

AUTOREFERAT

Dr Danuta Jantas

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii PAN
ul. Smętna 12
31-343 Kraków
e-mail: jantas@if-pan.krakow.pl

Kraków 2018

SPIS TREŚCI

1. Dane osobowe.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Osiągnięcie wynikające 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):.....	3
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
4.2 Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa.....	4
4.3 Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
4.3.1 Wprowadzenie.....	5
4.3.2 Rola mGluR grupy II i III w neuroprotekcji.....	8
4.3.2.1 Stan wiedzy.....	8
4.3.2.2 Cele badawcze.....	11
4.3.2.3 Podsumowanie wyników.....	11
4.3.2.4 Znaczenie otrzymanych wyników.....	19
4.3.3 Rola mGluR8 w komórkach nowotworowych.....	21
4.3.3.1 Stan wiedzy.....	21
4.3.3.2 Cele badawcze.....	22
4.3.3.3 Podsumowanie wyników.....	23
4.3.3.4 Znaczenie otrzymanych wyników.....	24
4.3.4 Wnioski końcowe.....	24
4.3.5 Piśmiennictwo.....	25
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	28
5.1 Osiągnięcia naukowo badawcze przed uzyskaniem doktora nauk medycznych.....	28
5.2 Osiągnięcia naukowo badawcze po uzyskaniu doktora nauk medycznych.....	30
5.3 Inne osiągnięcia.....	35
5.4 Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego.....	36

1. Imię i nazwisko:

Danuta Jantas

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- **15.05.2008** – doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej; praca wykonana w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii PAN; tytuł pracy „*Wpływ memantyny na procesy apoptotyczne komórek nerwowych in vitro*”; promotor pracy: Prof. dr hab. Władysław Lason; recenzenci pracy: Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek, Prof. dr hab. Jerzy Z. Nowak
- **06/2003** – First Certificate in English, University of Cambridge, ESOL Examinations
- **2000-2002** – Studia Podyplomowe w zakresie Informatyki „Informatyka dla Nauczycieli”, Uniwersytet Jagielloński
- **10.06.1999** – magister biologii, dyplom z wyróżnieniem; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego; praca magisterska zatytułowana „*Różnice w koncentracji hormonów steroidowych w jajnikach nornicy rudej w zależności od fotoperiodu*” wykonana w Pracowni Endokrynologii i Hodowli Tkanek w Zakładzie Fizjologii Zwierząt po opieką naukową dr Jerzego Galasa
- **1997-1998** - Studium Zarządzania i Biznesu, Uniwersytet Jagielloński
- **1996-1999** - Studium Pedagogiczne, Uniwersytet Jagielloński

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **03/2010 - do chwili obecnej** – adiunkt w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii PAN
- **02/2008-02/2010** – asystent w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii PAN
- **10/2003-09/2007** – uczestnik studiów doktoranckich Instytutu Farmakologii PAN

4. Osiągnięcie wynikające 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Udział metabotropowych receptorów glutaminianergicznyc *grupy II i III w regulacji procesów śmierci komórkowej – badania w modelach in vitro.*

Osiągnięciem naukowym poddanym ocenie jest cykl sześciu oryginalnych prac naukowych (opublikowanych w latach 2014-2018; o łącznym IF równym 26,902; wg MNiSW: 205 punktów) poświęcony badaniu potencjału ochronnego oraz mechanizmów neuroprotekcji ligandów mGluR grupy II i III oraz roli mGluR8 w komórkach nowotworowych. Prace te są wynikiem realizacji dwóch projektów badawczych (Grant KBN Nr NN405611638 i grant NCN Nr 2012/05/B/NZ3/00452), w których pełniłam rolę Kierownika.

4.2 Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

H1. Jantas D*[#], Greda A[#], Gołda S, Korostynski M, Grygier B, Roman A, Pilc A, Lason W. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP(+)-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: the impact of cell differentiation state. *Neuropharmacology* 2014, 83:36-53. Elsevier. (IF=5.106; punkty MNiSW=40 pkt, liczba cytacji bez autocytoowań: 20).

H2. Jantas D*, Greda A, Leskiewicz M, Grygier B, Pilc A, Lason W. Neuroprotective effects of mGluR II and III activators against staurosporine- and doxorubicin-induced cellular injury in SH-SY5Y cells: New evidence for a mechanism involving inhibition of AIF translocation. *Neurochemistry International* 2015, 88:124-137. Elsevier. (IF=3.385; KBN/MNiSW=25 pkt, liczba cytacji bez autocytoowań: 1).

H3. Jantas D*, Gręda A, Gołda S, Korostynski M, Lason W. The neuroprotective effects of orthosteric agonists of group II and III mGluRs in primary neuronal cell cultures are dependent on developmental stage. *Neuropharmacology* 2016, 111:195-211. Elsevier. (IF=5.012; KBN/MNiSW=40 pkt, liczba cytacji bez autocytoowań: 4).

H4. Jantas D*, Lech T, Gołda S, Pilc A, Lason W. New evidences for a role of mGluR7 in astrocyte survival: Possible implications for neuroprotection. *Neuropharmacology* 2018, 141:223-237. Elsevier. (IF=4.249; KBN/MNiSW=40 pkt; liczba cytacji bez autocytoowań: 0).

H5. Jantas D*, Grygier B, Gołda S, Chwastek J, Zatorska J, Tertel M. An endogenous and ectopic expression of metabotropic glutamate receptor 8 (mGluR8) inhibits proliferation and increases chemosensitivity of human neuroblastoma and glioma cells. *Cancer Letters* 2018, 432:1-16. Elsevier. (IF=6.491; KBN/MNiSW=35 pkt, liczba cytacji bez autocytoowań: 0).

H6. Jantas D*, Grygier B, Zatorska J, Lason W. Allosteric and Orthosteric Activators of mGluR8 Differentially Affect the Chemotherapeutic-Induced Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Damage: The Impact of Cell Differentiation State. *Basic and Clinical*

Pharmacology and Toxicology 2018, 123(4):443-451. Wiley. (IF=2.659; KBN/MNiSW=25 pkt, liczba cytacji bez autocytowań: 0).

*- autor korespondujący; #- równorzędne współautorstwo

Opis wkładu własnego oraz oświadczenia poszczególnych współautorów określające indywidualny udział każdego z nich w powstawanie powyższych publikacji zawarte zostały odpowiednio w załącznikach 4 i 5.

4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1 Wprowadzenie

Precyzyjna regulacja procesów śmierci komórki w organizmach wielokomórkowych, jest ważna nie tylko w aspekcie rozwojowym, ale również jest konieczna do utrzymania homeostazy tkanek u osobników dorosłych. Mowa tutaj o procesach **programowanej śmierci komórek** (PCD, ang. *Programmed Cell Death*), których **zahamowanie** może być przyczyną wystąpienia wad i schorzeń rozwojowych (np. choroby neurorozwojowe), chorób autoimmunologicznych lub **nowotworowych**. Z drugiej strony, **nadmierna i/lub długotrwała aktywacja** PCD może sprzyjać rozwojowi chorób zwyrodnieniowych, w tym związanych z wiekiem **chorób neurodegeneracyjnych** (np. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona). W obrębie PCD możemy wyróżnić procesy **apoptozy, autofagii**, regulowanej nekrozy (**nekroptozę**) oraz szereg form nieapoptotycznych PCD (np. PARP1-zależną nekrozę, ferroptozę, paraptozę, aponekrozę, oksytozę, pyroptozę czy entozę). Procesy apoptotyczne mogą przebiegać z udziałem cysteinowych proteaz, kaspaz (**apoptoza kaspazo-zależna**) lub w sposób niezależny od tych enzymów (**apoptoza kaspazo-niezależna**) (*Green and Llambi, 2015; Orrenius et al., 2011*). W pierwszym przypadku, w procesie tym wymagany jest nakład energetyczny ze strony degradowanej komórki i może on zasadniczo odbywać się dwoma ścieżkami: **zewnątrzkomórkową**, poprzez aktywację receptora śmierci (np. FAS/CD95, TNFR1, TRAILR) powiązaną kolejno z indukcją kaspazy-8 lub **wewnątrzkomórkową** (mitochondrialną), związaną z uwolnieniem z uszkodzonych mitochondriów cytochromu c (cyt. c), wytworzeniem kompleksu apoptosomu i aktywacją kaspazy-9. Zarówno szlak zewnętrzny, jak i wewnętrzny w końcowym etapie prowadzi do **indukcji kaspaz wykonawczych** (efektorowych) takich jak **kaspaza-3, kaspaza-6 czy kaspaza-7** wśród których substratów jest m.in. enzym CAD (ang. *caspases activated DNase*) oraz szereg białek cytoplazmatycznych. W obrazie morfologicznym dochodzi do **obkurczenia komórki**, charakterystycznej **fragmentacji DNA na odcinki**

oligonukleosomalne (około 180-200 par zasad) i **wytworzenia ciałek apoptotycznych**, które w sytuacji *in vivo* są dosyć szybko usuwane przez komórki fagocytujące, bez aktywacji odpowiedzi zapalnej, a w układach *in vitro* ulegają zjawisku tzw. **wtórnej nekrozy**. W przypadku apoptozy **kaspazo-niezależnej**, inne czynniki pro-apoptotyczne uwalniane z mitochondriów takie jak **AIF** (ang. *apoptosis inducing factor*) i **EndoG** (ang. *endonuclease G*), mające aktywność endonukleaz, są translokowane do jądra komórkowego gdzie przeprowadzają **wielkoskalową fragmentację DNA** (ang. *large scale DNA fragmentation*). AIF może również być aktywowany przez Ca^{2+} -zależne proteazy cysteinowe, **kalpains** (ang. *calpains*) i uczestniczyć w nieapoptotycznej formie PCD jakim jest **nekroptoza** (Delavallee et al., 2001; Vanlangenakker et al., 2012). Weryfikacja udziału procesów nekroptozy w badaniach eksperymentalnych może być wykonywana z pomocą **narzędzi farmakologicznych** (np. z użyciem inhibitora RIP1: **nekrostatyny 1; Nec-1**) i/lub molekularnych (np. wyciszenie ekspresji RIP1, RIP3 lub MLKL) (Degeretev and Linkermann, 2016). Śmierć komórki może odbywać się również w sposób **przypadkowy** w wyniku zadziałania czynnika uszkodzającego (chemicznego lub fizycznego) o dużym natężeniu w wyniku czego dochodzi do zmian martwiczych (**nekrozy**). W ostatnich latach dzięki dostępności zaawansowanych metod biologii molekularnej oraz komórkowej używane do tej pory morfologiczne rozróżnienie poszczególnych form śmierci komórkowej jest niewystarczające i do właściwej klasyfikacji konieczne jest użycie zestawu specyficznych markerów biochemicznych i molekularnych (Galluzzi et al., 2012, 2018). Co więcej, **mechanistyczne badania** nad procesami śmierci komórkowej w zdecydowanej większości są przeprowadzane w **modelach komórkowych** w których łatwiej jest je specyficznie zaindukować i śledzić ich zależny od czasu rozwój, niż miałyby to miejsce w sytuacji *in vivo*. Z klinicznego punktu widzenia dla znalezienia skutecznych terapii neuroprotektoryjnych lub przeciwnowotworowych, konieczne jest badanie wzajemnych powiązań pomiędzy różnymi formami śmierci komórkowej. Ponieważ dopiero na przestrzeni ostatnich lat zostały rozpoznane szczegółowe mechanizmy śmierci komórek nerwowych, dlatego też hamowanie tych procesów na różnych ich etapach stało się atrakcyjnym punktem uchwytu dla nowych leków neuroprotektoryjnych.

Ze względu na swoją szeroką dystrybucję w układzie nerwowym w wielu typach komórek (neurony, komórki głojowe, komórki nabłonka naczyń) i kompleksowość działania, **metabotropowe receptory glutaminianergiczne (mGluRs; ang. metabotropic glutamate receptors)** zaczęły by rozważane jako punkt uchwytu nowych leków do przeciwdziałania zaburzeniom neurologicznym (np. padaczka, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, ból

przewlekły) jak i psychiatrycznym (np. depresja, zaburzenia lękowe, schizofrenia) (Niswender and Conn, 2010). mGluRs należące do rodziny GPCR (ang. *G protein-coupled receptors*) klasy C, ze względu na homologię sekwencji aminokwasowych, aktywowaną ścieżkę sygnalizacyjną oraz profil farmakologiczny mGluRs zostały podzielone na trzy grupy (mGluR I-III). Do grupy I zaliczane są podtypy mGluR1 oraz mGluR5, które są receptorami pobudzającymi i poprzez białko $G_{q/11}$ aktywują szlak fosfolipazy C (PLC; ang. *phospholipase C*), natomiast mGluR grupy II (mGluR2 i mGluR3) oraz III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8) są receptorami hamującymi które poprzez białko $G_{i/o}$ hamują aktywność cyklazy adenylanowej (CA; ang. *adenyl cyclase*). mGluR grupy I są zlokalizowane głównie w rejonie postsynaptycznym gdzie modulują działanie receptorów jonotropowych dla glutaminianu (iGluRs; *ionotropic glutamate receptors*), natomiast mGluR grupy II i III są zlokalizowane głównie w części presynaptycznej, gdzie jako auto- lub heteroreceptory hamują uwalnianie różnych neuroprzekazników (głównie Glu i GABA) (Nicoletti et al., 2011; Niswender and Conn, 2010). Oprócz klasycznego działania poprzez białka G_{α} , mGluRs mogą alternatywnie poprzez białka $G_{\beta\gamma}$ aktywować szlak kinaz prożyciowych takich jak MAPK/ERK1/2 lub PI3-K/Akt (Iacovelli et al., 2013; Nicoletti et al., 2011). Do pełnej aktywacji mGluR jest konieczne przyłączenie 2 cząsteczek Glu (lub innych agonistów ortosterycznych) w rejonie zawiasowym receptora (ang. *Venus Flaptrap domain*) i wytworzenie homodimerów, które w dalszej kolejności prowadzą do zmian konformacyjnych receptora i aktywacji odpowiednich białek G. W strukturze receptora, pomiędzy 3 a 4 domeną międzybłonową znajduje się miejsce wiązania dla agonistów allosterycznych, pozytywnych (PAMs; ang. *positive allosteric modulators*) lub negatywnych (NAMs; ang. *negative allosteric modulators*) allosterycznych modulatorów. Agoniści allosteryczni mogą aktywować receptor *per se*, bez konieczności przyłączenia agonisty ortosterycznego, natomiast PAMs lub NAMs będą odpowiednio nasilać lub osłabiać aktywność poszczególnych podtypów mGluRs tylko w obecności agonisty ortosterycznego (Nicoletti et al., 2011; Niswender and Conn, 2010). Należy zauważyć, że wiele biologicznych funkcji wywołanych przez agonistów ortosterycznych GPCRs może być zależna od ich zróżnicowanej odpowiedzi na poziomie efektorów wewnątrzkomórkowych poprzez zjawisko „*ligand-directed trafficking of receptor signaling*”, któremu mogą również podlegać bardziej specyficzni w działaniu agoniści allosteryczni i PAMs (Digby et al., 2010). Początkowo badania przedkliniczne potencjału terapeutycznego mGluRs były utrudnione brakiem selektywnych ligandów do poszczególnych podtypów tych receptorów, w miarę dostępności specyficznych narzędzi, obszar farmakologii i funkcjonowania poszczególnych podtypów

mGluRs został ściślej określony (Nicoletti et al., 2011; Bruno et al., 2017). Pomimo faktu, że mGluRs od wielu lat wydają się atrakcyjnym punktem uchwytu dla leków do wielu schorzeń OUN (Bruno et al., 2017; Nicoletti et al., 2011), to relatywnie słaby profil farmakologiczny obecnie dostępnych ligandów mGluRs oraz niepełna wiedza o kompleksowej naturze mGluRs pozostawia tę grupę receptorów głównie na etapie badań przedklinicznych. Dlatego też, uzasadnione są dalsze badania podstawowe nad rolą poszczególnych podtypów mGluRs w określonych zjawiskach biologicznych, w tym w procesach śmierci komórkowej, jak i poszukiwanie nowych ligandów mGluRs o lepszym profilu farmakologicznym.

4.3.2 Rola mGluR grupy II i III w neuroprotekcji

4.3.2.1 Stan wiedzy

Wśród kandydatów na skuteczne leki neuroprotektyjne od prawie 30 lat rozważane są **ligandy mGluRs** (Caraci et al., 2012; Masilamoni and Smith, 2018; Nicoletti et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). Ze względu na swój modulacyjny charakter, wydają się one bezpieczniejsze do klinicznego użycia niż antagoniści iGluRs, szczególnie typu NMDA (np. MK-801, ketamina), które są obarczone szeregiem działań niepożądanych (np. efekty psychozomimetyczne, zaburzenia uwagi i pamięci, neurotoksyczność u młodych osobników). **Wczesne badania** (lata 90-te zeszłego stulecia) nad potencjałem ochronnym ligandów mGluR dotyczyły **związków nieselektywnych** lub selektywnych tylko do określonych grup mGluR i były one testowane w **modelach ekscytotoksyczności** (uszkodzeń komórek nerwowych wywołanych nadmiernym pobudzeniem) (Caraci et al., 2012; Nicoletti et al., 2011). Wykazano, że **hamowanie mGluR grupy I i stymulacja grupy II i III** obniża uszkodzenia pierwotnych hodowli neuronalnych indukowane NMDA czy kwasem kainowym (Bruno et al., 1995, 1997, 2000). W kolejnych badaniach nad ekscytotoksycznością, z użyciem hodowli neuronalnych oraz neuronalno-glejowych pochodzących od zwierząt dzikich oraz nokautowych, wykazano istotny udział receptora mGluR4 zlokalizowanego w komórkach nerwowych w efektach ochronnych agonistów grupy III mGluR (L-AP4 i L-SOP) (Bruno et al., 2000) oraz udział astrocytarnego mGluR3 w neuroprotektoryjnych efektach agonistów grupy II (DCG-IV; NAAG) (Bruno et al., 1998, 2000; Corti et al., 2007; Pinteaux-Jones i wsp., 2008; Caraci et al., 2010; Moyanova et al., 2010). O ile wczesne badania nad potencjałem ochronnym mGluRs były prowadzone porównawczo w danym modelu komórkowym (głównie mysie hodowle pierwotne korowych komórek nerwowych lub komórek ziarnistych mózdzku), z użyciem dostępnych ligandów mGluRs i w niektórych

przypadkach z różnymi czynnikami uszkodzającymi (np. NMDA i kwas kainowy), to badania późniejszych lat skupione były już na konkretnych związkach, bardziej lub mniej selektywnych (np. antagoniści mGluR1 lub mGluR5; agoniści mGluR II lub III; mGluR4 PAM) i analizie wewnątrzkomórkowych mechanizmów ich działania neuroprotektoryjnego w określonym modelu uszkodzenia (ekscytotoksycznego czy ischemicznego) (Domin et al., 2006, 2010, 2014, 2015, 2016; Śmiałowska et al., 2012). Zdecydowanie **mniej badań** dotyczyło roli **mGluRs w procesach apoptotycznych**, co jest szczególnie istotne przy poszukiwaniu nowych terapii przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, stwardnienie boczne zanikowe). W miarę dokładnie oceniono udział grupy I mGluR, w mechanizmach apoptozy neuronalnej. Wykazano w modelach hodowli neuronalnych, że **stymulacja mGluR5 (DHPG) może działać ochronnie** w modelu uszkodzeń **apoptotycznych** (staurosporyna, etopozyd) poprzez hamowanie kaspazy-3, ale jednocześnie **zwiększa uszkodzenia nekrotyczne** (wywołane deprivacją tlenu i glukozy; OGD; ang. *oxygen-glucose deprivation*) (Allen et al., 2000). Natomiast w modelu uszkodzeń apoptotycznych wywołanych β -amyloidem w hodowlach neuronów korowych oraz komórek ziarnistych mózdzku (CGC, ang. *cerebellar granule cells*), stymulacja mGluR5 nie miała wpływu na te uszkodzenia, natomiast antagonistą mGluR I (AIDA) zwiększał toksyczność β -amyloidu, ale tylko w hodowlach korowych (Allen et al., 1999). Powyższe prace zaczęły jako pierwsze wskazywać na różne czynniki, takie jak **typ uszkodzenia i rejon pochodzenia komórek**, które mogą mieć istotny wpływ na **potencjał ochronny ligandów mGluRs**. Ponieważ w sytuacji *in vivo* mamy do czynienia z różnymi typami uszkodzeń komórek nerwowych występującymi równocześnie, dlatego też mGluR grupy I wydają się być mało bezpiecznym celem dla farmakoterapii przewlekłych chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto, ze względu na postsynaptyczne umiejscowienie tych receptorów, ich długotrwała stymulacja/inhibicja konieczna do przeciwdziałania chronicznym zmianom degeneracyjnym, mogłaby prowadzić do poważnych efektów niepożądanych (np. uszkodzenia z nadmiernego pobudzenia; zaburzenia uwagi i pamięci) (Bruno et al., 2017). Dlatego też, dla **celów neuroprotektoryjnych** bardziej obiecująca wydaje się być **grupa II oraz III mGluR**, gdyż **stymulacja** tych receptorów wykazuje **działanie ochronne** zarówno w modelach uszkodzeń **ekscytotoksycznych, nekrotycznych, jak i apoptotycznych**. Wykazano, że agoniści mGluR II (LY354740) oraz III (L-AP4, L-SOP) działali ochronnie w modelach śmierci apoptotycznej i/lub nekrotycznej komórek nerwowych (NMDA, NO, β -amyloid, niskie stężenie jonów K^+ , staurosporyna, etopozyd, MPTP, 6-OHDA) (cytacje w

pracach H1 i H2). W niektórych pracach wskazano, że **rejon pochodzenia komórek nerwowych** może mieć wpływ na uzyskany efekt ochronny agonistów mGluR grupy II i III. Zarówno agonista grupy II (DCG-IV) oraz III (L-SOP) mGluR zapobiegał uszkodzeniom w modelu apoptozy indukowanej β -amyloidem w komórkach korowych, natomiast w CGC efektywny był tylko agonista grupy III (Copani et al., 1995). Co więcej, agoniści mGluR grupy II zapobiegali apoptozie komórek glejowych indukowanej NO czy wysokim poziomem glukozy a efekty te były związane z hamowaniem aktywności kaspazy-3 i/lub zwiększoną produkcją glutationu (GSH; ang. *glutathione*) (Berent-Spillson et al., 2007; Durand et al., 2010). Ponieważ **specyficzne ligandy** do poszczególnych podtypów **mGluRs**, szczególnie grupy III, stawały się dostępne w różnych okresach **na przestrzeni ostatnich 10-15 lat** (agonista mGluR8, (S)-3,4-DCPG od 2001; mGluR4 PAM, PHCCC od 2003 roku; allosteryczny agonista mGluR7, AMN082 i mGluR8 PAM, AZ12216052 od 2008 roku), dlatego też **porównawczy udział tych podtypów receptorów** (szczególnie mGluR7 i mGluR8) **w modulacji procesów śmierci komórkowej był mało poznany**. Nie był również znany **wpływ stopnia rozwoju komórek nerwowych** na efekty ochronne indukowane aktywacją poszczególnych podtypów mGluRs przez **określone ligandy (agoniści ortosteryczni vs. allosteryczni)**. Badania te były uzasadnione naszymi wcześniejszymi wynikami, dotyczącymi anty-apoptotycznych efektów memantyny, antagonisty NMDAR, która była bardziej efektywna w mysich komórkach nerwowych niedojrzałych (7 DIV) niż dojrzałych (12 DIV) (Jantas-Skotniczna et al., 2006; Jantas et al., 2009; Jantas and Lason, 2009a, 2009b). Ponadto, substancja ta również działała silniej w ludzkich komórkach nerwiaka zarodkowego (*neuroblastoma*) SH-SY5Y o fenotypie niezróżnicowanym (UN-SHSY5Y) niż neuronalnie zróżnicowanym (RA-SH-SY5Y) (Jantas et al., 2008). Z punktu widzenia aplikacyjnego, wytypowanie najskuteczniejszych ligandów z grupy II i III mGluR do zapobiegania uszkodzeniom tkanki nerwowej u osobników młodych oraz starszych, czy też wskazanie na związki które mogłyby interferować z apoptozą rozwojową wydało się być wysoce zasadne. Ponadto, pomimo wykazania ekspresji receptorów **mGluR7 w komórkach glejowych** (astrocytach), ich udział w neuroprotekcji wywołanej specyficzną stymulacją receptorów mGluR7 **nie został określony**, a dotychczasowe badania w tym aspekcie dotyczyły głównie podtypów mGluR5 oraz mGluR3 (*cytacje w pracach H4*). Szereg danych eksperymentalnych wskazujących na potencjał terapeutyczny **agonistów grupy III** (L-AP4, ACPT-I), w tym mGluR 4 PAMs (PHCCC; VU0155041) w modelach **choroby Parkinsona**, nie tylko do leczenia symptomów (poprzez normalizację nadaktywnych szlaków Glu i GABA w jądrach podstawy), ale również do działań **neuroprotektoryjnych**, uzasadniało

przeprowadzenie **badan porównawczych** z różnymi **aktywatorami mGluR grupy II oraz III** w modelu komórkowym choroby Parkinsona (**komórki SH-SY5Y**) z zastosowaniem neurotoksyny dopaminergicznej **MPP(+)** (ang. *1-methyl-4-Phenylpyridinium ion*) oraz w uszkodzeniach wywołanych czynnikami pro-apoptotycznymi **staurosporyną** oraz **dokсорubicyną**, aktywującymi odpowiednio **wewnątrzkomórkowy** oraz **zewnątrzkomórkowy** szlak apoptozy (Jantas et al., 2009; Jantas and Lasoń, 2009a, 2009b).

4.3.2.2 Cele badawcze:

- I. **Weryfikacja użyteczności komórek SH-SY5Y** do badań mGluR grupy II i III oraz **ocena potencjału ochronnego** różnego typu ligandów tej grupy receptorów w modelach uszkodzeń **apoptotycznych** (staurosporyna i dokсорubicyna) i **apoptotyczno-nekrotycznych** (MPP(+)).
- II. Określenie **potencjału ochronnego** wybranych **ligandów mGluR grupy I i III** w modelach uszkodzeń komórek nerwowych w **hodowlach pierwotnych** indukowanych czynnikami **pro-apoptotycznymi** i **ekscytotoksycznymi** – zdefiniowanie czynników wpływających na efekt ochronny: typ uszkodzenia, stopień rozwoju komórek, pochodzenie komórek, typ liganda.
- III. Określenie **udziału mGluR7** w **glioprotekcji** i ocena znaczenia tego zjawiska w efektach neuroprotektyjnych agonisty allosterycznego mGluR7, AMN082.
- IV. Określenie **wewnątrzkomórkowych mechanizmów** działania ochronnego ligandów mGluR II i III w badanych modelach komórkowych.

4.3.2.3 Podsumowanie uzyskanych wyników

I. **Komórki SH-SY5Y [H1 i H2]**

Komórki SH-SY5Y są szeroko stosowanym modelem *in vitro* w obszarze neurotoksyczności i neuroprotekcji, a ze względu na swój dopaminergiczny fenotyp są **uznanym modelem komórkowym choroby Parkinsona** (Cheung et al., 2009; Lopes et al., 2010, Presgraves et al., 2004). Natomiast **nie były** jak dotąd stosowane jako **model** eksperymentalny w **obszarze farmakologii i funkcji mGluRs**. W pracy [H1] wykazaliśmy ilościowo za pomocą metody qRT-PCR z użyciem specyficznych sond TaqMan **zróżnicowaną ekspresję** transkryptów dla **mGluR grupy II i III** z największą ekspresją **mGluR8** (8-krotnie wyższą niż mGluR2) >> mGluR2 ≥ mGluR7 > mGluR4, bez detekcji mRNA dla mGluR3 oraz mGluR6. Ponadto, 7-dniowe różnicowanie tych komórek do fenotypu neuronalnego z użyciem kwasu retinowego (RA, ang. *retinoic acid*) wpłynęło

istotnie na obniżenie ekspresji mRNA dla mGluR2, mGluR4 i mGluR8, a podwyższenie mGluR7 w porównaniu do komórek niezróżnicowanych. Efekty te były potwierdzone również na poziomie białka receptorowego mierzonego metodą Western blot, za wyjątkiem mGluR4, dla którego obserwowaliśmy w procesie różnicowania spadek transkryptyu natomiast wzrost na poziomie białka. Badane ligandy: **LY354740** – agonista **ortosteryczny mGluR II**; **ACPT-I** – agonista **ortosteryczny mGluR III**; **VU0361737** – **mGluR4 PAM**; **AMN082** – agonista **allosteryczny mGluR7**; **(S)-3,4-DCPG** – agonista **ortosteryczny mGluR8** oraz **AZ12216052** – **mGluR8 PAM** w szerokim zakresie stężeń nie wykazały efektów toksycznych na komórki SH-SY5Y [H1]. Efekt **stymulujący proliferację** wykazały tylko modulatory allosteryczne: **VU0361737** i **AZ12216052** i był on hamowany przez antagonistę mGluR III (UBP1112) oraz inhibitor ścieżki MAPK/ERK1/2 (PD98059) [H1]. W tabeli 1 podsumowano efekty ochronne testowanych **6 aktywatorów mGluR grupy II i III** (mierzone testem redukcji MTT i wyrażone jako % zmian kontroli) w modelu uszkodzeń wywołanych **staurosporyną (St)** [H2], **doksorubicyną (Dox)** [H2] oraz **MPP(+)** [H1] w komórkach niezróżnicowanych (**UN-SH-SY5Y**) i neuronalnie zróżnicowanych (**RA-SH-SY5Y**).

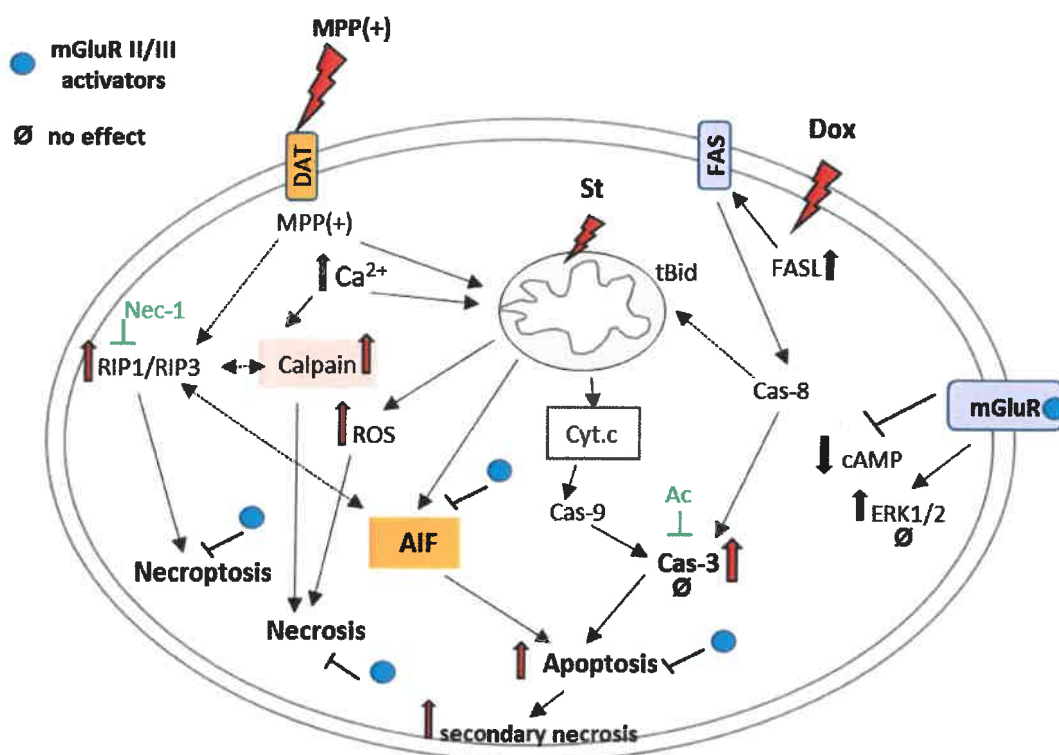
		LY354740 (0.01-10 µM)	ACPT-I (0.01-10 µM)	VU0361737 (0.1-10 µM)	AMN082 (0.001-1 µM)	(S)-3,4-DCPG (0.01-100 µM)	AZ12216052 (0.001-10 µM)
UN	St [H2]	16-22%	20%	12-24 %	∅	∅	12-17%
	Dox [H2]	∅	∅	13-15%	23%	∅	15-19%
	MPP(+) [H1]	16-24%	16-20%	16-19%	15-17%	15-27%	20-32%
RA	St [H2]	17%	∅	∅	∅	∅	22-23%
	Dox [H2]	∅	-18% (100 µM)	∅	∅	∅	∅
	MPP(+) [H1]	∅	∅	∅	∅	16-30%	18-20%

Tabela 1. Efekty aktywatorów mGluR grupy II i III w komórkach UN-i RA-SH-SY5Y uszkodzonych staurosporyną (St), doksorubicyną (Dox) oraz MPP(+). Uszkodzenia we wszystkich modelach wynosiło około 50% w stosunku do kontroli. Brak efektu – ∅.

Analiza porównawcza wykazała **wpływ stopnia zróżnicowania komórek, rodzaju uszkodzenia, jak również typu liganda na potencjał ochronny badanych aktywatorów mGluR grupy II i III**. I tak, **najkorzystniejsze efekty ochronne** badanych ligandów mGluR

grupy II i III obserwowano w **modelu** uszkodzeń apoptotyczno-nekrotycznych wywołanych **MPP(+)**, gdzie wszystkie badane związki działały ochronnie w **UN-SH-SY5Y**, z relatywnie największym efektem **aktywatorów mGluR8** ((S)-3,4-DCPG i AZ12216052). Natomiast, w modelu uszkodzeń wywołanym czynnikiem pro-apoptycznym **St** wykazano efekt protekcyjny dla agonisty **mGluR II i III, mGluR4 PAM i mGluR8 PAM**. Najsłabsze efekty i zawężone tylko do **ligandów allosterycznych** (VU0361737; AMN082 i AZ12216052) zaobserwowano w modelu śmierci komórkowej indukowanej **Dox**. W komórkach **RA-SH-SY5Y** efekt **neuroprotekcyjny był osłabiony** (MPP(+) oraz St) **lub nieobecny** (Dox) w porównaniu do komórek UN-SH-SY5Y, co mogłoby wynikać z maskowania efektów ochronnych mGluR II/III przez RA (np. poprzez aktywację ścieżek prożyciowych MAPK/ERK1/2 lub PI3-K/Akt) (Cheung et al., 2009; Miloso et al., 2004). Należy podkreślić, że **efekt ochronny** wywołany aktywatorami mGluR grupy II i III był tylko **częściowy** (maksymalnie 30%), co potwierdza modulacyjny charakter stymulacji tych receptorów również w regulacji procesów apoptotycznych i apoptotyczno-nekrotycznych. Ponadto, w zastosowanych modelach **nie** obserwowaliśmy wyraźnej **zależności od stężenia** w efektach ochronnych testowanych ligandów mGluR, co więcej, w niektórych układach efekt ten był dwufazowy (szczególnie w modelu z MPP(+)) dla agonistów ortosterycznych) lub przybierał kształt dzwonowaty (ang. *bell-shape response*) (np. dla mGluR4 lub mGluR8 PAMs) [H1, H2]. Najprawdopodobniej, dwufazowość działania wynika z niespecyficzności ligandów i/lub z różnych mechanizmów neuroprotekcji indukowanych przez niskie vs. wyższe stężenia tego samego związku [H1]. Odpowiedź VU0361737 oraz AZ12216052 (*bell-shape response*) wydaje się bardziej akceptowalna z klinicznego punktu widzenia, gdzie efekt ochronny był obserwowany w większym zakresie stężeń [H1 H2]. Z mechanistycznego punktu widzenia, wykazaliśmy, że **efekty ochronne** testowanych aktywatorów mGluR grupy II i III były **blokowane** odpowiednio przez **antagonistę grupy II** (LY341495) lub **III** (UBP1112) mGluR, **za wyjątkiem** efektów **mGluR8 PAM** [H1, H2]. We wszystkich badanych modelach uszkodzeń komórek SH-SY5Y dochodziło do **aktywacji procesów apoptotycznych** mierzonych wzrostem **aktywności kaspazy-3** oraz wzrostem liczby komórek z **pofragmentowanym DNA** (metoda TUNEL), natomiast testowane ligandy mGluR grupy II i III **nie wpływały hamująco** na pierwszy parametr, natomiast **obniżały liczbę jąder apoptotycznych** [H1, H2]. We wszystkich badanych modelach dochodziło również do **zmian nekrotycznych** (mierzonych liczbą jąder komórkowych wybarwionych jodkiem propidyny), ale **tyko w modelu MPP(+)** były one **obniżane** przez aktywatory mGluR grupy III. Kolejne badania w modelu MPP(+) wskazały na **hamowanie procesów nekroptozy**, gdyż inhibitor tego procesu

(Nec-1) znosił efekty ochronne aktywatorów mGluR grupy III [H1]. Jest to **pierwsze doniesienie** na temat potencjalnego **udziału hamowania procesów nekroptozy przez ligandy mGluRs** przynajmniej w modelu uszkodzeń indukowanych MPP(+) w komórkach SH-SY5Y i zagadnienie to powinno być dokładniej zbadane w przyszłości. Natomiast w modelu **uszkodzeń apoptotycznych** wywołanych St lub Dox wzrost liczby nekrotycznych jąder komórkowych jest najprawdopodobniej związany ze zjawiskiem **wtórnej nekrozy**, które, jak wynika z naszych danych, **nie podlega regulacji przez mGluR grupy II i III** [H2]. W modelu uszkodzeń **apoptotycznych** (St i Dox) wykazaliśmy zaangażowanie mechanizmów **kaspazo-niezależnych** poprzez **hamowanie** przez aktywatory mGluR grupy II i III **translokacji AIF** (ang. *apoptosis inducing factor*) [H2]. Ponadto, stosując specyficzne inhibitory aktywacji ścieżki MAPK/ERK1/2 (PD98059 lub U0126) wykluczaliśmy udział tego szlaku sygnalizacyjnego w protekcji wywołanej poprzez wybrane aktywatory mGluR grupy II i III we wszystkich modelach uszkodzeń komórek SH-SY5Y. Nie zaobserwowaliśmy synergizmu w ochronnych efektach aktywatorów mGluR grupy II i III a inhibitorem kaspazy-3, Ac-DEVD-CHO przynajmniej w testowanym modelu z MPP(+) [H1]. Dodatkowo, wykazaliśmy **efekt hamujący** prawie wszystkich badanych aktywatorów mGluR grupy II i III, za wyjątkiem AMN082, na **aktywność DAT** (transportera dla dopaminy), mierzonego transportem dokomórkowym wyznakowanego trytem MPP(+). Co więcej, różnicowanie komórek kwasem retinowym, w większości przypadków (poza efektem ligandów mGluR8) zniosło powyższy efekt hamujący na DAT [H1]. Jednakże, efekty te **nie były skorelowane** z efektami ochronnymi aktywatorów mGluR grupy II i III w modelu uszkodzeń wywołanych MPP(+). Wszystkie badane aktywatory mGluR grupy II i III **odwracały** wywołany St lub Dox **spadek wewnątrzkomórkowego pH**, co według wcześniejszych doniesień mogłoby mieć znaczenie dla neuroprotekcji (*Maiese et al., 2000; Vincent et al., 1999*). Jednakże, biorąc pod uwagę fakt, że zarówno stężenia ochronne jak i podprogowe w podobny sposób odwracały wywołane czynnikami pro-apoptotycznymi zakwaszenie komórki, efekt ten raczej **nie ma znaczenia w działaniach neuroprotektyjnych** testowanych w naszych modelach ligandów mGluRs [H2].



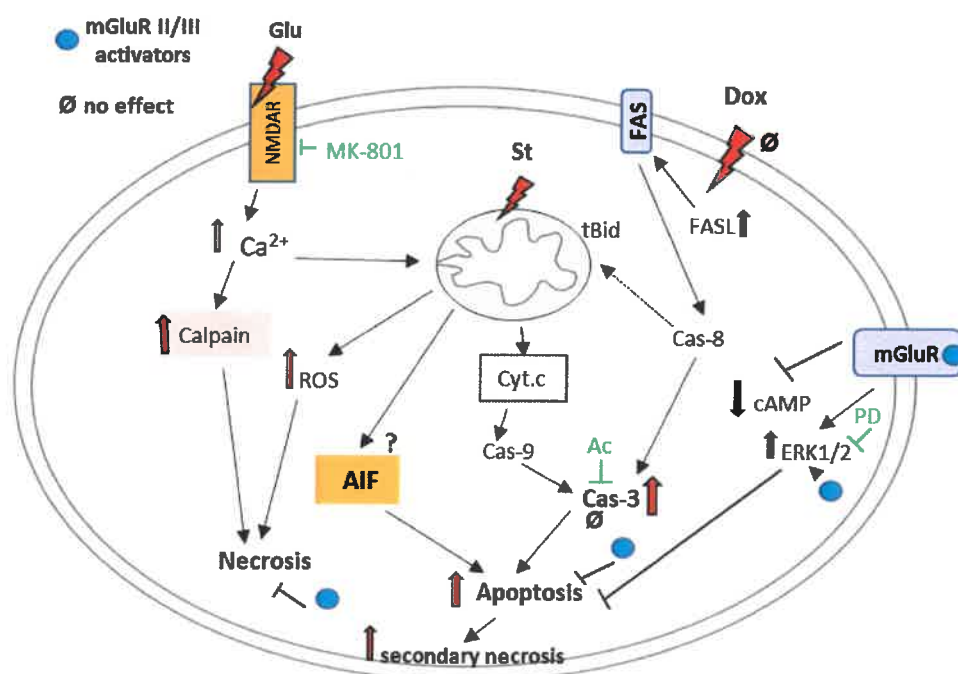
Schemat 1. Podsumowanie mechanizmów neuroprotekcji mediowanych przez aktywatory mGluR grupy II i III w komórkach SH-SY5Y.

II. Hodowle pierwotne neuronalne komórek hipokampa oraz komórek ziarnistych mózdzku [H3]

Od samego początku badań nad potencjałem ochronnym ligandów mGluRs, **hodowle pierwotne komórek nerwowych** wywodzące się z różnych obszarów mózgu (kora, hipokamp, mózdzek) gryzoni (mysz, szczur) były **podstawowym modelem badawczym**. W naszych badaniach nad potencjałem ochronnym ligandów mGluR grupy II i III wykorzystaliśmy model mysich hodowli pierwotnych wywodzących się z różnych obszarów mózgu. W publikacji [H3] zawarliśmy dane dotyczące **ekspresji** poszczególnych podtypów receptorów **mGluR grupy II i III** w 7 i 12 dniowych (7 i 12 DIV) hodowlach neuronalnych komórek hipokampa (HIP) oraz **komórek ziarnistych mózdzku (CGC)**, mierzonych metodą ilościowego PCR (qPCR). Poprzez analizę porównawczą, wykazaliśmy **zróznicowany poziom ekspresji** poszczególnych **podtypów mGluR grupy II i III** pomiędzy komórkami HIP i CGC. I tak **najwyższy poziom ekspresji** w obu typach hodowli miał *Grm3*, a następnie *Grm7 > Grm2, Grm4, Grm8* oraz *Grm8 > Grm4 > Grm7 > Grm2* dla odpowiednio hodowli **HIP** oraz **CGC**. Regulację **rozwojową** wykazano dla *Grm3* zarówno w komórkach HIP jak i CGC z **mniejszą ekspresją** w komórkach **12 DIV**, natomiast odwrotną

zależność zaobserwowano dla *Grm7* w komórkach HIP, gdzie poziom ekspresji tego genu był wyższy w komórkach 12 DIV. Ponadto, wykazaliśmy większą wrażliwość 7 DIV HIP i CGC na uszkodzenia wywołane czynnikami pro-apoptotycznymi w porównaniu z komórkami 12 DIV, natomiast te ostatnie były bardziej podatne na toksyczne działanie Glu, co jest zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami (Jantas and Lasoń, 2009a, 2009b; Jantas-Skotniczna et al., 2006; Leśkiewicz et al., 2008). W powyższych modelach uszkodzeń przetestowaliśmy potencjał ochronny 4 ligandów mGluR: LY354740, ACPT-I, AMN082 oraz VU0361737. Nasze badania pokazały, że związki te **nie były toksyczne** w zastosowanych przedziałach stężeń w żadnym z użytych modeli komórkowych (7 i 12 DIV HIP; 7 i 12 DIV CGC). **Analiza porównawcza pól pod krzywą (AUC; ang. area under curve)** wykazała udział **stopnia rozwoju komórek, modelu uszkodzenia oraz rejonu pochodzenia komórek** nerwowych w efektach neuroprotekcyjnych testowanych aktywatorów mGluR grupy II i III [H3]. Generalnie, efekty ochronne dla wszystkich testowanych ligandów zaobserwowano w modelu uszkodzeń wywołanych St w 7 i 12 DIV CGC. Analiza szczegółowa, wykazała **efekty ochronne ligandów ortosterycznych (LY354740 i ACPT-I) w 12 DIV, ale nie w 7 DIV HIP** w modelu uszkodzeń indukowanych St oraz Glu. Również w komórkach CGC zaobserwowaliśmy zależność rozwojową, ale tylko dla ACPT-I, który był bardziej efektywny w komórkach 12 DIV. Takiego wpływu stopnia dojrzałości komórek na efekty ochronne, **nie zaobserwowano dla ligandów allosterycznych (AMN082 i VU0361737), które były ochronne zarówno w dniu 7, jak i 12.** Ponadto, **większe efekty ochronne** w komórkach HIP zaobserwowano w modelu uszkodzeń indukowanych St dla LY354740 (w 7 i 12 DIV), ACPT-I (w 12 DIV) i AMN082 (w 12 DIV) w porównaniu do uszkodzeń wywołanych Glu. Dodatkowo, w modelu St zauważono **lepszą ochronę** w komórkach CGC niż HIP dla **agonistów ortosterycznych** zarówno w 7, jak i 12 DIV, natomiast w przypadku agonisty allosterycznego mGluR7, AMN082 efekt protekcyjny był wyższy w 12 DIV HIP w porównaniu do 12 DIV CGC. Jednakże, obserwowane **efekty ochronne** badanych ligandów mGluR grupy II i III **nie były skorelowane z ekspresją receptorów** w poszczególnych typach hodowli komórkowych, za wyjątkiem negatywnej korelacji pomiędzy protekcją wywołaną agonistą mGluR II (LY354740) a ekspresją transkryptu dla mGluR3 w 12 DIV HIP [H3]. Zarówno w komórkach HIP jak i CGC na obu etapach rozwoju (7 i 12 DIV) **nie obserwowaliśmy efektów ochronnych** aktywatorów mGluR grupy II i III na **uszkodzenia** wywołane induktorem apoptozy zewnątrzkomórkowej, Dox. Jest to w kontraście do wyników uzyskanych w modelu komórek UN-SH-SY5Y, gdzie AMN082 i VU0361737 były ochronne w tym modelu uszkodzeń [H2]. Te rozbieżności mogą

wynikać z różnych mechanizmów działania toksycznego Dox w komórkach nieproliferujących (neurony) z aktywacją głównie szlaku receptora śmierci i dzielących się (komórki UN-SH-SY5Y), w których może dochodzić do hamowania proliferacji oraz indukowania bezpośrednio uszkodzeń DNA (alkilacja DNA) [H3]. Ponadto, wykazaliśmy, że efekty ochronne aktywatorów mGluR grupy II i III w modelu St **nie** były związane z hamowaniem kaspazy-3, co jest spójne z wynikami otrzymanymi z komórek SH-SY5Y. Natomiast na poziomie pomiaru liczby jąder nekrotycznych (barwienie jodkiem propidyny) oraz apoptotycznych (barwienie Hoechst 33342) w modelu St wykazaliśmy **obniżenie obu parametrów** przez wszystkie badane ligandy mGluRs w 7 DIV CGC, natomiast w 12 DIV HIP zaobserwowano zmianę **tylko** w liczbie komórek nekrotycznych. Również w modelu Glu, obserwowaliśmy obniżenie markera nekrotycznego przez testowane ligandy mGluRs. Neuroprotekcja indukowana przez aktywatory mGluR grupy II i III była **blokowana** przez odpowiednich antagonistów mGluR grupy II (LY341495) i III (UBP1112) **wyłącznie** w modelu Glu, ale nie St. Efekt ten jest przeciwny do danych uzyskanych z komórek SH-SY5Y, gdzie ochronne efekty LY354740, ACPT-I oraz VU0361737 na uszkodzenia wywołane St były znoszone przez antagonistów mGluR grupy II i III. Efekty neuroprotekcyjne wywołane przez ACPT-I oraz AMN082 w 12 DIV HIP w modelu uszkodzeń wywołanych St były znoszone przez inhibitora MAPK/ERK1/2 (PD98059) wskazując na różnice w mechanizmie neuroprotekcji pomiędzy różnymi ligandami mGluR grupy II i III.

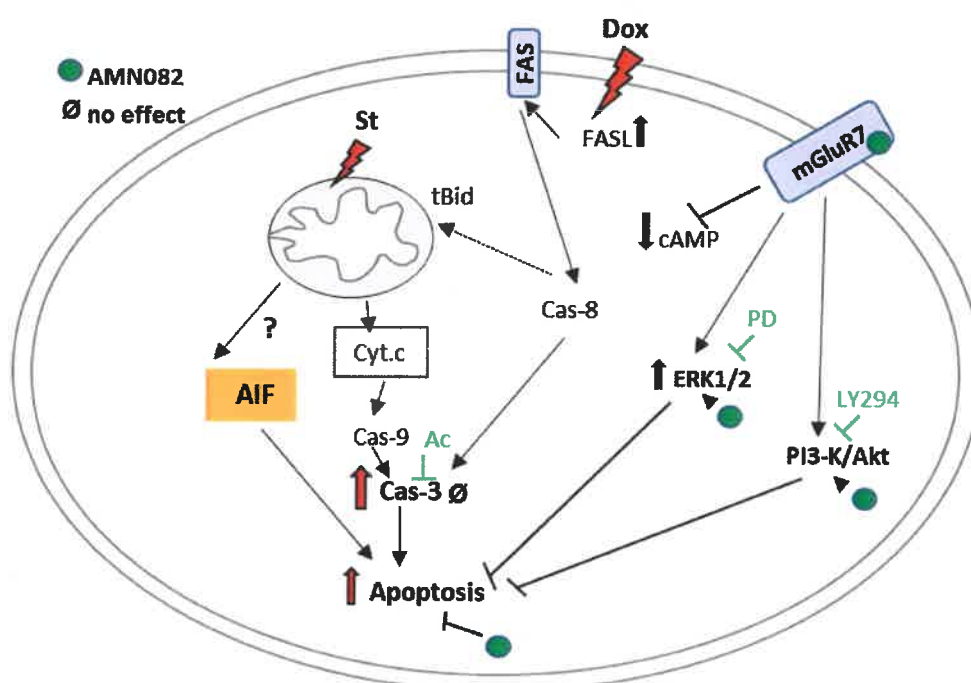


Schemat 2. Podsumowanie mechanizmów neuroprotekcji mediowanych przez aktywatory mGluR grupy II i III w pierwotnych komórkach nerwowych

III. Hodowle korowe neuronalne, neuronalno-glejowe oraz glejowe [H4]

W kolejnej pracy [H4] kontynuowaliśmy badania nad wpływem stopnia rozwoju komórek nerwowych na efekty ochronne ligandów mGluRs, tym razem zawężone do **agonisty allosterycznego mGluR7 (AMN082)**, a poszerzone o **udział komórek glejowych** w tych efektach. W tym celu użyliśmy **komórki korowe neuronalne** (max. 10% komórek GFAP-pozytywnych), **neuronalno-glejowe** (około 30-40% komórek GFAP-pozytywnych) oraz **glejowe** (około 90% komórek GFAP-pozytywnych) [H4]. Ekspresja transkryptów dla mGluR grupy II i III w **komórkach korowych** była **podobna** jak w komórkach **HIP** ($Grm3 > Grm7 > Grm2, Grm8 > Grm4$), z tym że **nie** obserwowaliśmy istotnych **różnic** w ekspresji pomiędzy hodowlami **neuronalnymi a neuronalno-glejowymi**, ani pomiędzy **poszczególnymi dniami rozwoju** dla konkretnych podtypów mGluRs co jest w opozycji z wynikami otrzymanymi z hodowli HIP i CGC [H3]. W komórkach **glejowych** obserwowaliśmy ekspresję transkryptów $Grm3 > Grm7 \geq Grm8 > Grm4 > Grm2$, ale na zdecydowanie niższym poziomie niż w hodowlach neuronalnych, co by tłumaczyło brak różnic pomiędzy ekspresją poszczególnych podtypów w hodowlach neuronalnych i neuronalno-glejowych. **Analiza** porównawcza **AUC** pomiędzy efektami ochronnymi wywołanymi przez **AMN082** w hodowlach neuronalnych oraz neuronalno-glejowych wykazała istotną **rolę komórek glejowych** w modelu uszkodzeń wywołanym **Glu**, ale nie St w hodowlach 7 DIV. Natomiast w modelu uszkodzeń St efekt ochronny AMN082 był większy w komórkach neuronalnych w porównaniu do hodowli mieszanych zarówno w dniu 7, jak i 12. **Różnice rozwojowe** w efektach ochronnych AMN082 obserwowaliśmy w modelu uszkodzeń wywołanych **Glu** w hodowlach neuronalnych oraz w modelu uszkodzeń **CGC** wywołanych niskim stężeniem jonów potasu (**LP**; ang. *low potassium*), w obu przypadkach protekcja była obserwowana tylko w **12 DIV** [H4]. Porównując efekty neuroprotekcyjne AMN082 w hodowlach korowych, zarówno w modelu uszkodzeń St jak i Glu [H4], to jest ona niższa niż w komórkach HIP oraz CGC [H3]. W hodowlach neuronalnych i neuronalno-glejowych **nie** obserwowaliśmy efektów ochronnych AMN082 w modelu uszkodzeń wywołanych **Dox**, ani efektu obniżającego na **kaspazę-3** w modelach apoptozy St i LP [H4], podobnie jak to miało miejsce w hodowlach HIP i CGC [H3]. W następnym etapie, sprawdziliśmy potencjał ochronny AMN082 w modelu uszkodzeń komórek glejowych wywołanych czynnikami pro-apoptycznymi (St oraz Dox). Związek ten w niskich stężeniach mikromolarnych z podobną efektywnością (około 15-20% w teście MTT) **zmniejszał uszkodzenia** wywołane **St** lub **Dox**, **bez** hamującego wpływu na **aktywność kaspazy-3** [H4]. Natomiast wykazaliśmy **obniżenie** przez AMN082 liczby komórek glejowych z

apoptotyczną fragmentacją DNA (barwienie Hoechst 33342), a efekt ten był hamowany przez mGluR7 NAM (MMPiP) oraz inhibitory ścieżek MAPK/ERK1/2 oraz PI3-K/Akt [H4]. W celu weryfikacji udziału mGluR7 w ochronie komórek glejowych oraz nerwowych, wykorzystaliśmy hodowle wywodzące się od zwierząt dzikich (WT, ang. *wild type*) oraz zwierząt nokautowych (mGluR7^{-/-}). Wykazaliśmy **większe uszkodzenia** wywołane St oraz Dox w hodowlach **glejowych mGluR7^{-/-}** w porównaniu do WT z **podniesioną podstawową** oraz **stymulowaną aktywnością kaspazy-3** [H4]. Zależności takiej **nie** obserwowaliśmy w **hodowlach neuronalnych (CGC)** w odpowiedzi na różne czynniki pro-apoptotyczne (St, Dox i LP) [H4].



Schemat 2. Podsumowanie mechanizmów neuroprotekcji mediowanych przez agonistę mGluR7, AMN082 w komórkach glejowych.

4.3.2.4 Znaczenie uzyskanych wyników

Uzyskane przez nas wyniki badań z modelu komórek SH-SY5Y **po raz pierwszy** wskazały na jej **użyteczność do badań potencjału ochronnego ligandów mGluR grupy II i III** (w szczególności ligandów mGluR8) w aspekcie modulacji procesów apoptotycznych i nekrotyczno-apoptotycznych wraz z możliwością badania wewnątrzkomórkowych mechanizmów ich działania. W komórkach tych można **zróżnicować działanie** ochronne pomiędzy **ligandami orto- i allosterycznymi mGluRs**, jak również wskazać na **nowe mechanizmy** ich działania ochronnego (np. poprzez hamowanie nekroptozy oraz przeciwdziałanie translokacji AIF). Ze względu na brak w

klinice skutecznych terapii neuroprotekcyjnych, a z drugiej strony możliwość projektowania nowych ligandów mGluRs o lepszym profilu farmakologicznym, **komórki SH-SY5Y** mogą stanowić pierwszą **platformę przesiewową** w kierunku ewaluacji potencjału ochronnego nowych związków działających na tę grupę receptorów oraz do badań innych procesów dotyczących farmakologii mGluR grupy II i III, które pozostają nadal słabo poznane (np. desensytyzacja i internalizacja receptorów, koncepcja „*biased agonism*” i „*residence time*”, tworzenie heterokompleksów). Jednakże, należy zachować **ostrożność przy interpretacji** uzyskanych wyników biorąc pod uwagę **nowotworowy fenotyp komórek SH-SY5Y i zróżnicowaną ekspresję** poszczególnych podtypów mGluR grupy II i III w stosunku do hodowli pierwotnych. W komórkach SH-SY5Y występuje największa ekspresja mGluR8 i brak ekspresji mGluR3, natomiast w hodowlach pierwotnych obserwowana jest wysoka ekspresja mGluR3 i niska ekspresja mGluR8. Pomimo tego, **komórki SH-SY5Y wydają się być bardzo dobrym modelem do badań z endogenną ekspresją mGluRs** i stanowią **alternatywę** do modeli komórkowych z ektopową ekspresją tych receptorów.

Celem naszych badań porównawczych w układach *in vitro* było zaproponowanie **najbardziej skutecznych związków** z obszaru ligandów mGluR grupy II i III, których skuteczność mogłaby być weryfikowana w modelach zwierzęcych chorób neurodegeneracyjnych. O ile z danych uzyskanych w **modelu SH-SY5Y**, ze względu na profil działania oraz wysoką ekspresję mGluR8, można **wytypować mGluR8 PAM** (AZ12216052), to w modelu **hodowli pierwotnych** zadanie to jest bardziej **złożone**. W tych ostatnich efekt ochronny jest zależny od kontekstu (typu komórek, stopnia ich rozwoju, typu uszkodzenia, typu liganda mGluR), co może ograniczać translacyjność wyników tych badań. Pomimo tego, **wykazaliśmy po raz pierwszy istotną rolę stopnia rozwoju komórek nerwowych dla neuroprotekcji** wywołanej przez **agonistów ortosterycznych**, ale nie allosterycznych. Wskazuje to na większą efektywność tych pierwszych w zapobieganiu utraty komórek w chorobach neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem, natomiast ligandy allosteryczne byłyby bardziej przydatne do zapobiegania uszkodzeniom mózgu u młodych osobników (np. urazy mechaniczne mózgu, asfiksja okołoporodowa, ekscytotoksyczność). Z testowanych układów komórkowych hodowli pierwotnych do oceny neuroprotekcijnego potencjału aktywatorów mGluR grupy II i III bardziej przydatne wydają się być **komórki HIP** oraz **CGC**, natomiast w komórkach nerwowych **korowych** łatwiej będzie dywersyfikować udział odpowiedzi **neuronalnej i glejowej**. Wykazany konsekwentnie we wszystkich zastosowanych modelach komórkowych, **brak udziału hamowania aktywności kaspazy-3**, a hamowanie procesów nekrotycznych oraz kaspazo-3

niezależnych, w mechanizmach neuroprotekcji wywołanej aktywatorami mGluR grupy II i III, **wykluczają** ich interferencję z **apoptozą rozwojową** czy **neuroplastycznością neuronalną**, które to procesy są kaspazo-3-zależne. **Brak hamowania** przez te związki neurotoksyczności wywołanej **Dox** w hodowlach pierwotnych neuronalnych przemawia **przeciwko stosowaniu** tych ligandów do łagodzenia **skutków ubocznych chemioterapii (chemobrain)**. Nie jest natomiast określony udział gleju w tym zjawisku, a niektóre ligandy mGluRs (AMN082) wykazują działanie ochronne na uszkodzenia komórek glejowych przez Dox. Nasze badania wykazały po raz pierwszy **pro-życiowy charakter mGluR7 w komórkach glejowych**, co może stanowić istotny element neuroprotekcji agonistów tego receptora w sytuacji *in vivo*.

4.3.3 Rola mGluR8 w komórkach nowotworowych

4.3.3.1 Stan wiedzy

Procesy śmierci komórkowej są intensywnie badane również w obszarze chorób nowotworowych, gdzie ich **specyficzna i wydajna indukcja** (głównie poprzez mechanizmy apoptotyczne) jest **celem skutecznych terapii przeciwnowotworowych**. Na przestrzeni ostatnich 20 lat szereg danych eksperymentalnych oraz obserwacje kliniczne wskazują na udział **Glu** i jego **receptorów (iGluRs i mGluRs)** w procesach **transformacji** oraz **progresji nowotworów** (Willard and Koochekpour, 2013; Yu et al., 2017). Wykazano w licznych liniach komórek nowotworowych oraz w tkance pochodzących od pacjentów onkologicznych **podniesioną ekspresję** różnych typów receptorów glutaminianergicznych, jak również **mutacje somatyczne** w genach dla tych receptorów. **Glu** może być alternatywnym **źródłem energii** dla komórek szybko dzielących się, w tym komórek nowotworowych, a poprzez działanie na określone podtypy **mGluRs** może indukować szlaki przeżyciowe w komórkach nowotworowych (np. **MAPK/ERK1/2** i **PI3-K/Akt**). Jak do tej pory, zaangażowanie **Glu** i jego receptorów został najszerzej przebadany w obszarze **glejaków** (ang. *glioma*), **czerniaka** (ang. *melanoma*), **raka piersi** (ang. *breast cancer*) i **raka prostaty** (ang. *prostate cancer*). Pomimo wielu danych eksperymentalnych wskazujących na **potencjał przeciwnowotworowy antagonistów iGluRs** (MK-801, ketamina, memantyna, GYKI52466, N-BQX2), wywoływane przez nie efekty uboczne ograniczają ich użyteczność kliniczną (*cytacje w pracy H5*). Jedynym związkiem rozpatrywanym w próbach klinicznych jest związek anty-glutaminianergiczny **riluzol**, który wykazuje pewne efekty korzystne w czerniaku (Willard and Koochekpour, 2013). Dlatego też, stopniowo uwaga naukowców została przesunięta na **mGluRs** i zaczęto poszukiwać **potencjalnych leków**

przeciwnowotworowych w tej grupie receptorów. Ze wszystkich podtypów mGluRs, w obszarze nowotworów **najbardziej poznana** do tej pory jest rola **mGluR grupy I** oraz **II**. Wykazano udział promujący mGluR1 i mGluR3 w formowaniu i progresji niektórych nowotworów (glejak, czerniak, rak piersi i rak prostaty), a **antagoniści** tych receptorów (Bay 36-7620, YM 298198, LY341495) wykazali działanie **przeciwnowotworowe** i/lub **uwrażliwiające** na działanie chemoterapeutyków w różnych modelach *in vitro* i *in vivo* (Willard and Koochekpour, 2013). **mGluR grupy III** są **najmniej poznane** w kontekście biologii nowotworów. Istniejące dane eksperymentalne i kliniczne w tym obszarze dotyczą wysokiej ekspresji mGluR4 w rdzeniaku (ang. *medulloblastoma*) i raku jelita grubego (ang. *colorectal carcinoma*). Jednakże **wyniki badań** farmakologiczne z ligandami mGluR III są **sprzeczne**, ponieważ wykazano że mGluR4 PAM, PHCCC hamował wzrost rdzeniaka (Iacovelli et al., 2006), natomiast agonista mGluR III, L-AP4 promował wzrost opornych na 5-fluorouracyl komórek raka jelita grubego (Yoo et al., 2004). Dlatego też, nadal pozostaje **do wyjaśnienia jakie czynniki** determinują odpowiedź **agonistów mGluR III** (typ nowotworu i/lub rodzaj liganda mGluR) w kontekście ich **potencjalnej użyteczności klinicznej**. Ponadto, wykazano zróżnicowaną ekspresję mGluR7 i mGluR8 w komórkach raka prostaty opornych (PC-3) i wrażliwych (LNCaP) na androgeny sugerując udział wzrostu ekspresji mGluR7 i spadku mGluR8 w terapeutycznym działaniu dihydrotestosteronu (DHT) (Pissimissis et al., 2009). Pomimo istniejących danych z analiz WGS (ang. *whole genome sequencing*) i WES (ang. *whole exon sequencing*) wskazujących na podniesioną ekspresję i mutacje somatyczne w obrębie *GRM8* w raku płuca i czerniaku sugerujących ich rolę promującą nowotworzenie, hipoteza ta jak dotąd nie została zweryfikowana funkcjonalnie (Choi et al., 2017; Ding et al., 2014; Kan et al., 2010). Ponieważ nasze badania wykazały **wysoką ekspresję mGluR8** w komórkach nerwiaka zarodkowego **SH-SY5Y**, stymulację ich proliferacji przez mGluR8 PAM oraz osłabianie przez ten związek toksycznego działania staurosporyny oraz doksorubicyny [H1], powstało **pytanie o rolę tego receptora** w tym typie komórek i potencjalną użyteczność kliniczną ligandów tego receptora.

4.3.3.2 Hipotezy badawcze

- I. **mGluR8** pełni rolę **promującą nowotworzenie**, a wyciszenie ekspresji tego receptora w komórkach z endogennie wysoką ekspresją tego receptora będzie hamowało proliferację i migrację komórek oraz uwrażliwiało je na działanie toksyczne chemoterapeutyków.

- II. **Aktywacja mGluR8 będzie osłabiać efektywność chemoterapii, a jego hamowanie uwrażliwi komórki na działanie cytotoksyczne chemoterapeutyków.**

4.3.3.3 Podsumowanie uzyskanych wyników

I. **Badania w komórkach nowotworowych z wyciszoną oraz podwyższoną ekspresją mGluR8 [H5]**

Po zaprojektowaniu i wytworzeniu specyficznych narzędzi molekularnych do wyciszenia (kasety miRNA) oraz nadekspresji (plazmid z *hGRM8*) mGluR8, z komórek z **wysoką endogenną ekspresją mGluR8** (neuroblastoma SH-SY5Y i glioma LN229) wygenerowaliśmy klonów kontrolnych oraz **klony z wyciszoną ekspresją mGluR8**. Natomiast w komórkach z relatywnie **niską ekspresją mGluR8** (glioblastoma U87-MG oraz glioma LN18), wygenerowaliśmy **klony kontrolne oraz z podwyższoną ekspresją GRM8 [H5]**. W takich układach *in vitro* badaliśmy proliferację i migrację komórek oraz ich wrażliwość na klinicznie stosowane leki (doksorubicynę, irinotekan i cisplatynę) oraz eksperymentalne związki (staurosporyna). Otrzymane wyniki okazały się być przeciwne do postawionej hipotezy badawczej. W klonach komórek SH-SY5Y z **wyciszoną ekspresją mGluR8** obserwowaliśmy **zwiększoną proliferację** mierzoną inkorporacją BrdU, bez wpływu na ich migrację (test rysy) w porównaniu do klonów kontrolnych [H5]. Ponadto, komórki te były **bardziej odporne** na cytotoksyczne działanie **staurosporyny, doksorubicyny, irinotekanu i cisplatyny** w porównaniu do klonów kontrolnych, z największymi różnicami w przypadku dwóch ostatnich leków. Chemooporność była mierzona testami biochemicznymi na **żywołność/toksyczność** (test redukcji MTT oraz uwalniania LDH), aktywnością kaspazy-3 oraz liczbą jader nekrotycznych (barwienie jodkiem propidyny). Różnice pomiędzy poszczególnymi fenotypami komórek utrzymywały się nawet po zróżnicowaniu komórek kwasem retinowym (RA), który jest używany klinicznie w końcowych etapach leczenia *neuroblastoma*. Ponadto, w klonach SH-SY5Y z wyciszoną ekspresją obserwowaliśmy **obniżony metabolizm**, spadek poziomu **pro-apoptotycznej kinazy GSK3-β** i **podwyższony poziom cytoplazmatycznej β-kateniny**, elementy które mogą być odpowiedzialne za **zwiększoną proliferację i/lub chemooporność**. Wyniki te zostały częściowo potwierdzone w komórkach glejaka LN229, gdzie w klonach z wyciszoną ekspresją mGluR8 obserwowaliśmy **zwiększoną migrację** oraz **oporność** na toksyczne działanie staurosporyny i irinotekanu [H5]. W klonach komórek glejaka U87-MG z **podwyższoną ekspresją mGluR8** obserwowaliśmy **indukcję apoptozy, zmniejszoną proliferację** oraz **migrację** komórek, oraz **zwiększoną**

wrażliwość na cytotoksyczne działanie **staurosporyny, doksorubicyny** oraz **cisplatyny** [H5]. Efekty zmniejszonej proliferacji oraz zwiększonego uszkodzenia komórek po ekspozycji na staurosporynę potwierdziliśmy w klonach komórek glejaka LN18 z podwyższoną ekspresją *GRM8*.

II. Badania farmakologiczne z ligandami mGluR8 w komórkach SH-SY5Y [H6]

W komórkach SH-SY5Y nieróżnicowanych (UN-SH-SY5Y) wykazaliśmy efekt nasilający proliferację wywołany przez mGluR8 PAM, AZ12216052 [H1] i antagonistę mGluR III, UBP1112, ale nie przez agonistę ortosterycznego mGluR8, (S)-3,4-DCPG [H6]. Ponadto w komórkach UN-SH-SY5Y obserwowaliśmy częściowe osłabienie cytotoksycznych efektów doksorubicyny, irinotekanu oraz cisplatyny zarówno przez mGluR8 PAM, jak i antagonistę mGluR III. Efekt ten został utrzymany po dłuższej inkubacji (48 godz.) tylko dla AZ12216052 w modelu uszkodzeń wywołanych doksorubicyną. Agonista ortosteryczny mGluR8, (S)-3,4-DCPG zmniejszał częściowo uszkodzenia wywołane przez cisplatynę po 24 godz. inkubacji ze związkami zarówno w komórkach UN-, jak i RA-SH-SY5Y. Zarówno mGluR8 PAM jak i agonista ortosteryczny tego receptora zwiększały toksyczność doksorubicyny oraz irinotekanu w komórkach RA-SH-SY5Y po 48 godz. inkubacji ze związkami.

4.3.3.4 Znaczenie uzyskanych wyników

Nasze wyniki z modeli *in vitro* wykazały po raz pierwszy **onkosupresyjny charakter mGluR8** w komórkach nerwiaka zarodkowego oraz glejaka oraz jego zdolność do **uwrażliwiania** komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie różnych **chemoterapeutyków**. Rozszerza to słabo poznany do tej pory obszar dotyczący roli mGluR8 w procesach nowotworowych. Ponieważ otrzymane wyniki, okazały się przeciwstawne do naszych początkowych założeń i przewidywań innych badaczy, kolejne badania nad mGluR8 z wykorzystaniem innego typu komórek nowotworowych z weryfikacją efektów w modelach *in vivo* będą jak najbardziej uzasadnione. Badania farmakologiczne w obrębie komercyjnie dostępnych **ligandów mGluR8 nie dostarczyły** przekonujących wyników o ich potencjale **przeciwnowotworowym**, co raczej wskazuje na zaangażowanie wewnątrzkomórkowych, nie błonowych mGluR8 w mechanizmach ich działania przeciwnowotworowego (hamowaniu proliferacji i migracji komórek, uwrażliwianiu na działanie chemoterapeutyków).

4.3.4 Wnioski końcowe

Cykl 4 prac dotyczących roli mGluR grupy II i III w neuroprotekcji [H1-H4] oraz 2 prac dotyczący roli mGluR8 w komórkach nowotworowych [H5, H6] został połączony wspólnym mianownikiem, a mianowicie udziałem receptorów mGluR grupy II i III w modulacji procesów śmierci komórkowej, której hamowanie jest istotnym elementem działań neuroprotekcyjnych, a indukcja, strategii przeciwnowotworowych. Nasze badania wykazały **potencjał ochronny różnego typu ligandów mGluR grupy II i III** (orto – i allosterycznych) zarówno w komórkach ludzkiego nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y, jak i w hodowlach pierwotnych komórek nerwowych. Efekty te były związane z **hamowaniem** zarówno **procesów apoptotycznych, jak i nekrotycznych**, ale bez wpływu na aktywność kaspazy-3. Postulujemy **udział** w hamowaniu **procesów kaspazo-3 niezależnych, nekroptozy i/lub** aktywację szlaków pro-życiowych (MAPK/ERK1/2 i PI3-K/Akt) w neuroprotekcji wywołanej aktywacją mGluR grupy II i III, aczkolwiek udział tych mechanizmów może być zależny od wielu czynników (typu komórek, stopnia ich rozwoju, obecności komórek glejowych, rodzaju uszkodzenia, typu liganda mGluRs). Dlatego też, konieczne są dalsze badania nad właściwościami ochronnymi nowych ligandów mGluR grupy II i III oraz ich kombinacji z innymi związkami (np. iGluR, innymi GPCR) w celu znalezienia najkorzystniejszych strategii neuroprotekcyjnych w obrębie tej grupy receptorów. W drugiej części dzieła habilitacyjnego pokazaliśmy, że **obecność** w komórkach nowotworowych **mGluR8 jest czynnikiem korzystnym**, gdyż wpływa **hamująco** na ich **proliferaację**, może **indukować apoptozę**, oraz **uwrażliwiać** je na induktory śmierci komórkowej poprzez wpływ na mechanizmy **apoptotyczne i nekrotyczne**. Jednakże, ze względu na ciągle słabo poznaną rolę mGluR8 w biologii nowotworów oraz niespójny obraz działania różnego typu ligandów mGluR8, wykorzystanie tego receptora jako cel terapii wydaje się nadal odległy.

4.3.5 Piśmiennictwo

1. Allen JW, Eldadah BA, Faden AI. Beta-amyloid-induced apoptosis of cerebellar granule cells and cortical neurons: exacerbation by selective inhibition of group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 1999, 38:1243-1252.
2. Allen JW, Knobloch SM, Faden AI. Activation of group I metabotropic glutamate receptors reduces neuronal apoptosis but increases necrotic cell death in vitro. *Cell Death Differ.* 2000, 7:470-476.
3. Berent-Spillson A, Robinson AM, Golovoy D, Slusher B, Rojas C, Russell JW. Protection against glucose-induced neuronal death by NAAG and GCP II inhibition is regulated by mGluR3. *J. Neurochem.* 2004, 89:90-99.
4. Bruno V, Battaglia G, Copani A, Giffard RG, Raciti G, Raffaele R, Shinozaki H, Nicoletti F. Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur J Neurosci.* 1995, 7(9):1906-1913.
5. Bruno V, Battaglia G, Książek I, van der Putten H, Catania MV, Giuffrida R, Lukic S, Leonhardt T, Inderbitzin W, Gasparini F, Kuhn R, Hampson DR, Nicoletti F, Flor PJ. Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci.* 2000, 20(17):6413-6420.

6. Bruno V, Caraci F, Copani A, Matrisciano F, Nicoletti F, Battaglia G. The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: A "dark side" in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 2017, 115:180-192.
7. Bruno V, Sureda FX, Storto M, Casabona G, Caruso A, Knopfel T, Kuhn R, Nicoletti F. The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a glial-neuronal signaling. *J Neurosci.* 1997, 17(6):1891-1897.
8. Caraci F, Battaglia G, Sortino MA, Spampinato S, Molinaro G, Copani A, Nicoletti F, Bruno V. Metabotropic glutamate receptors in neurodegeneration/neuroprotection: still a hot topic? *Neurochem Int.* 2012, 61(4):559-565.
9. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009, 30:127-135.
10. Choi M, Kadara H, Zhang J, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Gaffney SG, Zhao Z, Behrens C, Fujimoto J, Chow C, Kim K, Kalhor N, Moran C, Rimm D, Swisher S, Gibbons DL, Heymach J, Kaftan E, Townsend JP, Lynch TJ, Schlessinger J, Lee J, Lifton RP, Herbst RS, Wistuba II. Mutation profiles in early-stage lung squamous cell carcinoma with clinical follow-up and correlation with markers of immune function. *Ann Oncol.* 2017, 28(1):83-89.
11. Copani A, Bruno V, Battaglia G, Leanza G, Pellitteri R, Russo A, Stanzani S, Nicoletti F. Activation of metabotropic glutamate receptors protects cultured neurons against apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Mol. Pharmacol.* 1995, 47:890-897.
12. Corti C, Battaglia G, Molinaro G, Rizzo B, Pittaluga A, Corsi M, Mugnaini M, Nicoletti F, Bruno V. The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J. Neurosci.* 2007, 27:8297-8308.
13. Degterev A, Linkermann A. Generation of small molecules to interfere with regulated necrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016, 73(11-12):2251-67.
14. Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life.* 2011, 63(4):221-32.
15. Digby GJ, Conn PJ, Lindsley CW. Orthosteric- and allosteric-induced ligand-directed trafficking at GPCRs. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010, 13(5):587-594.
16. Ding L, Kim M, Kanchi KL, Dees ND, Lu C, Griffith M, Fenstermacher D, Sung H, Miller CA, Goetz B, Wendl MC, Griffith O, Cornelius LA, Linette GP, McMichael JF, Sondak VK, Fields RC, Ley TJ, Mulé JJ, Wilson RK, Weber JS. Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One.* 2014, 9(11):e111153.
17. Domin H, Gołembowska K, Jantas D, Kamińska K, Zięba B, Śmiałowska M. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo. *Neurotox Res.* 2014, 26:99-113.
18. Domin H, Jantas D, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of the allosteric agonist of metabotropic glutamate receptor 7 AMN082 on oxygen-glucose deprivation- and kainate-induced neuronal cell death. *Neurochem Int.* 2015, 88:110-123.
19. Domin H, Kajta M, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of MTEP, a selective mGluR5 antagonists and neuropeptide Y on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. *Pharmacol Rep.* 2006, 58(6):846-58.
20. Domin H, Przykaza Ł, Jantas D, Kozniwska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I in animal models of ischemic stroke: In vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology* 2016, 102:276-294.
21. Domin H, Zięba B, Gołembowska K, Kowalska M, Dziubina A, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of mGluR5 antagonist MTEP: effects on kainate-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Pharmacol Rep.* 2010, 62(6):1051-61.
22. Durand D, Caruso C, Carniglia L, Lasaga M. Metabotropic glutamate receptor 3 activation prevents nitric oxide-induced death in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 2010, 112:420-433.
23. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018, 25(3):486-541.
24. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012, 19(1):107-20.
25. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015, 7(12).
26. Iacovelli L, Arcella A, Battaglia G, Pazzaglia S, Aronica E, Spinsanti P, Caruso A, De Smaele E, Saran A, Gulino A, D'Onofrio M, Giangaspero F, Nicoletti F. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas. *J. Neurosci.* 2006, 26:8388-8397.
27. Jantas D, Lasoń W. Anti-apoptotic effect of memantine against staurosporine- and low-potassium-induced cell death in cerebellar granule cells: a development dependent effect. *Pharmacol. Rep.* 2009b, 61:827-837.

28. Jantas D, Lason W. Protective effect of memantine against Doxorubicin toxicity in primary neuronal cell cultures: influence a development stage. *Neurotox Res.* 2009a, 15:24-37.
29. Jantas D, Pytel M, Mozrzymas JW, Leskiewicz M, Regulska M, Antkiewicz-Michaluk L, Lason W. The attenuating effect of memantine on staurosporine-, salsolinol- and doxorubicin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 2008, 52:864-877.
30. Jantas D, Szymanska M, Budziszewska B, Lason W. An involvement of BDNF and PI3-K/Akt in the anti-apoptotic effect of memantine on staurosporine-evoked cell death in primary cortical neurons. *Apoptosis* 2009, 14:900-912.
31. Jantas-Skotniczna D, Kajta M, Lason W. Memantine attenuates staurosporine-induced activation of caspase-3 and LDH release in mouse primary neuronal cultures. *Brain Research* 2006, 1069:145-153.
32. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, Moorhead M, Chaudhuri S, Tomsho LP, Peters BA, Pujara K, Cordes S, Davis DP, Carlton VE, Yuan W, Li L, Wang W, Eigenbrot C, Kaminker JS, Eberhard DA, Waring P, Schuster SC, Modrusan Z, Zhang Z, Stokoe D, de Sauvage FJ, Faham M, Seshagiri S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature.* 2010, 466(7308):869-873.
33. Lopes FM, Schröder R, da Frota Jr ML, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczynski F, Moreira JC, Fernandes Mda, C, Klamt F. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 2010, 1337: 85-94.
34. Maiese K, Vincent A, Lin SH, Shaw T. Group I and group III metabotropic glutamate receptor subtypes provide enhanced neuroprotection. *J. Neurosci. Res.* 2000, 62:257-272.
35. Masilamoni GJ, Smith Y. Metabotropic glutamate receptors: targets for neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2018, 38:72-80.
36. Miloso M, Villa D, Crimi M, Galbiati S, Donzelli E, Nicolini G, Tredici G. Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J. Neurosci. Res.* 2004, 75:241-252.
37. Moyanova SG, Mastroiacovo F, Kortenska LV, Mitreva RG, Fardone E, Santolini I, Sobrado M, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Ngomba RT. Protective role for type 4 metabotropic glutamate receptors against ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2011, 31:1107-1118.
38. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 2011, 60:1017-1041.
39. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 50:295-322.
40. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2011, 119(1):3-19.
41. Pinteaux-Jones F, Sevastou IG, Fry VA, Heales S, Baker D, Pocock JM. Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 2008, 106:442-454.
42. Pissimissis N, Papageorgiou E, Lembessis P, Armakolas A, Koutsilieris M. The glutamatergic system expression in human PC-3 and LNCaP prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 2009, 29(1):371-377.
43. Presgraves SP, Tariq A, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SHSY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.* 2004, 5:579-598.
44. Reiner A, Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 2018, 98(6):1080-1098.
45. Śmiałowska M, Gołębiewska K, Kajta M, Zięba B, Dziubina A, Domin H. Selective mGluR1 antagonist EMQMCM inhibits the kainate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures and in the rat hippocampus. *Neurotox Res.* 2012, 21(4):379-92.
46. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* 2012, 19(1):75-86.
47. Vincent AM, Ten Broeke M, Maiese K. Metabotropic glutamate receptors prevent programmed cell death through the modulation of neuronal endonuclease activity and intracellular pH. *Exp. Neurol.* 1999, 155:79-94.
48. Willard SS, Koochekpour S. Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications. *Int. J. Biol. Sci.* 2013, 9:728-742.
49. Yoo BC, Jeon E, Hong SH, Shin YK, Chang HJ, Park JG. Metabotropic glutamate receptor 4-mediated 5-fluorouracil resistance in a human colon cancer cell line. *Clin. Canc. Res.* 2004, 10:4176-4184.
50. Yu LJ, Wall BA, Wangari-Talbot J, Chen S. Metabotropic glutamate receptors in cancer. *Neuropharmacology* 2017, 115:193-202.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

Ścieżkę naukowo-badawczą w obszarze neurobiologii i neurofarmakologii rozpoczęłam w roku 2003, 4 lata po zakończeniu studiów magisterskich na kierunku biologia (Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ), kiedy to w Instytucie Farmakologii PAN został otwarty nabór na Studia Doktoranckie. Pracę doktorską wykonywałam w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej (do roku 2005 Zakład Endokrynologii) pod opieką naukową Prof. dr hab. Władysława Lasonia. Przedmiotem mojej pracy doktorskiej było badanie wpływu antagonisty receptora NMDA, memantyny na procesy neuronalnej apoptozy w modelach komórkowych (pierwotne hodowle neuronalne oraz komórki SH-SY5Y). Badania te były realizowane w ramach działalności statutowej oraz przygotowanego przeze mnie grantu promotorskiego ("Wpływ memantyny na procesy śmierci komórek nerwowych indukowanych poprzez zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy"; 2006-2008; grant KBN promotorski nr N401 08131/1874), w którym pełniłam funkcję Głównego wykonawcy. W ramach realizacji tej tematyki wykazałam: wpływ stopnia rozwoju komórek nerwowych oraz rejonu pochodzenia komórek na efekty ochronne memantyny w modelu apoptozy mitochondrialnej (St, LP i zewnątrzkomórkowej (Dox); rolę BDNF oraz ścieżki PI3-K/Akt w efektach neuroprotekcyjnych memantyny oraz użyteczność komórek SH-SY5Y do badania potencjału neuroprotekcijnego tego związku. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 5 pracach oryginalnych – 2 przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych i 3 po jego otrzymaniu:

- **Jantas-Skotniczna D***, Kajta M, Lason W. Memantine attenuates staurosporine-induced activation of caspase-3 and LDH release in mouse primary neuronal cultures. *Brain Research* 2006, 1069:145-153.
- **Jantas D***, Pytel M, Mozrzydas JW, Leskiewicz M, Regulska M, Antkiewicz-Michaluk L, Lason W. The attenuating effect of memantine on staurosporine-, salsolinol- and doxorubicin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 2008, 52:864-877.
- **Jantas D***, Lason W. Protective effect of memantine against Doxorubicin toxicity in primary neuronal cell cultures: influence a development stage. *Neurotox Res.* 2009, 15:24-37.
- **Jantas D***, Szymanska M, Budziszewska B, Lason W. An involvement of BDNF and PI3-K/Akt in the anti-apoptotic effect of memantine on staurosporine-evoked cell death in primary cortical neurons. *Apoptosis* 2009, 14:900-912.
- **Jantas D***, Lason W. Anti-apoptotic effect of memantine against staurosporine- and low-potassium-induced cell death in cerebellar granule cells: a development dependent effect. *Pharmacol. Rep.* 2009, 61:827-837.

Ponadto w czasie realizacji badań nad memantyną, w podobnych modelach doświadczalnych określiłam zróżnicowaną, zależną od stopnia rozwoju komórek, rolę NMDA

w modelach apoptozy neuronalnej (St i LP) i różnymi mechanizmami w nie zaangażowanych. Efekty te były związane z hamowaniem translokacji AIF, ale nie aktywności kaspazy-3 oraz były zależne od rodzaju uszkodzenia komórek (w modelu St – udział aktywacji MAPK/ERK1/2; w modelu LP – rola kanału NMDA). Rezultatem tych badań była praca opublikowana po otrzymaniu stopnia doktora:

- **Jantas D***, Lason W. Different mechanisms of NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: a stimuli-dependent effect. *Neurochem Res.* 2009, 34:2040-2054.

W trakcie studiów doktoranckich byłam również zaangażowana w realizację:

- grantu KBN nr 2 P05A 07927 „Wpływ neurosteroidów na procesy apoptotyczne w ludzkich komórkach neuronalnie zróżnicowanych - wewnątrzkomórkowe mechanizmy działania”(2004-2007; kierownik dr Monika Leśkiewicz; wykonawca nieformalny). W projekcie tym badaliśmy potencjał ochronny 4 neurosteroidów (DHEA, DHEAS, pregnenolon, allopregnanolon) wraz z mechanizmami działania w różnych modelach uszkodzeń (apoptotycznych i ekscytotoksycznych) w komórkach SH-SY5Y (nieróżnicowanych i neuronalnie zróżnicowanych) i hodowlach pierwotnych neuronów. Rezultatem mojego zaangażowania w ten projekt jest współautorstwo w 3 publikacjach:
 - Leśkiewicz M, Regulska M, Budziszewska B, **Jantas D**, Jaworska-Feil L, Basta-Kaim A, Kubera M, Jagla G, Nowak W, Lason W. Effects of neurosteroids on hydrogen peroxide- and staurosporine-induced damage of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 2008, 86:1361-1370.
 - Leśkiewicz M, **Jantas D***, Budziszewska B, Lason W. Excitatory neurosteroids attenuate apoptotic and excitotoxic cell death in primary cortical neurons. *J Physiol Pharmacol.* 2008, 59:457-475.
 - Leśkiewicz M, Regulska M, Budziszewska B, Jantas D, Jaworska-Feil L, Basta-Kaim A, Kubera M, Lason W. Neurosteroids enhance the viability of staurosporine and doxorubicin treated differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep.* 2008, 60:685-691.
- badań sieciowych „Poszukiwanie wewnątrzustrojowych punktów uchwytu potencjalnych leków neurotropowych” (2006-2008; projekt badań sieciowych IF PAN - Polish MNSW Scientific Network Project; zespół Prof. Lasonia; wykonawca). Badania te dotyczyły określenia potencjału ochronnego kalcitriolu (aktywnej formy witaminy D3) podawanej po indukcji uszkodzenia w modelach *in vitro* i *in vivo* (współpraca z Zakładem Neurochemii, IMDiK PAN, Warszawa). Druga część badań w których brałam udział to poszukiwanie związków ochronnych do przeciwdziałania uszkodzeniom komórek nerwowych wywołanym zahamowaniem funkcji proteasomu w modelach komórkowych oraz zwierzęcych (współpraca z Zakładem Neuropsychofarmakologii, IF PAN). Rezultaty tych badań zostały opublikowane w 4 pracach w latach 2009-2014:

- Kajta M, Makarewicz D, Ziemińska E, **Jantas D**, Domin H, Lasoń W, Kutner A, Łazarewicz JW. Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult in vivo and in vitro. *Neurochem Int.* 2009, 55:265-274.
- **Jantas D***, Lorenc-Koci E, Kubera M, Lason W. Neuroprotective effects of MAPK/ERK1/2 and calpain inhibitors on lactacystin-induced cell damage in primary cortical neurons. *Neurotoxicology* 2011, 32:845-856.
- **Jantas D***, Roman A, Kuśmierczyk J, Lorenc-Koci E, Konieczny J, Lenda T, Lasoń W. The extent of neurodegeneration and neuroprotection in two chemical in vitro models related to Parkinson's disease is critically dependent on cell culture conditions. *Neurotox Res.* 2013, 24:41-54.
- Konieczny J, **Jantas D**, Lenda T, Domin H, Czarnecka A, Kuter K, Śmiałowska M, Lasoń W, Lorenc-Koci E. Lack of neuroprotective effect of celastrol under conditions of proteasome inhibition by lactacystin in in vitro and in vivo studies: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2014, 26:255-273.

Ponadto, w okresie doktoratu brałam udział w przygotowaniu 1 pracy przeglądowej oraz byłam autorką 2 artykułów popularnonaukowych w języku polskim:

- **Jantas-Skotniczna D***, Kajta M, Lasoń W. New targets for putative neuroprotective agents. *Acta Pol Pharm.* 2006, 63:359-368. Review.
- **Jantas-Skotniczna D***. ALS – cichy zabójca (Nasze szanse w walce ze stwardnieniem bocznym zanikowym). [ALS – the silent killer (Our chances to combat Amyotrophic Lateral Sclerosis)]. *Wszecławiat*, 2006; 107: 31-33. Review. Polish.
- **Jantas-Skotniczna D***. Estrogeny – nie tylko hormony płciowe (Rola estrogenów w Ośrodkowym Układzie Nerwowym). [Estrogens – not only sexual hormones (The role of estrogens In Central Nervous System)]. *Wszecławiat*, 2004; 105: 191-194. Review. Polish.

5.2 Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Oprócz realizacji dwóch projektów badawczych (Grant KBN Nr NN405611638 i grant NCN OPUS 3 Nr 2012/05/B/NZ3/00452), w których pełniłam funkcję Kierownika projektów, a rezultatem których jest cykl 6 prac stanowiący dzieło habilitacyjne (opisany w punkcie 4), w okresie po otrzymaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam formalnie zaangażowana w realizację 4 grantów badawczych oraz prowadziłam działalność badawczą w ramach działalności statutowej i współpracy nieformalnej.

Pierwszym grantem po doktoracie, w którym byłam zaangażowana w wykonywanie doświadczeń (szczególnie w modelu hodowli neuronalnych), a również w przygotowanie publikacji był Grant KBN nr 3 P05A 155 30 „Wpływ TRH na uszkodzenia apoptotyczne i nekrotyczne neuronów *in vitro* - wewnątrzkomórkowe mechanizmy działania” (2007-2009; kierownik – dr Lucylla Jaworska-Feil; wykonawca). Badania dotyczyły określenia potencjału ochronnego TRH oraz jego 3 analogów w modelach apoptotycznych (St), ekscytotoksycznych (Glu, NMDA, KA, AMPA) i nekrotycznych (H₂O₂) w komórkach SH-

SY5Y lub hodowlach pierwotnych neuronów wraz z badaniem mechanizmów neuroprotekcji. W wyniku realizacji tych badań powstały 2 prace oryginalne oraz przygotowałam 3 prace przeglądowe (2 w języku polskim i 1 w języku angielskim):

- **Jantas D***, Jaworska-Feil L, Lipkowski AW, Lason W. Effects of TRH and its analogues on primary cortical neuronal cell damage induced by various excitotoxic, necrotic and apoptotic agents. *Neuropeptides* 2009, 43:371-385.
- Jaworska-Feil L, **Jantas D***, Leskiewicz M, Budziszewska B, Kubera M, Basta-Kaim A, Lipkowski AW, Lason W. Protective effects of TRH and its analogues against various cytotoxic agents in retinoic acid (RA)-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuropeptides* 2010, 44:495-508.
- **Jantas D***. Tyreoliberyna (TRH)- neuropeptyd regulujący homeostazę w Ośrodkowym Układzie Nerwowym. *Postępy Biologii Komórki*, tom 36 2009 nr 3: 483-496.
- **Jantas D***. Thyreoliberin (TRH) – the regulatory neuropeptide of CNS homeostasis. *Advances in Cell Biology* 2010, 2:138-152.
- **Jantas D***. [Therapeutic potential of thyreoliberin (TRH) and its analogues as antiepileptic and neuroprotective drugs]. *Przegl Lek.* 2010, 67:1179-1185. Review. Polish.

Kolejnym projektem badawczym, w którym brałam udział, była współpraca z Zakładem Neurobiologii IF PAN w ramach realizacji Grantu KBN nr N N401 09103 "**Badania neuroprotekcijnego działania pochodnych neuropeptydu Y, pobudzających receptory Y2 i Y5 oraz agonistów receptorów glutaminianergicznych metabotropowych grupy III, w eksperymentalnej ischemii *in vitro* i *in vivo***" (2009-2012; kierownik – Prof. Maria Śmiałowska; wykonawca). W projekcie tym uczestniczyłam w wykonywaniu doświadczeń w modelach *in vitro* wraz z ustawieniem do badań modelu OGD (ang. *oxygen-glucose deprivation*) oraz w przygotowaniu opisu tej części badań do publikacji. Rezultatem tej współpracy jest moje współautorstwo w 4 pracach:

- Domin H, Gołombiowska K, **Jantas D**, Kamińska K, Zięba B, Śmiałowska M. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo. *Neurotox Res.* 2014, 26:99-113.
- Domin H, **Jantas D**, Śmiałowska M. Neuroprotective effects of the allosteric agonist of metabotropic glutamate receptor 7 AMN082 on oxygen-glucose deprivation- and kainate-induced neuronal cell death. *Neurochem Int.* 2015, 88:110-123.
- Domin H, Przykaza Ł, **Jantas D**, Kozniewska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I in animal models of ischemic stroke: In vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology* 2016, 102:276-294.
- Domin H, Przykaza Ł, **Jantas D**, Kozniewska E, Boguszewski PM, Śmiałowska M. Neuropeptide Y Y2 and Y5 receptors as promising targets for neuroprotection in primary neurons exposed to oxygen-glucose deprivation and in transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* 2017, 344:305-325.

Kolejnym obszarem badawczym w który byłam zaangażowana przez wiele lat była tematyka interdyscyplinarna dotycząca **tworzenia nanocząstek jako nośników dla leków**

neuroprotektoryjnych realizowana we współpracy z Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. Współpraca ta rozpoczęła się w roku 2010 od Studiów Interdyscyplinarnych MOL-MED „Nauki molekularne dla medycyny” w ramach których mgr inż. Marek Piotrowski wykonywał swoje badania doktorskie w tej tematyce w dwóch ośrodkach: Instytucie Katalizy oraz w Instytucie Farmakologii PAN pod opieką naukową Prof. dr hab. Piotra Warszyńskiego oraz Prof. dr hab. Władysława Lasonia. Badania te początkowo były finansowane przez projekt MolMed oraz NCN PRELUDIUM 2 (Grant no. DEC-2011/03/N/ST5/04808; 2012-2014; „Synteza biozgodnych nanonośników dla wybranych substancji neuroprotektoryjnych” kierownik mgr inż. Marek Piotrowski), a następnie rozszerzone badaniami wieloośrodkowymi (Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN; Instytut Farmakologii PAN; Wydział Biofizyki i Biochemii Uniwersytetu Jagiellońskiego; firma SINTEF, Norwegia; Uniwersytet Medyczny w Oslo, Norwegia) w ramach **grantu polsko-norweskiego NanoNeucar „Nanoparticulate delivery systems for therapies against neurodegenerative diseases”** (No Pol-Nor/199523/64/2013; 2013-2016; kierownik – Prof. dr hab. Piotr Warszyński; zespół WP4 Prof. W Lason: „**Estimation of nanoparticulate delivery system in efficacy of putative neuroprotectants in *in-vitro* models**”; wykonawca). W okresie tym byłam opiekunem nieformalnym części biologicznej badań mgr inż. Marka Piotrowskiego, a w ramach realizacji projektu NanoNeucar osobą koordynującą badania *in vitro* z użyciem komórek SH-SY5Y. Rezultatem tej współpracy było moje współautorstwo w 6 pracach oryginalnych wykazujących potencjał nanocząstek polimerowych jako nośników leków dla inhibitorów wewnątrzkomórkowych mechanizmów śmierci komórkowej (inhibitora kalpain MDL28170, kwasu undecylenowego, kurkuminy czy cyklosporyny A) wraz z autorskim rozpracowaniem neuroprotektoryjnych mechanizmów wywołanych podaniem kwasu undecylenowego (hamowanie aktywności kalpain; aktywacja PI3-K/Akt; hamowanie translokacji AIF):

- Piotrowski M, Szczepanowicz K, **Jantas D**, Leśkiewicz M, Lason W, Warszyński P. Emulsion-core and polyelectrolyte-shell nanocapsules: biocompatibility and neuroprotection against SH-SY5Y cells. *J. Nanopart. Res.* 2013, 15:2035.
- **Jantas D***, Piotrowski M, Lason W. An Involvement of PI3-K/Akt Activation and Inhibition of AIF Translocation in Neuroprotective Effects of Undecylenic Acid (UDA) Against Pro-Apoptotic Factors-Induced Cell Death in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *J Cell Biochem.* 2015, 116:2882-2895.
- Piotrowski M, **Jantas D**, Szczepanowicz K, Łukasiewicz S, Lason W, Warszyński P. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing undecylenic acid: Synthesis, biocompatibility and neuroprotective properties. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015, 135:8-17.

- Szczepanowicz K, **Jantas D**, Piotrowski M, Staroń J, Leśkiewicz M, Regulska M, Lason W, Warszyński P. Encapsulation of curcumin in polyelectrolyte nanocapsules and their neuroprotective activity. *Nanotechnology* 2016, 27:355101.
- Szczęch M, Szczepanowicz K, **Jantas D**, Piotrowski M, Kida A, Lason W, Warszyński P. Neuroprotective action of undecylenic acid (UDA) encapsulated into PCLNanocarriers. *Colloids and Surfaces A* 2017, 532:41–47.
- Piotrowski M[#], **Jantas D**^{*,#}, Leśkiewicz M, Szczepanowicz K, Warszyński P, Lason W. Polyelectrolyte-coated nanocapsules containing cyclosporine A protect neuronal-like cells against oxidative stress-induced cell damage. *Colloids and Surfaces A* 2018, 555:264–269.

Kolejnym projektem interdyscyplinarnym, w którym brałam udział i wykonałam wszystkie badania części biologicznej oraz przygotowałam jej opis do publikacji był projekt SONATA 6 UMO-2013/11/D/ST8/03272 „**Warstwy z nanomateriałów węglowych na powierzchni metalu jako potencjalne układy do regeneracji i stymulacji komórek układu nerwowego**” (2014-2017; kierownik dr. hab. Aneta Frączek-Szczypta; wykonawca) prowadzony w ramach współpracy w Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedrą Biomateriałów i Kompozytów, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. W ramach tego projektu z użyciem komórek SH-SY5Y oraz hodowli pierwotnych neuronalnych i wykorzystaniem metod obrazowania przyżyciowego oraz testów biochemicznych zostały wytypowane najkorzystniejsze materiały w kierunku ich potencjału neuroregeneracyjnego. Wyniki tych badań zawarte są w 1 pracy opublikowanej i jednej będącej w przygotowaniu:

- Frączek-Szczypta A, **Jantas D**, Ciepela F, Grzonka J, Bernasik A, Marzec M. Carbon nanomaterials coatings – Properties and influence on nerve cells response. *Diamond & Related Materials* 2018, 84:127–140.

Dodatkowo, w ramach działalności statutowej na przestrzeni lat 2009-2014 prowadziłam badania eksperymentalne nad **wpływem** różnego typu **leków przeciwdepresyjnych na procesy apoptozy neuronalnej** w hodowlach pierwotnych neuronalnych i glejowych oraz w komórkach SH-SY5Y oraz uczestniczyłam w badaniach efektów leków przeciwdepresyjnych na zahamowanie proliferacji komórek indukowane deksametazonem. Rezultaty tych badań zostały opublikowane w pracach:

- **Jantas D**^{*}, Krawczyk S, Lason W. The predominant protective effect of tianeptine over other antidepressants in models of neuronal apoptosis: the effect blocked by inhibitors of MAPK/ERK1/2 and PI3-K/Akt pathways. *Neurotox Res.* 2014, 25:208-225.
- Leśkiewicz M, **Jantas D**^{*}, Regulska M, Kaczanowska J, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Kubera M, Lason W. Antidepressants attenuate the dexamethasone-induced decrease in viability and proliferation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells: a involvement of extracellular regulated kinase (ERK1/2). *Neurochem Int.*, 2013, 63:354-362.

W latach 2013-2017, również w ramach działalności statutowej, uczestniczyłam w badaniach nad **rolą kinazy ATM w procesach neurodegeneracyjnych w modelach komórkowych**, które były przedmiotem pracy doktorskiej mgr Jakuba Chwastka. W badaniach tych pełniłam również funkcję opiekuna naukowego oraz promotora pomocniczego przewodu doktorskiego Jakuba Chwastka. Rezultatem tych badań było wykazanie udziału mechanizmów nie związanych z jądrową funkcją ATM (hamowanie aktywności kalpain oraz katepsyny D) w neuroprotekcji inhibitora tej kinazy, KU-55933 w modelu stresu oksydacyjnego. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 1 pracy oryginalnej oraz 1 pracy przeglądowej:

- Chwastek J, **Jantas D***, Lasoń W. The ATM kinase inhibitor KU-55933 provides neuroprotection against hydrogen peroxide-induced cell damage via a γ H2AX/p-p53/caspase-3-independent mechanism: Inhibition of calpain and cathepsin D. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017, 87:38-53.
- Chwastek J, **Jantas D**, Lasoń W. [The role of ATM kinase in neurodegeneration]. *Postępy Biochem.* 2014, 60:313-322. Review. Polish.

W okresie po osiągnięciu stopnia doktora nauk medycznych (2009-2018) byłam w mniejszym zakresie zaangażowana również w inne projekty badawcze realizowane w IF PAN, w których przygotowywałam materiał do badań (hodowle neuronalne) i wynikiem których jest moje współautorstwo w publikacjach:

- Piechota M, Golda S, Ficek J, **Jantas D**, Przewlocki R, Korostynski M. Regulation of alternative gene transcription in the striatum in response to antidepressant drugs. *Neuropharmacology* 2015, 99:328-336.
- Piechota M, Korostynski M, Golda S, Ficek J, **Jantas D**, Barbara Z, Przewlocki R. Transcriptional signatures of steroid hormones in the striatal neurons and astrocytes. *BMC Neurosci.* 2017, 18:37.

oraz byłam współautorem 2 kolejnych prac przeglądowych w języku polskim dotyczących strategii neuroprotekcyjnych oraz 1 rozdziału w podręczniku międzynarodowym dotyczącym modeli komórkowych używanych w badaniach doświadczanych nad depresją:

- Lasoń W., **Jantas D**. Rola epigenetyki w mechanizmach i leczeniu padaczki (The role of epigenetics in pathomechanisms and epilepsy treatment). Article In Polish. *Epileptologia* 2009, 17:113-122.
- Gręda A., **Jantas D***. Dysfunkcje mitochondriów w chorobach neurodegeneracyjnych: potencjalny punkt uchwytu dla leków neuroprotekcyjnych. *Postępy Biologii Komórki* 2012, 39:321-344.

- **Jantas D.** Cell-Based Systems of Depression: An Overview. In: *Herbal Medicine in Depression*. Ed. Clara Grosso. Springer, Switzerland 2016, p. 75-117. DOI 10.1007/978-3-319-14021-6.

5.3 Inne osiągnięcia:

- współautor 91 doniesień zjazdowych: w tym 83 międzynarodowych i 8 krajowych; w tym 9 jako autor prezentujący w formie ustnej (5 prezentacji w języku angielskim oraz 4 w języku polskim) oraz 32 jako autor prezentujący w formie plakatowej.
- otrzymane nagrody za działalność naukową: 12 grantów wyjazdowych otrzymanych w latach 2006-2017 w związku z uczestnictwem w konferencjach naukowych, szkołach letnich i szkoleniach specjalistycznych; w latach 2014-2017 nagrody IFPAN QUALITAS (2 prace) oraz QUANTITAS (5 prac); nagroda dla młodych naukowców podczas Neuropeptides Festival 2009 (Salzburg, Austria);
- organizacja sesji naukowej podczas XII zjazdu PTBUN (6-8.09.20015, Gdańsk);
- członek rady redakcyjnej *Neurotoxicity Reserach* i *Neurochemical Research* oraz redaktor tematyczny *Pharmacological Reports*;
- członek zwyczajny Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PTBUN) oraz *European Collage of Neuropsychopharmacology* (ECNP);
- przedstawiciel innych pracowników naukowych zatrudnionych w IF PAN w Radzie Naukowej IF PAN w latach 2011-2014 i 2015-2018;
- wygłoszenie 2 wykładów monograficznych w IF PAN (2013 i 2018 rok); 6 referatów na zebraniach naukowych IF PAN (w latach 2006-2016) oraz wykładu dla doktorantów IMDiK PAN (2012 rok);
- promotor pomocniczy jednego przewodu doktorskiego oraz opiekun nieformalny doktoratu w ramach projektu MOL-MED;
- promotor dwóch prac magisterskich (Neurobiologia UJ i Biotechnologia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie) oraz 1 pracy licencjackiej (Neurobiologia UJ);
- opieka naukowa nad praktykami studenckimi (6), stażami naukowymi (1) wolontariatem (5) w latach 2009-2017;
- odbycie ośmiu krótkoterminowych wyjazdów zagranicznych naukowo-badawczych i szkoleniowych w latach 2006-2017;
- członek Zespołu Ekspertów NCN w konkursie 19 (OPUS, SONATA, PRELUDIUM), 20 (ETIUDA, FUGA) oraz 21 (OPUS, SONATA, PRELUDIUM) oraz recenzent NCN (MINIATURA 1 i MINIATURA 2);

- recenzent projektu badawczego Grantová agentura České republiky Czech Science Foundation (2009 rok);
- wykonanie 146 recenzji publikacji (*peer-review*) w 49 czasopismach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym (w latach 2004-2018);
- koordynator zebrań naukowych IF PAN (od 09/2017).

5.4 Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego

	Prace oryginalne z IF	Prace poglądowe z IF	Prace poglądowe bez IF	Prace popularno-naukowe	Rozdziały w książkach	IF	KBN/MNiSW
Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora	6	0	1	2	0	15,743	120
Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora	34	1	5	0	1	113,664	1017
Sumarycznie	40	1	6	2	1	129,407	1137

Łączna liczba cytowań z autocytowaniami = **504** (wg Web of Science z dnia 17.09.2018)

Łączna liczba cytowań bez autocytowań = **375** (wg Web of Science z dnia 17.09.2018)

Indeks Hirscha = **14** (wg Web of Science z dnia 17.09.2018)

13.11.2018 *Djantas*