringlowymi, ale z mniejszą liczbą niż ta, która cechuje plazminogen lub trombinę. Jedna z domen proteazowych w znacznym stopniu, na poziomie sekwencji aminokwasowej, przypominała domenę trypsynową występującą w trombinie (42% identyczności z sekwencją człowieka). Podobne homologi występowały także u półstrunowca *S. kowalevskii* i jeżowca *S. purpuratus* (odpowiednio 42% i 43% identyczności). Okazało się, że kodujący takie białko fragment DNA lancetnika ma dodatkowy ekson odpowiadający za obecność N-końcowej domeny immunoglobulino-podobnej (IG-like). Sekwencje trombino-podobne nie zawierały żadnych dodatkowych domen N-końcowych charakterystycznych dla białek hemostazy kręgowców. W oparciu o znaną strukturę krystaliczną domeny proteazowej trombiny człowieka 1FPH wymodelowałem ich struktury przestrzenne (SWISS-MODEL), wraz ze strukturą hipotetycznego przodka opartą na sekwencji ustalonej za pomocą algorytmu ANCESCON. Modele przestrzenne zostały zestawione do porównania ze strukturą trombiny. Przeprowadziłem także dokowanie *in silico* ligandów trombiny (fibrinopeptydy A, hirudina i peptyd NRS) w programie Autodock Vina do wymodelowanych struktur i wykazałem podobieństwo we wiązaniu wymienionych fizjologicznych ligandów. Dodatkowo przeprowadziłem analizę syntenii zsekwencjonowanego fragmentu DNA (ACT *Sequence Comparison Viewer*), na którym znajdował się jeden z najbardziej podobnych homologów trombiny, z sekwencją chromosomu 11 człowieka, na którym zlokalizowany jest gen protrombiny, wykazując podobne współwystępowanie z sekwencją dla enzymu palmitoilotransferazy karnitynowej. Pokrewieństwo domen proteaz serynowych do proteaz serynowych białek hemostazy zostało dodatkowo potwierdzone za pomocą analizy filogenetycznej w programie MrBayes. Na wykreślonym drzewie filogenetycznym można było zaobserwować zgrupowania proteaz spokrewnionych z trombiną, plazminogenem oraz innymi proteazami układu hemostazy. Okazało się, że właśnie plazminogen oraz aktywatory plazminogenu występujące u kręgowców są najbardziej podobne do znalezionych proteaz z N-końcowymi domenami kringlowymi. Żadne z białek proteazowych, nawet w przypadku tych które wykazywały podobieństwo do protrombiny, nie posiadało na N-końcu domeny GLA, charakterystycznej dla proteaz krzepnięcia witaminy-K zależnych (protrombina, czynniki krzepnięcia VII, IX i X). Lancetnik *B. floridae* posiadał tylko dwa nieproteazowe białka z domenami GLA, *S. Kowalevskii* tylko jedno, a *S. purpuratus* ani jednego. Domeny GLA nie występowały w ogóle u pierwoustych bezkręgowców, co można było wykazać za pomocą NCBI BLAST. Okazało się, że domeny GLA były obecne u żachw w dwukrotnie większej liczbie kopii niż u lancetników. Wysoce prawdopodobne jest zatem twierdzenie, że domena GLA pojawiła się dopiero u przodka strunowców i półstrunowców, a następnie ulegała kolejnym duplikacjom, którym towarzyszyły tasowania domen, w wyniku których domeny GLA zostały powiązane z domenami proteazowymi. Potwierdziłem tym samym, że duplikacje i tasowanie domen musiały być ważnym motorem ewolucji czynników hemostazy. Zawarłem w pracy także hipotetyczny schemat, możliwych aranżacji domenowych prowadzących do powstania protrombiny, plazminogenu i innych czynników krzepnięcia zawierających domeny kringlowe

i domeny GLA. Co ciekawe, zauważyłem, że w przeciwieństwie do domen GLA domeny PAN były dość powszechne w genomach zsekwencjonowanych zwierząt nie-kręgowych, choć żadna z nich nie występowała w połączeniach z domenami proteazowymi charakterystycznymi dla kręgowców.

Z zagadnieniem dotyczącym pojawienia się pierwszych funkcjonalnych czynników krzepnięcia i fibrynolizy związane jest również pytanie na temat uformowania się elementów morfotycznych uczestniczących w krzepnięciu krwi poprzez agregację i tworzenie czopu zatrzymującego krwawienie. W pracy wskazałem także na brak występowania u lancetnika białek receptorowych charakterystycznych dla trombocytów lub płytek krwi. Naszkicowany został także hipotetyczny i nieskomplikowany model krzepnięcia przodka kręgowców, w którym uczestniczą jedynie komórki ameboidalne (prekursor trombocytów), zlepiające je białko adhezyjne odpowiadające fibrynogenowi oraz jedna proteaza uczestnicząca w aktywacji takiego prostego układu. Badania te potwierdzają model w którym układ hemostazy wykształca się dopiero u organizmów, które posiadają zamknięty układ krążenia ze znacznym ciśnieniem krwi co ma zapobiegać wyciekowi płynu z naczyń (Aird 2003). Bardziej pierwotnym mechanizmem krzepnięcia krwi wydaje się być rola ochronna przed patogenami.

2. Procesy biochemiczne proteaz serynowych układu hemostazy w stresie nitracynym i w leczeniu zakrzepic

2.1. Powiązanie struktury proteaz serynowych uczestniczących w hemostazie z ich rolą w patogenezie chorób zakrzepowo-zatorowych z towarzyszącym stresem nitracynym.

Zakrzepy prowadzące do zatorów są poważnym powikłaniem chorób układu krążenia, które z kolei niestety cały czas są znaczącą przyczyną przedwczesnych zgonów. Chorobom zakrzepowo-zatorowym towarzyszy stres oksydacyjny i nitracynny. Dlatego celem tego etapu badań było wyjaśnienie mechanizmów molekularnych odpowiadających za zaburzenia funkcji proteaz serynowych układu hemostazy w stresie nitracynnym.

Praca „Peroxynitrite and fibrinolytic system - the effects of peroxynitrite on t-PA-induced plasmin activity, Kolodziejczyk-Czepas J, **Ponczek MB**, Nowak P, *International Journal of Biological Macromolecules* (2015) 81:212-219” miała na celu wyjaśnienie mechanizmów molekularnych odpowiadających za zaburzenia układu fibrynolitycznego w stresie nitracynnym na przykładzie głównej **proteazy serynowej** układu fibrynolitycznego – plazminogenu, poddanego działaniu nadtlenoazotynu, wraz z działaniem epikatechiny na to białko. W publikacji tej zostały wskazane reszty tyrozylowe, z uwzględnieniem ich zakonserwowania ewolucyjnego, których modyfikacje potranslacyjne generowane przez nadtlenoazotyn i prowadzące do nitrowania mogą odpowiadać za zaburzenia funkcji wspomnianej kluczowej **proteazy serynowej** układu fibrynolizy, w postaci zmniejszonej skuteczności degradacji fibryny, co może przyczyniać się do utrwalania zakrzepów.

Dodatkowo przeprowadziłem dokowanie w programach Autodock Vina i Swiss-Dock nadtlenoazotynu, kwasu nadtlenoazotawego i epikatechiny do struktury krystalicznej plazminogenu 4A5T oraz oszacowałem szansę nitrowania poszczególnych reszt tyrozylowych za pomocą programu GPS-YNO2, z oceną zakonserwowania ewolucyjnego reszt tyrozylowych po uliniowaniu wielosekwencyjnym.

Badania opublikowane w pracy „The susceptibility of plasma coagulation factor XI to nitration and peroxy nitrite action. Ponczek MB. *International Journal of Biological Macromolecules* (2016) 91: 589-597” miały na celu poznanie podatności czynnika XI na nadtlenoazotyn *in vitro* oraz *in silico*. Stosując test chromogeny do badania aktywności enzymatycznej czynnika XI wykazałem, że nadtlenoazotyn w zakresie stężeń 0,1 – 1 mM może być czynnikiem powodującym wzmożoną aktywację krzepnięcia krwi z udziałem czynników kontaktu. W osoczu ludzkim, które zostało poddane działaniu nadtlenoazotynu, zaobserwowałem zwiększoną aktywność czynnika XI generowanego z zymogenu przez czynnik XIIa powstający po aktywacji kaolinem. Wykazałem także zwiększenie nitrowania czynnika XI pod wpływem nadtlenoazotynu, przy czym stwierdziłem, że badane białko było już w pewnym stopniu znitrowane w warunkach natywnych. Zastosowane metody immunoprecypitacji i western blotting po rozdziale elektroforetycznym z SDS wykazały zatem podatność czynnika XI na nitrowanie *in vitro* oraz *in vivo*. Aby zarysować mechanizmy molekularne opisanych wyników przeprowadziłem dodatkowo analizy bioinformatyczne w postaci dokowania nadtlenoazotynu w programach Autodock Vina i Swiss-Dock (Ryc. 2), obliczania prawdopodobieństwa nitrowania poszczególnych reszt tyrozylowych w programie GPS-YNO2 oraz uliniowań wielosekwencyjnych, wskazując na potencjalne reszty tyrozylowe, których nitrowanie może prowadzić do zaburzeń funkcji czynnika XI, w ten sposób przyczyniając się do zakrzepic.

2.2. Perspektywy leczenia zakrzepic z wykorzystaniem metod bioinformatycznych i chemii obliczeniowej.

Profilaktyka przeciwzakrzepowa w przyszłości obejmować będzie także terapie nacelowane na hamowanie nie tylko proteaz zewnątrzpochodnych, ale także aktywności czynnika XI o czym wspominałem w pracy „Czynniki kontaktu w fizjologicznym krzepnięciu krwi oraz w zakrzepicy, **Ponczek MB**, *Nowa Medycyna* (2013) 2: 72-79”. Oczywistym faktem jest, że metody bioinformatyki i chemii obliczeniowej ułatwiają opracowywanie nowych leków.

Poza bezpośrednim hamowaniem proteaz serynowych układu krzepnięcia krwi innym pośrednim, dobrze znanym od dawna sposobem profilaktyki przeciwzakrzepowej jest stosowanie leków zaburzających modyfikacje wcześniej już wspomnianych N-końcowych domen GLA (Ryc. 3), charakterystycznych, jak już uprzednio wykazałem dla układu zwierząt wtóroustych. Od obecności prawidłowych domen GLA zależy zdolność wiązania się wielu proteaz krzepnięcia krwi z trombocytami i płytkami krwi poprzez kompleksowanie Ca^{2+} . Domeny te zawierają reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego, które są efektem potranslacyjnych modyfikacji reszt glutaminianu zachodzących w trakcie syntezy białek

w wątrobie. Przemiana ta jest niezbędna do wiązania jonów wapnia i właściwego współdziałania w kaskadzie krzepnięcia z płytkami krwi lub trombocytami. Reakcja γ -karboksylacji białek katalizowana przez enzym γ -karboksylazę wymaga kofaktora w postaci witaminy K. Hydrochinonowa postać witaminy K wytwarzana z formy chinonowej, dostępnej w pokarmie, przez reduktazę chinonową przy udziale NADPH, przekształca się w wyniku reakcji karboksylacji w 2,3-epoksyd. Aby mogła być zachowana ciągłość działania karboksylazy, epoksydowa forma witaminy K jest redukowana do formy chinonowej przez reduktazę 2,3-epoksydową, co umożliwia regenerację witaminy K w cyklu witaminy K. Reduktaza 2,3-epoksydowa podatna jest na hamujący wpływ pochodnych kumaryny takich jak acenokumarol i warfaryna. Związki te zostały zarejestrowane jako doustne leki przeciwzakrzepowe dość dawno. Wykazują dużą zdolność do wiązania się z białkami krwi, przede wszystkim z albuminą (od 97% do 99%), co znacząco zmniejsza ich biodostępność. W celu określenia oddziaływania nowych syntetycznych pochodnych kumaryny z albuminą i reduktazą 2,3-epoksydową przebadalem w pracy „Design, synthesis, X-ray structures of the new coumarin derivatives and perspectives of binding them to albumin and vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, Kasperkiewicz K, Malecka M, **Ponczek** MB, Nowak P, Budzisz E, *Crystal Growth & Design* (2016) 16: 456-466” za pomocą dokowań *in silico* w programie Autodock Vina wiązanie z albuminą zsyntetyzowanych nowych pochodnych kumaryny, których struktura została określona krystalograficznie. Wymodelowałem także podjednostkę 1 kompleksu reduktazy 2,3 epoksydowej, odpowiadającą za aktywność katalityczną enzymu i także do niej przeprowadziłem dokowania pochodnych kumaryny. Część ze związków wykazywała obiecujące właściwości w postaci silnego wiązania z podjednostką katalityczną w miejscu wiązania warfaryny.

Opisane powyżej badania nie byłyby możliwe bez wsparcia finansowego EMBO ASTF 83.00-2008 oraz wnioskowanych dotacji Uniwersytetu Łódzkiego w ramach funduszy statutowych dla Katedry Biochemii Ogólnej 506/810 i 506/1136.

Podsumowanie głównego osiągnięcia naukowego i omówienie ewentualnego wykorzystania

W oparciu o zaprezentowane powyżej omówienie prac naukowych składających się na cykl publikacji przedstawiony do oceny, za moje główne osiągnięcia uważam wdrożenie w Polsce metod bioinformatycznych do poznawania ewolucji i biochemii białek hemostazy oraz uzyskanie wyników istotnych w skali światowej poszerzających wiedzę na temat proteaz serynowych krzepnięcia i fibrylizy. Perspektywy ewentualnego wykorzystania obejmują użycie metod i wyników do prowadzenia badań pod kątem opracowywania nowych terapii przeciwzakrzepowych, szczególnie tych nakierowanych na dimeryczny czynnik XI (Ryc. 2). Zwrócić tu należy szczególną uwagę na to, że czynnik XI jako cel przeciwzakrzepowych terapii

dopiero w ostatnich latach zaczął się cieszyć większym zainteresowaniem grup badawczych na świecie i wdrażane są obecnie potencjalne metody lecznicze obejmujące zastosowanie między innymi przeciwciał skierowanych na blokowanie tego czynnika oraz wyciszania mRNA dla czynnika XI poprzez oligonukleotydy antysensowne, gdzie w przypadku ostatniej strategii zakończono niedawno II fazę badań klinicznych (Cosmi 2016, Büller i współaut. 2015, Muller i współaut. 2011, Younis i współaut. 2012,).

Dalsze moje plany badawcze obejmują kontynuację rozpoczętych niedawno badań z zastosowaniem metod dynamiki molekularnej do przewidywania właściwości czynnika XI, a które nie zostały włączone do głównego osiągnięcia naukowego ze względu na początkowy etap badań. Wyniki tych badań zostały upublicznione w postaci komunikatów konferencyjnych zamieszczonych w ramach omówienia pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Literatura

Aird W. C., 2003. Hemostasis and irreducible complexity. *J. Thromb. Haemost.* 1, 227–230

Brenner B, Hoffman R., 2011. Emerging options in the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Blood Rev.* 25, 215–221

Büller H.R., Bethune C., Bhanot S. i współaut. 2015. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 372, 232–240

Davidson C. J., Hirt R. P., Lal K. i współaut., 2003a. Molecular evolution of the vertebrate blood coagulation network. *Thromb. Haemost.* 89, 420–428

Davidson C. J., Tuddenham E. G., Mcvey J. H. 2003b. 450 million years of hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1487–1494

Dehal P., Satou Y., Campbell R. K. i współaut. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157–2167

Di Cera E. 2009. Serine proteases. *IUBMB Life* 61, 115–510

Doolittle R. F., 1993. The evolution of vertebrate blood coagulation: a case of Yin and Yang. *Thromb. Haemost.* 70, 24–28

Doolittle R. F., 2009. Step-by-Step Evolution of Vertebrate Blood Coagulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 35–40

Doolittle R. F., Jiang Y., Nand J., 2008. Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates. *J. Mol. Evol.* 66, 185–196

- Colman R. W., 2006. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J. Exp. Med.* 203, 493–495
- Cosmi B., 2016. An update on the pharmaceutical management of thrombosis. 2016. *Expert Opin. Pharmacother.* 12, 1–16
- Gailani D., 2014. Future prospects for contact factors as therapeutic targets. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2014, 52–59
- Gailani D., Bane C.E., Gruber A., 2015. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J. Thromb. Haemost.* 13, 1383–1395.
- Gailani D., Gruber A., 2016. Factor XI as a Therapeutic Target. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1316–1322.
- Gailani D., Renne T., 2007. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2507–2513
- Gailani D., Smith S. B., 2009. Structural and functional features of factor XI. *J. Thromb Haemost.* 7, 75–78
- Geng Y., Verhamme I. M., Smith S. B. i współaut., 2013. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation. *Blood* 121, 3962–3969
- Jiang Y., Doolittle R. F., 2003. The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 7527–7532
- Karuturi R., Al-Horani R. A., Mehta S. C. i współaut., 2013. Discovery of allosteric modulators of factor XIa by targeting hydrophobic domains adjacent to its heparin-binding site. *J. Med. Chem.* 56, 2415–2428
- Loof T. G., Schmidt O., Herwald H., i współaut., 2011. Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? *J. Innate. Immun.* 3, 34–40
- Łopaciuk S., Biederman A., 2001. *Zakrzepy i zatory*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa
- McClay D. R., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: sea urchins. *Development* 138, 2639–2648
- Muller F., Gailani D., Renne T., 2011. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 349–355
- Nonaka M., Yoshizaki F., 2004. Evolution of the complement system. *Mol. Immunol.* 40, 897–902

Papagrigoriou E., McEwan P. A., Walsh P. N. i współaut., 2006. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 557–558

Putnam N. H., Butts T., Ferrier D. E. i współaut., 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064–1071

Riddel J. P. J., Aouizerat B. E., Miaskowski C. i współaut., 2007. Theories of blood coagulation. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* 24, 123–131

Schenone M, Furie B. C., Furie B., 2004. The blood coagulation cascade. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 272–277

Warren W. C., Hillier L. W., Marshall Graves J. A. i współaut., 2008, Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453, 175–83

Younis H. S., Crosby J., Huh J. I. i współaut., 2012. Antisense inhibition of coagulation factor XI prolongs APTT without increased bleeding risk in cynomolgus monkeys. *Blood* 119, 2401–2408

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze dotyczyły tematyki związanej z rolą stresu oksydacyjnego oraz przeciwutleniaczy pochodzenia roślinnego o potencjalnych właściwościach antykoagulacyjnych w procesie hemostazy, w tym wpływu na wybrane czynniki krzepnięcia krwi, z uwzględnieniem różnych stanów chorobowych z towarzyszącymi procesami zapalnymi. Badania były realizowane w ramach funduszy statutowych UŁ uzyskanych przez Katedrę Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska od Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Część pozostałych badań dotyczyła także zagadnień związanych z rolą stresu oksydacyjnego u kobiet w wieku menopauzalnym (we współpracy z z Kliniką Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz Kliniką Leczenia Niepłodności GAMETA), w stwardnieniu rozsianym (we współpracy z Oddziałem Rehabilitacji Neurologicznej Szpitala dr. K. Jonschera w Łodzi oraz badaniami syntetycznych pochodnych kumarynowych i pochodnych spiroflawonowych o szerokim spektrum działania biologicznego (we współpracy z Zakładem Chemii Surowców Kosmetycznych, Katedra Kosmetologii, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Katedrą Chemii Teoretycznej i Strukturalnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego). Nawiązana została również współpraca z Katedrą Biochemii i Biotechnologii Zwierząt na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy dotycząca problemów związanych z krzepnięciem krwi u kurcząt.

Kontynuowałem także zagadnienia prowadzone w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej, które były związane z badaniami wpływu stresu oksydacyjnego i nitracynego na fibrynogen w aspekcie ewolucyjnym i roli przeciwutleniaczy oraz związków przeciwzakrzepowych na białka hemostazy. Szczególnie różnorodne związki polifenolowe pochodzenia roślinnego wydają się być dobrymi kandydatami do zastosowania w profilaktyce chorób zakrzepowo-zatorowych.

Zaledwie kilka lat temu wprowadzono do leczenia nowe doustne leki przeciwzakrzepowe będące bezpośrednimi inhibitorami proteaz kaskady krzepnięcia krwi - trombiny (dabigatran) oraz czynnika X (rivaroxaban) – kluczowego elementu zewnątrzpochoźnego szlaku krzepnięcia. Mimo skuteczności przeciwzatorowej tego typu leków nie są one pozbawione wad, podobnie jak leki starszej generacji, przede wszystkim poprzez występowanie ryzyka ciężkich powikłań krwotocznych. Wymienione przykładowe leki są związkami syntetycznymi zaprojektowanymi i wytworzonymi tak by docelowo hamować konkretne proteazy serynowe krzepnięcia krwi. Z kolei organizmy roślinne są naturalnymi ewoluującymi fabrykami i magazynami licznych związków organicznych, których wielu właściwości nadaj jeszcze nie poznano. Niektóre z nich wykazują zdolność hamowania krzepnięcia krwi, będąc przy tym równocześnie przeciwutleniaczami. W pracy „Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X, Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P, *International Journal of Biological Macromolecules* (2014) 65: 129-135” zbadany został hamujący efekt flawonoidów roślinnych (procyjanidyny B2, cyjanidyny, kwercetyny i sylibiny), o dobrze znanych właściwościach antyoksydacyjnych, na aktywność enzymatyczną czynnika X. Przeprowadzone przeze mnie dokowanie *in silico* flawonoidów do struktury aktywnej formy czynnika X (PDB: 2J4I) wskazało miejsce i powinowactwo wiązania oraz wyjaśniło potencjalny mechanizm inhibicji. Dodatkowo porównując strukturę aktywnego czynnika X wołu (1KIG) jak i jego modelu homologicznego opartego na strukturze człowieka (2J4I) wykazałem dobre zakonserwowanie ewolucyjne struktury przestrzennej, co umożliwiło właściwą interpretację wyników eksperymentalnych z zastosowaniem wołowego aktywnego czynnika X w badaniach aktywności amidolitycznej po zadziałaniu odpowiednimi stężeniami flawonoidów oraz ich zestawienie z wynikami obliczeniowymi dokowania.

W ramach tematyki łączącej hemostazę, stres oksydacyjny i roślinne związki o właściwościach antyoksydacyjno-antykoagulacyjnych realizowany był także wcześniej projekt **WROVASC** (projekt współfinansowany przez UE w ramach EFRR w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, realizowany w latach 2007-2013. Priorytet 1. Badania i rozwój nowoczesnych technologii. Działanie 1.1. Wsparcie badań naukowych dla gospodarki opartej na wiedzy. Poddziałanie 1.1.2. Strategiczne programy badań, w którym w latach 2010-2013 byłem jednym z podwykonawców zadania 17 „Antykoagulanty pochodzenia roślinnego w celu stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakrzepic”. Celem tego zadania było określenie zależności pomiędzy właściwościami chemicznymi i biologicznymi

koniugatów polifenolowo-polisacharydowych substancji roślinnych, w obszarze aktywności antyoksydacyjnych, antykoagulacyjnych i przeciwpyłtkowych.

Ostatnio brałem również udział w badaniu związków biologicznie czynnych z roślin *Pulmonaria L (miodunka)*, jako wykonawca grantu NCN UMO-2013/11/D/NZ9/02771, *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (żyworódka pierzasta) we współpracy z Zakładem Biochemii i Jakości Plonów Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Opisane badania były finansowane z dotacji Uniwersytetu Łódzkiego w ramach finansowania statutowego Katedry Biochemii Ogólnej (810/373, 545/267, 545/485, 545/762, 506/810, 506/1136).

Moje obecne zainteresowania, badania i plany naukowe na przyszłość skupiają się głównie na tematyce związanej z badaniami dynamiki molekularnej XI czynnika krzepnięcia krwi. W ramach grantu właściwego PL-Grid (<http://www.plgrid.pl/>) przeprowadziłem do tej pory osiem 200 ns symulacji dimerów czwartej domeny jabłkowej czynnika XI (Ryc. 2, A4), dla człowieka (wersja stabilizowana i nie stabilizowana międzylańcuchowym mostkiem disiarczkowym pomiędzy Cys 321) i ortologów królika, oposa (2 wersje podobnie jak u człowieka), dziobaka i kolczatki oraz paraloga prekalikreiny osoczowej człowieka, wskazujące na różnice międzygatunkowe w stabilności dimerów niepołączonych międzylańcuchowymi mostkiem disiarczkowym. Paradoksalnie najbardziej stabilny okazuje się dimer królika, naturalnie pozbawiony mostka siarczkowego na skutek odziedziczonej po przodkach mutacji Cys 321 do His 321. Mimo naturalnego braku mostka dimer królika wydaje się być bardziej stabilny niż niestabilizowane dimery człowieka, prawdopodobnie poprzez ewolucyjne wzmocnienie oddziaływań niekowalencyjnych w obrębie powierzchni styku dimeryzacji. Uzyskane wyniki zostały opisane w manuskrypcie przygotowanym do publikacji w czasopiśmie z listy JCR. Kolejne zainteresowania naukowe dotyczą sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS), zapoczątkowane po odbyciu stażu w USA na UCSD, na którym zajmowałem się między innymi analizą wyników sekwencjonowania całogenomowego (ang. *Whole Genome Sequencing*, WGS).

W celu rozwoju umiejętności w zakresie analizy wyników NGS zapisałem się na szkolenia: „Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS” 4 marca oraz „NGS w badaniach regulacji genów” 5-6 marca 2017 roku organizowane przez ideas4biology Sp. z o.o.

W ramach opisanych powyżej zagadnień badawczych zostały opublikowane następujące artykuły naukowe:

prace oryginalne:

1. Budzisz E, Paneth P, Geromino I, Muzioł T, Rozalski M, Krajewska U, Pipiak M, **Ponczek MB**, Małecka M, Kupcewicz B. The cytotoxic effect of spiroflavanone derivatives, their binding ability to human serum albumin (HSA) and a DFT study on the mechanism of their synthesis. *Journal of Molecular Structure*. Przyjęta do publikacji 9 lutego 2017. DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.02.037 (IF=1.780, pkt. MNiSW=20)
2. Kolodziejczyk-Czepas J, Sieradzka M, Moniuszko-Szajwaj B, Pecio Ł, **Ponczek MP**, Nowak P, Anna Stochmal A. Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors – *in vitro* and *in silico* study. *International Journal of Biological Macromolecules*. Praca przyjęta do publikacji 3 lutego 2017 roku (IF=3.138, pkt. MNiSW=35)
3. Buzala M, **Ponczek MB**, Słomka A, Roslewska A, Janicki B, Zekanowska E, Bednarczyk M. A Pilot Study of Tissue Factor-Tissue Factor Pathway Inhibitor Axis and Other Selected Coagulation Parameters in Broiler Chickens Administered *in Ovo* with Selected Prebiotics. *Folia Biologica (Kraków)* (2016) 64: 213-224 (IF=0.562, pkt. MNiSW=15)
4. Kolodziejczyk-Czepas, Bijak M, Saluk J, **Ponczek MB**, Zbikowska HM, Nowak P, Tsirigotis-Maniecka M, Pawlaczyk I. Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules* (2015) 72: 1152-1158 (IF=3.138, pkt. MNiSW=35)
5. Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *International Journal of Biological Macromolecules* (2014) 65: 129-135 (IF=2.858, pkt. MNiSW=35)
6. **Ponczek MB**, Bijak M, Saluk J, Kolodziejczyk-Czepas J, Nowak P. The comparison of peroxy-nitrite action on bovine, porcine and human fibrinogens. *Central European Journal of Biology* (2014) 9: 233-241 (IF= 0.710, pkt. MNiSW=15)
7. Bijak M, Ziewiecki R, Saluk J, **Ponczek M**, Pawlaczyk I, Krotkiewski H, Wachowicz B, Nowak P. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Medicinal Chemistry Research* (2014) 23: 2324–2337 (IF=1.402, pkt. MNiSW=20)
8. Saluk J, Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P, Wachowicz B. (1→3)-β-D-Glucan reduces the damages caused by reactive oxygen species induced in human platelets by lipopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* (2013) 97: 716-724 (IF=3.916, pkt.

MNiSW=40)

9. Bijak M, Saluk J, **Ponczek MB**, Nowak P. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Phytotherapy Research* (2013) 27: 71-76 (IF=2.397, pkt. MNiSW=25)
10. Bijak M, Saluk J, Antosik A, **Ponczek MB**, Żbikowska HM, Borowiecka M, Nowak P. Aronia melanocarpa as a protector against nitration of fibrinogen. *International Journal of Biological Macromolecules* (2013) 55: 264-268 (IF=3.096, pkt. MNiSW=35)
11. Bijak M, Kolodziejczyk-Czepas J, **Ponczek MB**, Saluk J, Nowak P. Protective effects of grape seed extract against oxidative and nitrative damage of plasma proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* (2012) 51: 183-187 268 (IF=2.596, pkt. MNiSW=35)
12. Bijak M, Nowak P, Borowiecka M, **Ponczek MB**, Zbikowska HM, Wachowicz B. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. *Thrombosis Research* (2012) 130: e123-e128 (IF= 3.133, pkt. MNiSW=25)
13. Miller E, Walczak A, Saluk J, **Ponczek MB**, Majsterek I. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry* (2012) 45: 26-30 (IF= 2.450, MNiSW=30)
14. Polac I, Borowiecka M, Wilamowska A, Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P. Changes in hemostatic parameters after oral and transdermal hormone therapy in postmenopausal women. *Gynecological Endocrinology* (2011) 27: 692-695 (IF= 1.581, pkt. MNiSW=15)
15. Saluk-Juszczak J, Pawlaczyk I, Olas B, Kołodziejczyk J, **Ponczek M**, Nowak P, Tsirigotis-Wołoszczak M, Wachowicz B, Gancarz R. The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxy-nitrite-induced changes in blood platelet proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* (2010) 47: 700-705 (IF= 2.502, pkt. MNiSW=35)
16. Borowiecka M, Polac I, Nowak P, Radwan P, **Ponczek MB**, Wachowicz B. Changes in hemostatic parameters after oral hormone therapy in postmenopausal women. *Journal of Womens Health* (2010) 19: 2267-2270 (IF= 1.454, pkt. MNiSW=35)

17. **Ponczek MB**, Nowak P, Wachowicz B. The effects of nitronium ion on nitration, carbonylation and coagulation of human fibrinogen. *General Physiology and Biophysics* (2008) 27: 55-58 (IF=0.697, pkt. MNiSW=15)

list do edytora:

18. **Ponczek MB**. Comments on "Sensitive immunoassays of nitrated fibrinogen in human biofluids" by Tang et al. *Talanta* (2011) 83: 1062-1063 (IF=3.794, pkt. MNiSW=40)

prace przeglądowe:

19. Buzala, M., Słomka, A., Janicki, B., Ponczek, M. B., Żekanowska, E. (2016). Review: The mechanism of blood coagulation, its disorders and measurement in poultry. *Livestock Science*. (2017) 195: 1-8 (IF=1.293, MNiSW points=30)
20. Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P. Proteazy serynowe i ich klasyfikacja według systemu MEROPS. [Serine proteases and their classification according to MEROPS system]. *Kosmos* (2015) 1: 31-45 (pkt. MNiSW=12)
21. Saluk J, Bijak M, **Ponczek MB**, Wachowicz B. Powstawanie, metabolizm i ewolucja płytek krwi. [ang. *The formation, metabolism and the evolution of blood platelets*]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (2014) 68: 384-391 (IF= 0.573, pkt. MNiSW=15).
22. Bijak M, Saluk J, **Ponczek MB**, Nowak P, Wachowicz B. Synteza białek w bezjądrzastych płytkach krwi. [The synthesis of proteins in unnuclated blood platelets]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (2013) 67: 672-679 (IF= 0.633, pkt. MNiSW=15)
23. Kołodziejczyk J, **Ponczek MB**. The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Contemporary Oncology* (2013) 17: 113–119 (IF= 0.215, pkt. MNiSW=14)
24. Bijak M, **Ponczek MB**, Nowak P. Komórkowa odpowiedź na działanie trombiny. [ang. *Cellular response to thrombin action*]. *Kosmos* (2012) 61: 445-454 (pkt. MNiSW=12).
25. Bijak M, **Ponczek MB**, Saluk J, Chabielska M, Stępiak J, Nowak P. Nadtlenoaztyn - silny biologiczny utleniacz. [ang. *Peroxynitrite a strong biological oxidant*]. *Wiadomości Chemiczne* (2012) 66: 7-8 (pkt. MNiSW=7)

26. **Ponczek MB.** Rola domen spokrewnionych z fibrynogenem w różnicowaniu i migracji komórek nowotworowych. [ang. *The role of fibrinogen-like domains in differentiation and migration of neoplastic cells*] Postępy Biologii Komórki (2010) 37: 539-552 (IF= 0.077, pkt. MNiSW=5)

Przedstawione zostały następujące konferencyjne prezentacje ustne i plakaty:

Powiązane tematycznie z tytułem osiągnięcia naukowego:

Ponczek MB, Gailani D, Doolittle RF. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation, 2nd Annual Proteomics Europe Conference and Exhibition, Lisbon, Portugal 2008, 16 - 17 October. 120 PE

Prezentacja wyników opublikowanych w pracy „ Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation “ w postaci plakatu.

Ponczek M. The first signs of blood coagulation pathway evolution by bioinformatic studies of Branchiostoma genome. 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic 4-9 July 2009, P1-79, FEBS Journal (2009) 276 S1: 119

Prezentacja wstępnych wyników opublikowanych w pracy “Evolution of Thrombin and Other Hemostatic Proteases by Survey of Protochordate, Hemichordate, and Echinoderm Genomes” w postaci plakatu.

Ponczek MB, Gailani D, Doolittle RF. Evolution of intrinsic blood coagulation pathway and plasma kinin-kallikrein system in sense of thrombosis. XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego [XLIV Annual meeting of the Polish Biochemical Society], Łódź, 16-19 September, 2009, O.B.2, Acta Biochimica Polonica 56 (2009) Supp. 3: 14

Prezentacja wyników opublikowanych w pracy „ Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation “ w postaci prezentacji ustnej w języku angielskim.

Ponczek MB, Bijak MZ, Nowak PZ. Evolution of thrombin by survey of non-vertebrate deuterostomes. Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting. Poznań, Poland, 11-14 September 2012, P2.59 Acta Biochimica Polonica 59 (2012) Supp. 3: 58

Prezentacja wyników opublikowanych w pracy “Evolution of Thrombin and Other Hemostatic Proteases by Survey of Protochordate, Hemichordate, and Echinoderm Genomes” w postaci plakatu.

Małecka M, Kasperkiewicz K, Budzisz E, **Ponczek M.** Badania strukturalne pochodnych kumaryny. [Structural studies of coumarin derivatives]. 57 Konwersatorium krystalograficzne [57th Crystallographic seminar], Wrocław, Poland, 26-26 June 2015. B-30

Prezentacja wstępnych wyników opublikowanych w pracy “ Design, synthesis, X-ray

structures of the new coumarin derivatives and perspectives of binding them to albumin and vitamin K epoxide reductase complex subunit 1" *w postaci plakatu.*

Pozostałe:

Kasperkiewicz K, **Ponczek MB**, Budzisz E, Spectrofluorimetric analysis of the new coumarin derivatives. XIX International Symposium „Advances in the chemistry of heteroorganic compounds”. Lodz, Poland, 2016, 25 listopad. P-048

Ponczek MB. 200 ns molecular dynamics of blood coagulation factor XI apple domain dimers. 6th Visegrad Symposium on Structural Systems Biology. Warsaw, Poland, 19 - 21 czerwiec, 2016. P29.

Kołodziejczyk-Czepas J, **Ponczek MB**, Nowak P, Krzyżanowska-Kowalczyk J, Kowalczyk M, Stochmal, Efektywność przeciwutleniająca działania ekstraktów z wybranych gatunków Pulmonaria L. (miodunka) w ochronie białkowych składników krwi. VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL. Lublin, Polska, 2016, 12-13 marzec

Ponczek MB. Molecular dynamics of mammalian blood coagulation factor XI. 8th Symposium of the Polish Bioinformatics Society & 7th Seminar of Medicinal Chemistry, Lublin, Poland, 17-19 September 2015. P14

Kasperkiewicz K, Kupcewicz B, **Ponczek M**, Budzisz E. Influence of the new coumarin derivatives on lipophilicity, fluorescent properties and docking to albumin. Międzynarodowe Sympozjum "Recent Advances in Nucleic Acid Therapeutics", Łódź, październik 2015

Ponczek MB. Prediction of coagulation factor XI dimeric structure in mammals. I BIO 2014 Congress. Warszawa, Polska, 9-12 September 2014, P4.34 Acta Biochim Pol 61 (2014) Supp 1: 95

Bijak M, Antosik A, **Ponczek MB**, Żbikowska HM, Nowak P. Flavonoids as a direct coagulation factor Xa inhibitors. 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 2-5 September 2013 r. P3.2 Acta Biochim Pol 60 (2013) Supp 1: 39

Bijak M, Antosik A, **Ponczek M**, Ziewiecki R, Saluk J, Żbikowska H, Nowak P. Polyphenol compounds modulate human thrombin activity. Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting. Poznań, Polska, 11-14 September 2012, P2.7 Acta Biochim Pol (2012) Supp 3: 32

Borowiecka MK, Połać I, **Ponczek MB**, Wachowicz B. The effects of applying the hormone replacement therapy at woman in the period of the menopause on plasma fibrin polymerization and lysis. XLIV Annual meeting of the Polish Biochemical Society, Łódź, 16 - 19 September, 2009, P.B.1, Acta Biochim Pol 56 (2009) Supp 3: 15

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora badania naukowe dotyczyły wpływu reaktywnych form tlenu i azotu na białka hemostazy osocza krwi. W ramach tych badań byłem współautorem następujących publikacji:

oryginalnych:

1. Nowak P, Zbikowska HM, **Ponczek M**, Kolodziejczyk J, Wachowicz B. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences. *Thrombosis Research* (2007) 121: 163-174 (IF=2.038, IF5=2.145, pkt. MNiSW=25)
2. Olas B, Nowak P, **Ponczek M**, Wachowicz B. Resveratrol, a natural phenolic compound may reduce carbonylation proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. *General Physiology and Biophysics* (2006) 25: 215-222 (IF=0.771, IF5=0.926, pkt. MNiSW=15)
3. Olas B, Nowak P, Kolodziejczyk J, **Ponczek M**, Wachowicz B. Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *Journal of Nutritional Biochemistry* (2006) 17: 96-102 (IF=2.945, IF5=4.967, pkt. MNiSW=40)

przeglądowych:

4. **Ponczek M**, Wachowicz B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. [ang. *Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins*]. *Postępy Biochemii* (2005) 51: 140-145 (MNiSW=5)

prezentacji ustnych i plakatów konferencyjnych (* - prezentowałem prace ustnie) :

1. **Ponczek M***, Nowak P, Wachowicz B. Peroxynitrite-mediated modifications of fibrinogen; the effect on platelet aggregation and adhesion. IC Konferencja Biologii Komórki, Łódź, Poland 2005, 15-17 September, *Folia Histochem et Cytobiol* (2005) 43: 79
2. Olas B, Nowak P, **Ponczek M**, Wachowicz B. The effect of resveratrol on peroxynitrite-induced oxidation of proteins in blood platelets, 5th Parnas conference, Ukraine 2005, Ukr. *Biochim J* (2005) 77: 215
3. **Ponczek M***, Nowak P, Wachowicz B. Wpływ nadtlenoazotynu na strukturę i funkcję fibrynogenu. VII Konferencja Naukowo Szkoleniowa Inter-Hemostaza, Łódź, Polska 2004, 11

4. Nowak P, **Ponczek M**, Zbikowska M, Wachowicz B. Peroxynitrite enhanced fibrinogen susceptibility to plasmin degradation. 4th International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, University of Konstanz, Konstanz, Germany 2004, July 27 - 31
5. **Ponczek M***, Nowak P, Wachowicz B. Wpływ nadtlenoazotynu na właściwości koagulacyjne fibrynowego. VI Warsztaty Naukowe Inter-Hemostaza, Łódź, Polska 2003, 18
6. Nowak P, Majeed F, **Ponczek M**, Wachowicz B. Wpływ nitracji tyrozyny na właściwości polimeryzacyjne fibrynowego. XX Zjazd PT Hematologów i Transfuzjologów, Gdańsk, Polska 2003, 34, 340

Informacje dotyczące mojego wkładu w wyżej wymienionych publikacjach zawarte są w załączniku 3 (wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych).

Całkowity dorobek naukowy obejmuje 38 prac naukowych i 20 komunikatów konferencyjnych, przy czym 34 prace naukowe i 14 komunikatów konferencyjnych po doktoracie, z czego 31 prac naukowych zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, w tym 28 po doktoracie. Całkowity „Impact Factor” 68.866, w tym po doktoracie 63.112 i odpowiednio 886 i 801 punktów MNiSW, liczba recenzji artykułów naukowych 3. Statystyki bibliometryczne wg bazy Web of Science (Core Collection) na 16 lutego 2017 roku: liczba cytowań bez autocytowań 285, z autocytowaniami 322, H-Indeks 9.

Łódź, 16 lutego
2017 roku
Michał Ponczek