

## **Załącznik 3**

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć  
naukowych**

## 1. Imię i nazwisko Maciej Maurycy Łałowski

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.

**Tytuł docenta biochemii medycznej (Docentship in medical biochemistry)-**  
16.11.2011- Wydział medyczny, Uniwersytet w Helsinkach, Helsinki- Finlandia.

**Dr nauk biologicznych-** 11.12.1997, Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Charakterystyka składu peptydów amyloidu  $\beta$  i czynników towarzyszących w złożach amyloidu w mózgu starczym i chorobie Alzheimer'a". Promotor rozprawy doktorskiej: Prof. Joanna Strosznajder. Recenzenci: Prof. Paweł P. Liberski, Prof. Ryszard Przewłocki.

**Magister biologii-** 10.12.1991, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, kierunek- biologia molekularna. Tytuł pracy magisterskiej: "*Przemieszczanie się 3-<sup>3</sup>H]-oleanolowego do ścian komórkowych w liściach nagietka, jego zmiany i lokalizacja produktów w protoplazmie, ścianie komórkowej i przestrzeni pozakomórkowej*" (studia ukończone z wynikiem bardzo dobrym).

**1991-1992:** Studia podyplomowe, Wydział Geografii- Instytut Krajów Rozwijających się, Uniwersytet Warszawski (ukończone z wynikiem bardzo dobrym)

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

**3.08.2020- obecnie** Adiunkt

Instytut Chemii Biorganicznej Polskiej Akademii Nauk  
Zakład Proteomiki Biomedycznej  
ul. Noskowskiego 12/14, Poznań, Polska

**1.08.2016- obecnie:** University researcher and senior scientist  
Principal Investigator at the Faculty of Medicine, od 01.10. 2019.

HiLIFE, Meilahti Clinical Proteomics Core Facility  
Medicum – Biochemistry and Developmental Biology  
Medical Faculty – University of Helsinki  
Biomedicum Helsinki  
PO Box 63 (Haartmaninkatu 8), Room C214a  
FI-00014 University of Helsinki, Finland  
<https://researchportal.helsinki.fi/en/persons/maciej-lalowski>

**1.01.2015- 31.12.2015:** Pełniący obowiązki dyrektora Meilahti Clinical Proteomics Core Facility, Biomedicum Helsinki w zastępstwie za dyrektora placówki, docenta Marca Baumanna.

**1.06.2012- 31.12.2014:** Senior scientist, Folkhälsan Institute of Genetics, DEM-Child EU FP7 project  
Dyrektor Instytutu: Anna-Elina Lehesjoki MD PhD, Professor

**1.09.2008 – 31.05.2012:** Senior scientist, University of Helsinki, Dept. of Anatomy, Institute of Biomedicine, Meilahti Clinical Proteomics Core Facility

**1.11.2005- 31.07.2008:** Project leader

Max Delbrück for Molecular Medicine, Department of Neuroproteomics, Berlin, Germany  
Kierownik wydziału: Erich E. Wanker, PhD, Professor

**1.02.2002- 31.10.2005:** Postdoc (Postdoctoral research associate)

Max Planck Institute of Genetics and Max Delbrück for Molecular Medicine, Department of Neuroproteomics, Berlin, Germany

Kierownik wydziału: Erich E. Wanker, PhD, Professor

**15.03.1998- 31.01.2002:** Postdoc (Postdoctoral research associate)

University of Helsinki, Biomedicum Helsinki,  
Neuroscience Program and Department of Pathology, Haartman Institute, Finland

Kierownik laboratorium: Olli Carpén, MD PhD, Professor

**1.03.1998- 31.12.1999:** Adiunkt

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk; Warszawa, Polska

Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder

**1.09.1996- 28.02.1999:** Asystent

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk; Warszawa, Polska

Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder

**1.03.1992- 1.09.1996:** Asystent

Pracownia Komórkowej Transdukcji Sygnału w Zakładzie Neurochemii,  
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk; Warszawa, Polska

Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. Jerzy Łazarewicz

Kierownik Pracowni: Prof. dr hab. Joanna B. Strosznajder

**1.09.1992- 31.12.1996:** Assistant research scientist

Department of Pathology, New York Medical Center, New York, USA

(w trakcie wykonywania pracy doktorskiej)

Kierownik laboratorium: Blas Frangione, MD PhD, Professor

#### **4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w artykule 219 ustawy 1, punkt 2 ustawy.**

##### **a) Tytuł osiągnięcia habilitacyjnego**

**Analiza interakcji białkowych oraz zaburzonych ścieżek sygnałowych w patologii neuronalnych ceroidolipofuscynoz**

## b) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

- 1) Stelzl U, Worm U, **Lalowski M**, Hänig C, Brembeck FH, Göhler H, Strödicke M, Zenkner M, Schönherr A, Köppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham A, Bock N, Kietzmann S, Gödde A, Toksöz E, Dröge A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE<sup>#</sup>. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 2005, 122; 957-68. **IF<sub>2004</sub> 29.389**, **MNiSW<sub>2005</sub> 24** punkty / **MNiSW<sub>2019</sub> 200** punktów. **WoS 1603** cytowania.
- 2) Koch S\*, Scifo E\*, Rokka A, Lindfors M, Korhonen R, Corthals G, Virtanen I, **Lalowski M<sup>#</sup>**, Tyynelä J<sup>#</sup>. Cathepsin D deficiency induces cytoskeletal changes and affects cell migration pathways in the brain. *Neurobiology of Disease*, 2013; 50: 107-19. **IF<sub>2012</sub> 5.624**, **MNiSW<sub>2012</sub> 35** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 100** punktów. **WoS 15** cytowań.
- 3) Scifo E<sup>#</sup>, Szwajda A, Uusi-Rauva K, Kesti K, Dębski J, Dadlez M, Gingras AC, Tyynelä J, Baumann M, Jalanko A, **Lalowski M<sup>#</sup>**. Drafting the ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3 (CLN3) interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: a label-free proteomics approach. *Journal of Proteome Research*, 2013; 12:2101-15. **IF<sub>2012</sub> 5.056**, **MNiSW<sub>2012</sub> 40** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 100** punktów. **WoS 24** cytowania.
- 4) Scifo E<sup>#</sup>, Szwajda A, Soliymani R, Pezzini F, Bianchi M, Dapkunas, A, Dębski J, Uusi-Rauva K, Dadlez M, Gingras A-C, Simonati A, Jalanko A, Baumann M, **Lalowski M<sup>#</sup>**. Proteomic Analysis of the Palmitoyl Protein Thioesterase 1 Interactome in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Journal of Proteomics*, 2015; 123: 42-53. **IF<sub>2014</sub> 3.888**, **MNiSW<sub>2014</sub> 35** punktów/ **MNiSW<sub>2019</sub> 100** punktów. **WoS 18** cytowań.
- 5) Scifo E<sup>#</sup>, Szwajda A, Soliymani R, Pezzini F, Bianchi M, Dapkunas, A, Dębski J, Uusi-Rauva K, Dadlez M, Gingras A-C, Simonati A, Jalanko A, Baumann M, **Lalowski M<sup>#</sup>**. Quantitative analysis of PPT1 interactome in human neuroblastoma cells. *Data in Brief*, 2015 4; 207-16. (Dane towarzyszące artykułowi w *Journal of Proteomics*, ponownie recenzowane). **MNiSW<sub>2019</sub> 40** punktów. **WoS 3** cytowania.
- 6) Tikka S\*, Monogioudi E\*, Gotsopoulos A, Soliymani R, Pezzini F, Scifo E, Uusi-Rauva K, Tyynelä J, Baumann M, Lehesjoki A-E, Simonati A, Jalanko A, **Lalowski M<sup>#</sup>**. Proteomic Profiling in the Brain of CLN1 Disease Model Reveals Affected Functional Modules. *NeuroMolecular Medicine*, 2016; 18:109-33. **IF<sub>2015</sub> 3.692**, **MNiSW<sub>2015</sub> 35** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 70** punktów. **WoS 15** cytowań.
- 7) Pezzini F, Bettinetti L, Di Leva F, Bianchi M, Zoratti E, Carrozzo R, Santorelli FM, Delledonne M, **Lalowski M<sup>#</sup>**, Simonati A<sup>#</sup>. Transcriptomic profiling discloses molecular and cellular events related to neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2017; 37: 665-682. **IF<sub>2016</sub> 2.939**, **MNiSW<sub>2016</sub> 20** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 100** punktów. **WoS 11** cytowań.
- 8) Pezzini F, Bianchi M, Benfatto S, Griggio F, Doccini S, Carrozzo R, Dapkunas A, Delledonne M, Santorelli F, **Lalowski M<sup>#</sup>**, Simonati A<sup>#</sup>. The networks of genes encoding palmitoylated proteins in axonal and synaptic compartments are affected in PPT1 overexpressing neuronal-like cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017; 10: 266. **IF<sub>2016</sub> 5.076**, **MNiSW<sub>2016</sub> 35** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 140** punktów. **WoS 3** cytowania.

9) Scifo E\*, Calza G\*, Fuhrmann M, Soliymani R, Baumann M, **Lalowski M**<sup>#</sup>. Recent advances in applying mass spectrometry and systems biology to determine brain dynamics. *Expert Rev Proteomics*, 2017; 14: 545-59. **IF<sub>2016</sub> 3.849**, **MNiSW<sub>2016</sub> 30** punktów / **MNiSW<sub>2019</sub> 100** punktów. WoS **5 cytowań**. [Artykuł przeglądowy].

10) Doccini S, Morani F, Nesti C, Pezzini F, Calza G, Soliymani R, Signore G, Rocchiccioli S, Kanninen K, Huuskonen MT, Baumann M, Simonati A<sup>#</sup>, **Lalowski M**<sup>#</sup>, Santorelli FM<sup>#</sup>. Mitochondrial compartmental functional proteomics reveals affected pathways in NCL5 disease. *Cell Death Discovery*, 2020; 6(18). **IF<sub>2019</sub> 4.114**, **MNiSW<sub>2019</sub> 20** punktów. WoS **1 cytowanie**.

#- autor korespondencyjny; \*- autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR) dla artykułów dotyczących osiągnięcia habilitacyjnego wynosi: **63.627**. Łączna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi **314** (za rok poprzedzający publikację, z wyjątkiem czasopisma *Cell*, dla którego podano indeks za rok 2005) i **970** punktów, zgodnie z najnowszą listą opublikowaną 31 lipca 2019 r. Łączna liczba cytowań dla 10 publikacji osiągnięcia naukowego według bazy danych WoS (dostęp: 13.11.2020) to **1730 (włączając autocytowania)** i **1707 (bez autocytowań)**. Kopie powyższych publikacji umieszczono w **załączniku nr 8**. Oświadczenia dotyczące mojego wkładu i udziału współautorów korespondencyjnych w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w **załączniku nr 6**.

### **c) omówienie celów naukowych prezentowanych prac badawczych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

#### **Wprowadzenie**

**Ceroidolipofuscynoza neuronalna (ang. neuronal ceroid lipofuscinosis; NCL)** to grupa **rzadkich** chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych genetycznie, reprezentująca dziedziczne progresywne encefalopatie, głównie dotyczące wieku dziecięcego z częstotliwością występowania nawet 1:1,000,000, w zależności od postaci <sup>1</sup>. NCL charakteryzują się postępującą utratą wzroku, pogorszeniem sprawności umysłowej i motorycznej oraz uogólnionymi napadami padaczkowymi o charakterze toniczno-klonicznym <sup>2</sup>. W oparciu o kryteria kliniczne, obraz patologiczny i molekularny, opisano do tej pory czternaście różnych postaci NCL (oznaczonych jako **CLN1-CLN14**), związanych z ponad 400 mutacjami (głównie dziedziczonymi autosomalno recesywnie), w trzynastu poznanych genach (oznaczonych jako *CLN1-8*, *CLN10-14*) (<http://www.ucl.ac.uk/ncl>) oraz

[neuronal-ceroid-lipofuscinoses/pl](#); **Tabela 1**), przy czym kilka z nich zostało zidentyfikowanych dopiero niedawno. NCL charakteryzuje się nagromadzeniem materiału spichrzeniowego o właściwościach lipofuscyny i ceroidu w neuronach oraz wszystkich innych komórkach organizmu, co w efekcie prowadzi do ich degeneracji. Materiał spichrzeniowy gromadzący się w lizosomach wykazuje autofluorescencję w świetle ultrafioletowym, jest PAS-dodatni, barwi się barwnikami: sudanem czarnym B oraz luksolem, a także zawiera związki lipidowe, w tym pochodne dolicholi, związki cukrowe, metale i białka (np. podjednostkę c mitochondrialnej ATP-azy (SCMAS; ang. subunit c of mitochondrial **ATP synthase**) i/lub saponiny A i D <sup>3</sup>. Ceroidolipopigment gromadzi się w wielu tkankach i narządach, ale postępujące uszkodzenia strukturalne występują tylko w ośrodkowym układzie nerwowym. Diagnoza NCL opiera się na analizie specyficznej dla danego typu NCL mutacji, ale dokładna definicja musi być potwierdzona badaniami morfologicznymi materiału spichrzeniowego, który jest specyficzny dla każdej postaci NCL <sup>4,5</sup>. Obraz złogów w mikroskopie elektronowym obejmuje jednorodne inkluzje lizosomalne o typie ziarnistych złogów osmiofilnych (GRODS; ang. **granular osmophilic deposits**), widoczne w CLN1, CLN4 oraz CLN10, a także ciała skrętolinijne, prostolinijne lub typu linii papilarnych występujące oddzielnie lub w połączeniu z GRODS (ang. curvilinear, fingerprint profiles). Te ostatnie korelują z nagromadzeniem się SCMAS <sup>4-6</sup>. Obecnie nie istnieje żadna znana terapia stwarzająca możliwość wyleczenia NCL, a współczesna medycyna oferuje pacjentom jedynie łagodzenie objawów. Ewentualne terapie genowe są dopiero w fazie opracowywania. Grupa pacjentów z CLN2 jest poddawana enzymatycznej terapii zastępczej, przy użyciu rekombinowanej ludzkiej tripeptydylopeptydazy 1 <sup>7,8</sup>.

Nasza wiedza dotycząca roli zmutowanych białek w przebiegu choroby wciąż jest fragmentaryczna. **W CLN1 mamy doczynienia z mutacją w genie kodującym tioesterazę palmitoilową PPT1** (ang. palmitoyl protein thioesterase 1). Palmitoilacja jest bardzo częstą modyfikacją potranslacyjną zachodzącą w przypadku białek neuronalnych (przegląd w <sup>9</sup>). Polega ona na odwracalnym dodaniu nasyconego 16-węglowego kwasu palmitynowego do określonych reszt cysteiny poprzez utworzenie labilnego wiązania tioestrowego (S-palmitoilacja). Odwracalna natura palmitoilacji umożliwia białkom przemieszczanie się między przedziałami wewnątrzkomórkowymi. Ponadto palmitoilacja zwiększa hydrofobowość białek, ułatwiając im w ten sposób przyczep do błon. W przeciwieństwie do dużej rodziny transferaz palmitoilowych (PAT, 23 rodziny u ludzi i myszy), znanych jest tylko kilka enzymów depalmitoilujących, w tym wspomniana **tioesteraza PPT1** i jej homolog PPT2. Nie jest wiadome jednak, czy te białka są głównymi

enzymami depalmitoilującymi w mózgu i jakie są ich specyficzne substraty.

Z kolei w CLN3 **dochodzi do mutacji w genie kodującym białko batteninę, CLN3**. Jest to lizosomalne białko transbłonowe o długości 438 aminokwasów, które zlokalizowano w późnych endosomach, synaptosomach i aksonach. Sugeruje się, że białko CLN3 jest zaangażowane w różne funkcje, w tym: adhezję, apoptozę, autofagię, kontrolę cyklu komórkowego, proliferację komórek, endocytozę, neurogenezę, osmoregulację, kontrolowanie pH i homeostazy jonów oraz transport i sekrecję białek. Szczegóły dotyczące struktury genów i białek, lokalizacji i znanych interakcji zostały ostatnio szeroko omówione w <sup>10</sup>. W NCL typu 5 obserwuje się nieprawidłową i silnie glikozylowaną formę białka **CLN5**. **Białko to** zlokalizowane jest w lizosomach i neurytach, jednak jego funkcja nie została jak dotąd poznana. Scharakteryzowano różne postacie choroby CLN5 w późnym wieku niemowlęcym, młodzieńczym i dorosłym <sup>5</sup>.

Jednostka chorobowa NCL/ OMIM ID	Gen/ białko	Właściwości/ lokalizacja komórkowa	Chromosom/ typ dziedziczenia	Proponowana funkcja
<b>CLN1;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza</b> <b>neuronalna typu 1</b> (wczesnodziecięca postać NCL; choroba Santavuori; choroba Santavouri-Haltii) <a href="#">256730</a>	<b>* <u>PPT1</u> / <u>PPT1</u></b>	Enzym lizosomalny	1p32  <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Tioesteraza białkowa palmitoilowa 1</b>
<b>CLN2;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza</b> <b>neuronalna typu 2</b> (chorobą Jansky'ego- Bielschowsky'ego; klasyczna późnodziecięca (późnoniemowlęca) postać NCL <a href="#">204500</a>	<b><u>TPP1</u> / TPP1</b>	Enzym lizosomalny	1p15  <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Peptydaza tripeptydylowa 1</b>
<b>CLN3;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza</b> <b>neuronalna typu 3</b> (choroba Spielmeyera- Vogta-Sjögrena; choroba Battena) <a href="#">204200</a>	<b>*<u>CLN3</u> / <u>CLN3</u></b>	Lizosomalne białko transbłonowe, późne endosomy, synaptosomy, aksony	16p12.1  <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN4A;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza</b> <b>neuronalna typu 4A</b> wariant dorosły NCL (choroba Kufsa z progresywną epilepsją mioklonalną) <a href="#">204300</a>	<b><u>CLN6</u> / CLN6</b>	Białko błonowe, ER	15q23  <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>

<b>CLN4B;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 4B</b> (z otępieniem) <a href="#">162350</a>	<b>DNAJC5 / CSP<math>\alpha</math></b>	Bogate w cysteinę białko cytozolu, pęcherzyki wydzielnicze	20q13.33 <b>Autosomalne dominujące</b>	<b>DnaJ (Hsp40) homolog; białko chaperonowe</b>
<b>CLN5;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 5</b> (późnodziecięca, młodzieńcza postać oraz wariant dorosły NCL) <a href="#">256731</a>	<b>*CLN5 / CLN5</b>	Macierz lizosomalna / sekrecja lub ER, neuryty	13q22 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN6;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 6</b> Wariant późnodziecięcej postaci NCL <a href="#">601780</a>	<b>CLN6 / CLN6</b>	Białko błonowe, ER	15q23 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN7;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 7</b> <a href="#">610951</a>	<b>MFSD8 / MFSD8</b>	Lizosomalne białko transbłonowe	4q28.2 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Tranporter lizosomalny?</b>
<b>CLN8;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 8</b> (postępująca padaczka - niepełnosprawność intelektualna, typ fiński; północny wariant padaczki) <a href="#">610003</a>	<b>CLN8 / CLN8</b>	Białko błonowe, ER	8p23 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN8;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 8</b> <a href="#">600143</a>	<b>CLN8 / CLN8</b>	Białko błonowe, ER	8p23 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN9;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 9</b> <a href="#">609055</a>	<b>nieznane</b>	<b>nieznane</b>	nieznane	<b>Nieznana</b>
<b>CLN10;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 10</b> (niedobór katepsyny D; Wrodzona postać NCL) <a href="#">610127</a>	<b>*CTSD / CTSD</b>	Enzym lizosomalny sekrecja	11p15 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Proteaza aspartylowa</b>
<b>CLN11;</b> <b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 11</b>	<b>GRN / GRN</b>	Pozakomórkowa	17q21.31 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Nieznana</b>
<b>CLN12;</b>	<b>ATP13A2 / ATP13A2</b>	Lizosomalna ATPaza typu P	1p36.13 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Transporter kationów</b>



<b>Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 12**</b> (parkinsonizm z powodu niedoboru ATP13A2; Zespół Kufora-Rakeba; choroba Parkinsona typ 9) <a href="#">606693</a>				
<b>CLN13; Ceroidolipofuscynoza neuronalna typ 13,</b> typu choroby Kufsa <a href="#">615362</a>	<b>CTSF / CTSF</b>	Enzym lizosomalny	11q13 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Proteaza cysteinowa</b>
<b>CLN14; Postępująca padaczka miokloniczna typu 3</b> (spowodowana niedoborem KCTD7) z/bez inkluzji, EPM3 <a href="#">611726</a>	<b>KCTD7 / KCTD7</b>	Białko błonowe (warstwa peryferyjna)	7q11.21 <b>Autosomalne recesywne</b>	<b>Kanał potasowy</b>

**Tabela 1. Charakterystyka różnych postaci mutacji NCL z proponowanymi funkcjami i lokalizacją komórkową białek odpowiedzialnych za rozwój choroby (zmodyfikowane na podstawie informacji z artykułu przeglądowego <sup>11</sup>) \* - Białka badane w pracach będących podstawą prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego. \*\*- status choroby jest wciąż niejasny. OMIM ID- identyfikator w bazie Online Mendelian Inheritance in Man.**

Jednak pomimo postępu w naukach medycznych i biologicznych, wciąż stosunkowo niewiele wiadomo na temat mechanizmu molekularnego rozwoju różnych postaci NCL. Nie ulega wątpliwości, że wiedza na temat fizjologicznych funkcji i interakcji poszczególnych białek oraz genów w NCL rzuciłaby nieco światła na podłoże molekularne chorób NCL oraz dostarczyłaby narzędzi do opracowania skutecznych terapii.

Sieci interakcji białko-białko (sieci **PPI**; ang. **protein-protein interaction networks**) stanowią istotny element wszystkich szlaków biologicznych i mechanizmów sygnalizacji w komórce i są użytecznymi wskaźnikami funkcjonalnych powiązań między białkami. Mapowanie i identyfikacja sieci PPI stanowią ważne narzędzie stosowane do wyjaśnienia funkcji białek, powiązań pomiędzy ich strukturą i funkcją oraz mechanizmów molekularnych leżących u podłoża choroby. Tą interdyscyplinarną dziedzinę nauki zajmującą się badaniami oddziaływań białek nazywamy **interaktomiką**. U podłoża tej dziedziny leżą metody oparte o chromatografię powinowactwa, proteomiczne techniki wykorzystujące techniki spektrometrii mas, a także systematyczne badania przesiewowe przy użyciu drożdżowego systemu dwuhybrydowego (Y2H) i membranowego Y2H (MYTH). Mapowanie interakcji białko-białko zostało zainicjowane w organizmach modelowych, początkowo tylko dla określonych procesów biologicznych, a następnie rozszerzając skalę do prób mapowania całego interaktomu <sup>12,13</sup>. W przypadku organizmu ludzkiego, stworzono

mapy PPI dla pojedynczych szlaków sygnałowych, np. sieci interakcji kinazy i fosfatazy w drożdżach <sup>14</sup>, sieci oddziaływań w kompleksie CRL (ang. cullin-RING ubiquitin ligase <sup>7</sup>), a także poszczególnych procesów komórkowych takich jak autofagia <sup>15,16</sup>. Warto zaznaczyć, że istotna jest analiza nie tylko silnych i trwałych interakcji białkowych, ale także słabych i przejściowych powiązań <sup>17</sup>. Mogą one mieć szczególne znaczenie w chorobach neurodegeneracyjnych gdzie mamy doczynienia z białkami podatnymi na agregację, często wewnątrznie nieuporządkowanymi <sup>18</sup>, a ich stechiometria wiązania z odpowiednim partnerem białkowym ma niskie powinowactwo <sup>19</sup>. Ponadto, ponieważ większość danych dotyczących interakcji ma charakter statyczny, jako takie są one niewystarczające, aby dostarczyć informacji dotyczących funkcji białek i związanych z nimi procesów komórkowych. Obecnie używane metody generowania danych dotyczących interakcji białek różnią się do tego stopnia, że tylko ich kompleksowe użycie może zapewnić uzyskanie uzupełniających się wzajemnie wyników <sup>20,21</sup>. Pierwsze „zorientowane na chorobę” sieci PPI dla człowieka zostały stworzone dla choroby Huntingtona (HD) <sup>21,22</sup> i ataksji rdzeniowo-mózdkowych <sup>23</sup>, a następnie dla kolejnych chorób neurodegeneracyjnych <sup>24</sup>. Badania te wyraźnie wykazały ogromne znaczenie PPI w specyficznym kontekście białka powodującego chorobę i prowadzącego do śmierci komórek określonego typu. Okazało się również, że różne geny i białka będące podstawą określonego fenotypu chorobowego w ataksjach mózdkowych mogą wchodzić w interakcje lub być podstawą zaburzonych szlaków sygnałowych w innych, podobnych schorzeniach <sup>25,26</sup>. Innymi słowy, sugeruje się, że interaktomy różnych chorób neurodegeneracyjnych mogą nakładać się na siebie. Badania sieci zaburzeń genetycznych (tzw. ludzki „fenom chorobowy”) w powiązaniu ze znanymi genami będącymi podstawą rozwoju schorzenia (tzw. „genom chorobowy”), umożliwiły badanie korelacji pomiędzy objawami choroby a jej patomechanizmem <sup>27</sup>. Podobnie, systematyczna analiza kompleksów białkowych o znanej roli w procesie nowotworzenia w powiązaniu z obserwowanymi zmianami patologicznymi tkanek oraz wzorcami ekspresji wybranych genów, pozwoliła na rzucenie nieco światła na mechanizm molekularny podobnych patologii <sup>28,29</sup>. Inne kompleksowe podejście wykorzystujące „filtrowanie” ludzkiej sieci PPI przez wykorzystanie informacji dotyczących ekspresji genów, dostarczyło wskazówek dotyczących patologii otępienia związanego z ludzkim wirusem niedoboru odporności <sup>30</sup>. Badania interaktomu mogą być prowadzone również na poziomie całych domen białkowych. Analiza sieci interakcji domen białka prekursorowego amyloidu  $\beta$  (ang. **A**myloid  $\beta$  **P**recursor **P**rotein, A $\beta$ PP) i produktów jego proteolitycznego rozszczepienia <sup>31</sup> lub badania

interakcji pomiędzy znanymi genami biorącymi udział w rozwoju choroby Alzheimera<sup>32</sup>, dostarczyły wnikliwych, mechanistycznych i funkcjonalnych informacji dotyczących patogenezы tej choroby. Podejście proteomiczne wykorzystujące znakowanie SILAC i analizę z wykorzystaniem spektrometrii mas pozwoliło na identyfikację partnerów wiązania A $\beta$ PP i preseniliny 1 w chorobie Alzheimera, huntingtyny (HTT) w chorobie Huntingtona, parkiny w chorobie Parkinsona (PD) i ataksyny 1 dla ataksji rdzeniowo-móźdkowej typu 1 (SCA1; ang. **spinocerebellar ataxia type 1**)<sup>33</sup>. Zidentyfikowane sieci PPI ujawniły wspólne sygnatury degradacji i nieprawidłowego fałdowania białek, co zostało dodatkowo potwierdzone przez badania przesiewowe modyfikatorów toksyczności. Porównanie zmapowanych sieci interakcji uzyskanych dla A $\beta$ PP i preseniliny 1 z wynikami badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS; ang. **genome-wide association studies**) wykazało również funkcjonalną istotność uzyskanych sieci i ściśle powiązanie z fenotypami tych chorób *in vivo*<sup>33</sup>. W ciągu ostatniej dekady różne grupy badawcze podejmowały próby integracji opublikowanych danych interakcyjnych zakładając istnienie wspólnych modyfikatorów genetycznych odpowiedzialnych za rozwój wielu chorób jednocześnie<sup>34-36</sup>. Niedawno zaprezentowano obszerną mapę interakcyjną wygenerowaną przez systematyczne badania przesiewowe Y2H, opisującą 30000 interakcji dla 5000 białek uczestniczących w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Wskazano w niej kilka oddziałujących białek, które znacząco wpływają na toksyczność zmutowanych białek TDP-43 (ang. **TAR DNA binding protein 43**), HTT oraz ARF-GEP100 (ang. **guanine nucleotide-exchange protein (GEP) for ADP-ribosylation factors**), które kontrolują nieprawidłowe fałdowanie i agregację wielu białek w eksperymentalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych<sup>37</sup>. **Podsumowując, sieci PPI ukierunkowane na fenotyp lub specyficzną jednostkę chorobową dostarczają narzędzi do ujawniania potencjalnych genów sprawczych oraz modyfikatorów biorących udział w rozwoju stanów patologicznych. Może to być pomocne nie tylko w zrozumieniu mechanizmów molekularnych choroby, ale również w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych.**

Przedstawione poniżej osiągnięcie naukowe jest zbiorem dziewięciu oryginalnych prac i jednej pracy przeglądowej, które powstały w wyniku mojej pracy naukowej na Wydziale Neuroproteomiki, Max Delbrück Center for Molecular Medicine w Berlinie oraz Wydziale Biochemii Uniwersytetu Helsińskiego w Finlandii. Głównym celem mojej pracy była **charakterystyka interakcji białko-białko oraz powiązań zaburzonych szlaków**

## **molekularnych leżących u podłoża grupy rzadkich zaburzeń neurodegeneracyjnych, ceroidolipofuscynoz neuronalnych (NCL).**

Badania interakcji białkowych w chorobach neurodegeneracyjnych rozpocząłem w 2002 roku we współpracy z grupą prof. Ericha E. Wankera na Wydziale Neuroproteomiki MDC w Berlinie. Przy użyciu zautomatyzowanego drożdżowego systemu dwuhybrydowego stworzyliśmy **model pierwszej mapy ludzkiego interaktomu**. Wynikiem tych badań była pierwsza publikacja eksperymentalna wchodząca w skład osiągnięcia habilitacyjnego opublikowana w czasopiśmie Cell (**Stelzl i wsp., Cell, 2005**<sup>12</sup>; cytowana ponad **1600** razy). We wspomnianej pracy przebadaliśmy ponad 25 milionów potencjalnych par interakcji białkowych i zidentyfikowaliśmy 3186, głównie nieznanych do tej pory, sieci PPI obejmujących 1705 białek. Znaczącą część zidentyfikowanych sieci PPI (65%) potwierdzono również w testach wykorzystujących technikę pull-down i immunoprecypitację. Z wykorzystaniem kryteriów eksperymentalnych, topologii sieci białkowych i anotacji ontologii genów (Gene Ontology), opracowaliśmy również system oceny wiarygodności uzyskanych danych w celu potwierdzenia zidentyfikowanych interakcji, co zaowocowało wynikiem 911 interakcji o wysokiej ufnosci wśród 401 różnych białek. Aby zademonstrować przydatność opracowanego interaktomu w kolejnym etapie przeprowadzono mapowanie niescharakteryzowanych dotąd genów oraz patologicznych białek człowieka w celu przypisania ich do znanych szlaków sygnałowych i procesów chorobowych. Około 150 ludzkich białek połączono w interakcje o wysokim poziomie ufnosci z 22 różnymi szlakami z bazy KEGG (ang. **K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes). Ta analiza pozwoliła np. na zmapowanie białek ANP32A (ang. **a**cidic leucine-rich **n**uclear **p**hosphoprotein **32** family member **A**) i CRMP1 (ang. **c**ollapsin response **m**ediator **p**rotein **1**) poprzez interakcję z białkiem Axin1 jako modulatorów szlaku sygnałowego *Wnt*, odgrywających istotną rolę w procesie kancerogenezy. Pokazaliśmy, że wiązanie białek z określonymi kaskadami sygnalizacyjnymi poprzez interakcje Y2H umożliwia identyfikację potencjalnych modyfikatorów tych szlaków, które mogą być między innymi zaangażowane w różne procesy przekazywania sygnałów również w chorobach neurodegeneracyjnych. Jeden z takich modyfikatorów, CRMP1, został następnie niezależnie zweryfikowany w badaniu przesiewowym, oceniającym czy koekspresja białek oddziałujących z HTT może modulować fenotyp neurodegeneracji oka u *D. melanogaster* w transgenicznym modelu HD<sup>38</sup>. **Wiedza oraz doświadczenie, które nabyłem podczas realizacji tego projektu uświadomiły mi ogromny potencjał badań interaktomicznych w chorobach neurodegeneracyjnych. Warsztat metodologiczny opracowany w latach 2002–2008**

obejmujący zestaw technik eksperymentalnych, wektory kompatybilne z systemem Gateway®, ramy bioinformatyczne czy metodologia służąca do walidacji funkcjonalnych interakcji białkowych zostały następnie wykorzystane w moich kolejnych projektach i pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego skupiających się na sieciach oddziaływań białkowych/genowych w ceroidolipofuscynozach neuronalnych. Biorąc pod uwagę ograniczoną dostępność informacji o mechanizmie molekularnym rozwoju NCL oraz interakcjach białek i genów w różnych postaciach tej choroby, za główny cel moich badań obrałem wyjaśnienie szlaków sygnałowych związanych z NCL przy użyciu badań interaktomicznych i biologii systemów. Założyłem, że podobnie jak w innych chorobach będących wynikiem zaburzeń wielogenowych, mechanizm neurotoksyczności jest bardzo podobny w różnych postaciach NCL, pomimo, że białka uczestniczące w patogenezie są zaangażowane w wielorakie szlaki komórkowe. Zatem badania takie mogłyby wykazać oddziaływania zmutowanych białek NCL z białkami odpowiadającymi za neurodegenerację, bądź tymi które są odpowiedzialne za upośledzenie umysłowe i napady padaczkowe oraz **moduły funkcjonalne sieci białkowych**, które mogą być przedmiotem nowych form terapii.

W sierpniu 2008 roku po powrocie do Finlandii zacząłem budować swoją grupę badawczą na Wydziale Biochemii w Instytucie Biomedycyny, Uniwersytetu w Helsinkach. Postanowiłem wykorzystać nabytą wiedzę z zakresu interaktomiki do badania monogenowych zaburzeń neurodegeneracyjnych pochodzenia fińskiego<sup>39</sup> i uzyskałem wiodący grant badawczy z Akademii Fińskiej (2009-2012; <https://app.dimensions.ai/details/grant/grant.4244865>) jako kierownik grantu.

Początkowo, we współpracy z grupą docent Jaany Vesterinen (Uniwersytet w Helsinkach), w naszej pracy podjęliśmy się systematycznego podejścia do badania proteomu synaptycznego u myszy z nokautem katepsyny D (*Ctsd*<sup>-/-</sup>), u których patologia synaptyczna jest podobna do tej występującej u człowieka<sup>40</sup>. Katepsyna D odgrywa istotną rolę w degradacji mieliny w chorobach neurodegeneracyjnych. Efektem tej pracy był drugi artykuł wchodzący w skład prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego (**Koch i wsp., *Neurobiology of Disease* 2013**<sup>41</sup>). Mutacje w genie katepsyny D (*CTSD*) leżą u podstaw wrodzonej neuronalnej ceroidolipofuscynozy typu 10 (CLN10, **Tabela 1**), rzadkiej choroby neurodegeneracyjnej u noworodków<sup>42,43</sup>. Stosując znakowanie białek znacznikami iTRAQ oraz spektrometrię mas analizowaliśmy białka w synaptosomach pochodzących od modelowych myszy z nokautem genu katepsyny D. Spośród około 600 zidentyfikowanych białek, u 43 z nich stwierdzono zróżnicowaną akumulację w synaptosomach mutantów

*Ctsd*<sup>-/-</sup> w porównaniu do myszy kontrolnych. Aby zidentyfikować zaburzone procesy biologiczne związane z niedoborem katepsyny D, przeprowadziliśmy funkcjonalną analizę bioinformatyczną opartą na rygorystycznym podejściu filtrowania danych. W pierwszym etapie, wyszukując ludzkie ortologi mysich białek różnicujących połączyliśmy je przy użyciu dostępnych danych PPI korzystając z czternastu różnych baz danych zawierających informacje o interakcjach (binarnych, uzyskanych gł. metodami Y2H, kompleksów białkowych, uzyskanymi metodami spektrometrii mas oraz przewidywanych, pochodzących z badań nad interakcjami w innych organizmach). Następnie, przy użyciu narzędzi bioinformatycznych opracowanych w pierwszym artykule zawartym w moim osiągnięciu naukowym (**Stelzl i wsp., Cell 2005**<sup>12</sup>), wzbogaciliśmy otrzymaną sieć PPI o ontologię genów oraz informacje o udziale w znanych ścieżkach sygnałowych oraz fenotypach. Wykorzystaliśmy również dostępne dane dotyczące innych chorób neurodegeneracyjnych, umożliwiając tym samym zbudowanie dynamicznej sieci skupionej na katepsynie D i wskazując przypisane jej moduły funkcjonalne. Wykazane eksperymentalnie zmiany w akumulacji zidentyfikowanych białek, jak również niektóre ze zmian przewidzianych w badaniach bioinformatycznych, zostały potwierdzone metodą western blot lub za pomocą badań immunohistochemicznych na skrawkach kory mózgowej pochodzącej od niezależnej grupy myszy. To połączone podejście wskazało na zmiany patologiczne zlokalizowane w kompartmentach komórkowych, wcześniej niekojarzonych z chorobą, w tym w cytoszkielecie i zbudowanych z mikrotubul wypustek komórkowych. Testy rozprzestrzeniania się komórek i gojenia ran potwierdziły znacznie upośledzoną orientację przestrzenną, związaną z obniżeniem zdolności do adhezji fibroblastów myszy z niedoborem katepsyny D. Ponadto, aby ustalić, czy obserwowane zmiany są również obecne w ludzkich fibroblastach z niedoborem katepsyny D, wykorzystaliśmy unikalną linię komórkową pochodzącą od pacjenta z mutacją w genie *CTSD* (c 299 C>T, w eksonie 3 genu *CTSD*; *CTSD* p.S100F)<sup>42</sup>. W tych eksperymentach zaobserwowaliśmy znaczące obniżenie poziomu integryn powierzchniowych w warunkach sprzyjających tworzeniu się klastrów integrynowych (hodowla komórek na pożywce z fibronektyną). Obserwacje te potwierdziły udział katepsyny D w procesach adhezji i migracji komórek. Nasze dane sugerują, że niedobór katepsyny D prowadzi do zmian w mikrotubulach i ogniskowych miejscach adhezji i może być krytycznym mediatorem patogenezy choroby, przyczyniając się do zapoczątkowania zmian synaptycznych, zmiany kształtu i polaryzacji neuronów, prowadząc do zwyrodnienia neuronalnego w CLN10. **W tym badaniu połączyliśmy proteomikę ilościową opartą na spektrometrii mas z funkcjonalną bioinformatyką,**

**eksploracją dostępnych baz danych uzupełnioną immunologicznymi technikami walidacyjnymi, aby stworzyć holistyczny obraz zaburzeń funkcjonalnych, na które wpływa niedobór katepsyny D.**

W kolejnym etapie podjęliśmy współpracę z grupami w Finlandii (docent A. Jalanko/docent A. Kyttälä), we Włoszech (prof. A. Simonati), w Polsce (prof. M. Dadlez), i Kanadzie (prof. A-C. Gingras) i rozpoczęliśmy prace w celu opracowania interaktomu chorób NCL w ludzkim mózgu. Wyniki tej części moich badań zostały opisane w trzecim artykule wchodzącym w skład proponowanego osiągnięcia habilitacyjnego (**Scifo i wsp. J of Proteome Res, 2013** <sup>44</sup>). Wysoce hydrofobowe integralne białka błonowe, takie jak CLN3, stanowią poważne wyzwanie badawcze, ponieważ ich izolacja jest problematyczna a analiza ich interakcji jest utrudniona ze względu na niespecyficzne wiązania. Wybór odpowiedniego modelu komórkowego w tych badaniach był motywowany przebiegiem choroby CLN3, która polega na degeneracji neuronów kory mózgowej. Dlatego wybraliśmy ludzkie komórki nerwiaka niedojrzałego SH-SY5Y, jako uznany w środowisku naukowym, model neuronów systemu dopaminergicznego, który był wcześniej szeroko stosowany do badań choroby Parkinsona i funkcji CLN3 <sup>45-47</sup>. Ponadto pacjenci z CLN3 wykazują objawy parkinsonowskie i mają obniżony poziom ekspresji genu transportera dopaminy w prądkowiu <sup>48</sup>. Aby zdefiniować białka oddziałujące z CLN3 i CLN5 zastosowaliśmy nowo skonstruowane wektory do ekspresji genów w komórkach ssaczych i wyprowadziliśmy linie komórkowe o stabilnej ekspresji genów kodujących CLN3 i CLN5. Następnie zastosowaliśmy oczyszczanie kompleksów białkowych CLN3 i CLN5 metodą tandemowej chromatografii powinowactwa (TAP; ang. **t**andem **a**ffinity **p**urification), analizę z użyciem spektrometrii mas oraz walidację funkcjonalną obserwowanych interakcji. Wykorzystaliśmy technologię klonowania rekombinacyjnego „Gateway”, opracowaną w pierwszej publikacji zawartej w moim osiągnięciu naukowym (**Stelzl i wsp., Cell 2005** <sup>12</sup>) do syntezy białek fuzyjnych CLN3/CLN5, a następnie do identyfikacji białek oddziałujących z CLN3 i CLN5. Nadmienię również, że obecnie nasza kolekcja składa się z ponad 140 klonów wejściowych związanych z NCL (entry clones), oraz ponad 2000 klonów docelowych (destination clones) w 24 różnych wektorach pozwalających na ekspresjonowanie białek fuzyjnych w komórkach ssaczych, drożdżach i *E. coli*, ze znacznikami na N- lub C-końcu. Po przeprowadzeniu rygorystycznej bioinformatycznej filtracji znanych zanieczyszczeń białkowych i zastosowaniu oprogramowania SAINT (ang. **s**ignificance **a**nalysis of **i**nteractome) do oceny interakcji białko-białko na podstawie ilościowych danych proteomicznych <sup>49</sup>, powiodła się identyfikacja 58 partnerów białka CLN3, w tym 42 nowych, nie opisanych do tej pory oraz

16 partnerów białkowych CLN3 o wysokim poziomie ufności, zidentyfikowanych wcześniej w innym wysokoprzepustowym badaniu techniką spektrometrii mas<sup>15</sup>. Nasze wyniki potwierdziły wpływ CLN3 na transport przez błonowy, homeostazę lipidów i pobudliwość neuronów. Kilka partnerów białka CLN3 (11% całości) zostało następnie niezależnie potwierdzonych w systematycznych testach koimmunoprecypitacji/kolokalizacji wykorzystujących wektory kompatybilne z Gateway® opracowane podczas mojego pobytu badawczego w MDC (**Stelzl i wsp., Cell 2005**<sup>12 i 50</sup>). Ponadto analizy funkcjonalne kompleksów CLN3 pozwoliły na połączenie ich ze szlakami przekazywania komórkowego białek G i fałdowaniem/sortowaniem białek w retikulum endoplazmatycznym. Te same procedury eksperymentalne, które zastosowano do analizy interaktomu CLN3, zastosowano do analizy kompleksów CLN5. Zidentyfikowano 31 partnerów CLN5, w tym 18 białek również wchodzących w skład kompleksów CLN3. Połączony interaktom CLN3-CLN5 obejmował białka zaangażowane w neurodegenerację, upośledzenie umysłowe i napady padaczkowe. Co ciekawe, 10 białek (14%) połączonego interaktomu CLN3-CLN5 było również znanymi składnikami proteomu lipofuscyny. W kolejnym etapie zanalizowaliśmy interakcje specyficzne dla 18 białek wspólnych dla CLN3 i CN5. Próbując funkcjonalnie powiązać białka sieciujące interaktom CLN3-CLN5, wskazaliśmy również ich pozostałych partnerów interakcji i przefiltrowaliśmy tak uzyskany interaktom pod kątem wysokiej ekspresji w mózgu. Kilka mitochondrialnych przenośników błonowych zostało w ten sposób powiązanych funkcjonalnie z białkami zaangażowanymi w autofagię, proces, w którym prawdopodobnie również uczestniczy białko CLN3<sup>15,51</sup>. Ponadto, ponieważ populacje neuronów GABAergicznym są silnie upośledzone zarówno u pacjentów z CLN3, jak i CLN5, zwłaszcza w regionach CA2-CA4 hipokampa<sup>52</sup>, jest prawdopodobne, że procesy autofagii z udziałem białek związanych z receptorem GABA mogą być odpowiedzialne za procesy neurodegeneracyjne w tych obszarach mózgu. **Biorąc pod uwagę podobieństwa fenotypowe leżące u podstaw zaburzeń NCL i oceniając repertuar oddziaływań między białkami CLN3 i CLN5, założenie o ich wspólnych mechanizmach molekularnych wydaje się wysoce prawdopodobne.**

Na kolejnym etapie badań, kontynuując współpracę z grupą prof. A. Simonati, zwróciliśmy uwagę na analizę partnerów oddziałujących z PPT1, co zaowocowało dwoma następnymi artykułami wchodzącymi w skład proponowanego osiągnięcia habilitacyjnego (**Scifo i wsp., J Proteomics 2015** oraz **Scifo i wsp., Data in Brief 2015**<sup>53,54</sup>). Celem tych badań była analiza natywnych kompleksów białkowych w komórkach SH-SY5Y ze stabilną ekspresją ludzkiego PPT1. Do wyizolowania kompleksów białkowych PPT1 użyliśmy



zmodyfikowanej metody FASP (ang. **filter aided sample preparation**), w celu wzbogacenia białek trudnorozpuszczalnych<sup>55</sup>. Podobnie jak w przypadku badań interaktomu CLN3 i CLN5 (**Scifo i wsp., J of Proteome Res 2013**<sup>44</sup>), wykorzystaliśmy system ekspresyjny fuzyjnego białka PPT1 znakowanego na C-końcu (kasetka TAP, wektor pES-CTAP-Puro) i zastosowaliśmy metodę jednoetapowego oczyszczania z użyciem chromatografii powinowactwa (wiązanie do białka G na złożu sefarozyowym) w celu zminimalizowania utraty partnerów związanych z PPT1 przejściowymi interakcjami. Poziomą akumulację fuzyjnego białka PPT1-CTAP, który był zbliżony do poziomu białka endogennego PPT1, oraz jego wzór N-glikozylacji oceniano stosując reakcje deglikozylacji PPT1 PNGazą F i technikę western blot. Aktywność enzymatyczną PPT1 mierzono spektrofotometrycznie, oceniając ilość uwolnionego 4-metyloumbeliferonu. Zaobserwowaliśmy 2-krotny wzrost aktywności enzymu PPT1, co było zgodne z prezentowanymi wcześniej badaniami<sup>56</sup>. Przeprowadzono również ocenę wewnątrzkomórkowej akumulacji PPT1-CTAP oraz jego lokalizacji w lizosomach z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Wykazaliśmy ponad 50 % kolokalizację sygnałów PPT1-CTAP i białka LAMP1 (marker lizosomalny) w lizosomach, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi<sup>57</sup>. Ponadto, dostępna w bazie PDB struktura kryształu analogicznego ludzkiego homodimeru PPT1 ze znacznikiem na C-końcu potwierdziła właściwe fałdowanie enzymu (<https://www.rcsb.org/structure/3GRO>). Uzyskane wyniki umożliwiły identyfikację 23 białek wiążących się z PPT1 i potwierdziły wcześniej sugerowaną rolę PPT1 w kierowaniu aksonów (axonal guidance)<sup>58</sup> i metabolizmie lipidów<sup>59</sup>. Niektóre ze zidentyfikowanych partnerów PPT1 (np. VCP; ang. **valosin-containing protein** i składniki kompleksu mitochondrialnych transporterów SLC25A) zostały niezależnie potwierdzone później przez innych badaczy<sup>60</sup>, którzy identyfikowali kompleksy GFP-PPT1 w eksperymentach typu pull-down z wykorzystaniem tkanki kory mózgowej myszy z nokautem genu *Ppt1*, *Ppt1*<sup>-/-</sup>. Bioinformatyczna analiza zidentyfikowanego w naszym badaniu interaktomu PPT1 pozwoliła na wskazanie zupełnie nowych funkcji białka PPT1 takich jak proces migracji neuronów czy udział w szlaku sygnałowym, w którym pośredniczy receptor dopaminy. Wykazaliśmy również, że trzy ze zidentyfikowanych partnerów białka PPT1: CRMP1, DBH (ang. **dopamine β-hydroxylase**) i MAP1B (ang. **microtubule-associated protein 1B**) ulegają z dużym prawdopodobieństwem reakcji palmitoilacji w mózgu, i zostały później przez nas opisane jako różnicowo regulowane we wzgórzu myszy *Ppt1*<sup>-/-</sup>, we wczesnym stadium przedobjawowym w porównaniu do myszy dzikich. Obecność w kompleksie PPT1 tych białek, sugeruje, że mogą one stanowić substraty dla enzymu w warunkach *in vivo*<sup>53,54</sup>. Udział białka CRMP1, został wcześniej

opisany w patologii HD <sup>38</sup>, oraz AD i PD a także w szlaku sygnałowym *Wnt*, w pierwszym artykule zawartym w moim osiągnięciu naukowym (**Stelzl i wsp., Cell 2005** <sup>12</sup>). Badania przedstawione w pracy **Scifo i wsp., J Proteomics 2015** <sup>54</sup> zostały rozszerzone o dalsze bioinformatyczne badania interaktomu PPT1 w oparciu o anotacje funkcjonalne oraz walidację interakcji PPT1 za pomocą metody pull-down w linii komórkowej ze stabilną ekspresją PPT1, opublikowanej w pracy przez **Scifo i wsp., Data in Brief 2015** <sup>53</sup> jako dane towarzyszące. Analiza bioinformatyczna oparta o modele asocjacyjne (ang. association terms network) wykazała, m.in., że akumulacja białek oddziałujących z PPT1 wiąże się z hamowaniem procesu śmierci komórek, inhibicją zaburzeń ruchu i zmniejszonym nagromadzeniem się lipidów. Publikacje Koch i wsp. oraz Scifo i wsp. 2013, 2015 i 2015a <sup>41,44,53,54</sup> stanowiły część pracy doktorskiej Enzo Scifo (Wydział Medyczny, Uniwersytet w Helsinkach), którego byłem promotorem.

Jak dotąd opisano trzy mysie modele choroby CLN1 (*Ppt1*<sup>-/-</sup>, *Ppt1Δex4* i *Cln1R151X*), przydatne ze względu na fenotypowe podobieństwo do ludzkiej CLN1 obejmujące m.in. dysfunkcję motoryczną i atrofię mózgu związaną ze śmiercią neuronów korowych. Jednakże wszystkie z nich różnią się pod względem patogenezy i procesu degeneracji neuronów u człowieka <sup>61-63</sup>. Wcześniejsze prace dotyczące analizy ekspresji genów w tkankach kory mózgu wskazały na podobieństwo zmian w szlakach molekularnych w mysich modelach *Ppt1*<sup>-/-</sup> i *Cln5*<sup>-/-</sup>, które wskazywały na stan zapalny, nieprawidłowości w budowie cytoszkieletu i zaburzenia regulacji stabilności stożka wzrostu neuronów <sup>63,64</sup>. W 2012 roku zostałem wybrany na jednego z liderów kierujących prestiżowym grantem w konsorcjum DEM-Child (<http://dem-child.eu/index.php/background-16.html>), w którym moja grupa była odpowiedzialna za przeanalizowanie zmian proteomie mózgu myszy *Ppt1Δex4* <sup>63</sup> (dalej określanej jako *Ppt1*<sup>-/-</sup>) w okresie presymptomatycznym, objawowym i zaawansowanym. Kontynuacja współpracy z prof. Simonati w ramach tego projektu zaowocowała powstaniem szóstej publikacji wchodzącej w skład mojego osiągnięcia naukowego: **Tikka i wsp., NeuroMolecular Med 2016** <sup>65</sup>. Wykorzystaliśmy w niej laserową mikrodysekcję w połączeniu z tandemową spektrometrią mas sprzężoną z chromatografią cieczową (nano-LC-MS<sup>E</sup>) oraz obrazowanie tkanek z użyciem spektrometrii mas MALDI-MSI (ang. MALDI-imaging mass spectrometry) <sup>66</sup>. Celem tych analiz była próba wizualizacji i ilościowego określenia zmian w akumulacji białek we wzgórzu mózgu dotkniętego chorobą CLN1, w którym poziom zmian chorobowych jest najwyższy i na skrawkach całej kory mózgowej. Laserowa mikrodysekcja umożliwia wzbogacenie określonych typów komórek, minimalizując w ten sposób niespecyficzną uzyskanych wyników <sup>67</sup>, podczas gdy metoda

MALDI-MSI umożliwia badania proteomu *in situ*, bezpośrednio na skrawkach tkanki, bez potrzeby jego znakowania<sup>66</sup>. W badaniach bionformatycznych zidentyfikowanych białek różnicujących przeprowadzono analizę szlaków biochemicznych i sygnałowych, wykazano ich powiązanie z chorobą oraz pokazano udział regulatorów sieci na różnych etapach rozwoju choroby. W następnym etapie filtrowania bioinformatycznego połączono je w sieci używając baz danych znanych interakcji i zidentyfikowano ich udział w ścieżkach sygnałowych na poziomie białek, genów i metabolitów, zarówno wykazanych eksperymentalnie jak i przewidywanych. Uzyskane w ten sposób sieci białkowe połączono następnie ze znanymi interaktomami PPT1 i CLN3 / CLN5<sup>44,53,54</sup>. Dalsze badania bioinformatyczne obejmowały wspólną analizę uzyskanych interaktomów ze znanymi białkowymi składnikami lipofuscyny, opisanymi proteomami mitochondrialnymi, proteomem mieliny ośrodkowego układu nerwowego u człowieka (myszy i szczurów) oraz porównania z opublikowanymi do tej pory profilami ekspresji genów w mózgu *Ppt1*<sup>-/-</sup>. Ponadto, aby porównać zaobserwowane zmiany w mózgu myszy *Ppt1*<sup>-/-</sup> z tymi obserwowanymi u człowieka, przeprowadzono analizę całego transkryptomu za pomocą globalnego sekwencjonowania RNA (RNA-seq) na fibroblastach pochodzących z biopsji skórnych od dwóch pacjentów z CLN1: z homozygotyczną, niekonserwatywną mutacją zmiany sensu (c.665T>C/p.L222P; pacjent 1) i homozygotyczną niekonserwatywną insercją (c.169dupA/p.M57Asnfs\*45; pacjent 2).

Proteomiczne profilowanie przedobjawowego stadium CLN1 we wzgórzu myszy *Ppt1*<sup>-/-</sup> w porównaniu z osobnikami dzikimi wykazało zmiany poziomu białek, związanych głównie z procesami metabolicznymi np. deregulacją cyklu kwasu trikarboksyłowego (TCA). Dodatkowo wykazaliśmy obniżoną regulację procesów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie neuronów: neurytogenezy, tworzenia rozgałęzień i dynamikę mikrotubul. Podobny obraz zaobserwowano analizując transkryptom fibroblastów pochodzących od pacjentów z ludzkim CLN1, gdzie zidentyfikowano ponad 100 różnicujących transkryptów związanych m.in. z tworzeniem błony komórkowej lub dynamiką mikrotubul. Te wyniki potwierdziły obserwacje i kierunek zmian obserwowanych we wzgórzu myszy *Ppt1*<sup>-/-</sup> w okresie przedobjawowym. Zmiany wykryte na etapie objawowym choroby obejmowały dysfunkcję mitochondrialną, zmiany w transporcie pęcherzyków synaptycznych i ścieżek sygnałowych, takich jak ścieżka RhoA. W zaawansowanym stadium choroby obserwowano deregulację procesów związanych ze śmiercią komórek, sygnalizacją ścieżki RhoA i zmianami typu HD oraz rozpadem osłonki mielinowej. Wyniki te były zgodne z naszymi wynikami obrazowania MALDI-MSI, w których wykryto znaczące zmiany w akumulacji

izoform zasadowego białka mieliny (MBP; ang. **myelin basic protein**) i składników łańcucha oddechowego (obniżone poziomy akumulacji oksydazy cytochromu c podjednostki 7C i dwóch podjednostek syntazy F0-ATP). Zidentyfikowane obniżenie poziomu białek mielinowych MBP i kładyny 11, CLDN11 oraz podwyższona akumulacja kwaśnego białka włóknikowego gleju, GFAP, zostały następnie potwierdzone z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych. Uzyskane dane potwierdziły również doniesienia innych grup badawczych <sup>41,68</sup>. W wyniku tych badań **zidentyfikowaliśmy różne moduły funkcjonalne w mózgu dotkniętym chorobą CLN1, które mogą być przedmiotem nowych celowanych terapii (Tikka i wsp., 2016 <sup>65</sup>)**. W ostatnich latach inne grupy badawcze niezależnie zweryfikowały kilka z tych wyników, tj. szereg zmian proteomicznych zostało potwierdzone przez Sleat i wsp., <sup>69</sup>, podczas gdy zmiany w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym zostały potwierdzone przez badania neuronów ziarnistych w mózdzku z nokautem *Ppt1*, wykorzystując traktowanie różnymi toksynami wywołującymi anoksję <sup>70</sup>.

Kolejne badanie (kontynuacja współpracy z grupą prof. A. Simonati) podjęliśmy w celu określenia zdarzeń molekularnych w modelu komórkowym nerwiaka niedojrzałego SH-SY5Y używanym wcześniej przez nas do badania interakcji PPT1, CLN3 i CLN5 (**Scifo i wsp. 2013, Scifo i wsp. 2015 oraz Scifo i wsp. 2015a <sup>44,53,54</sup>**). Badania te miały na celu wskazanie szlaków molekularnych zaburzonych przez nadekspresję genów NCL w procesie różnicowania komórek SH-SY5Y w kierunku fenotypu neuronalnego, ze szczególnym uwzględnieniem mutacji związanych z NCL (*PPT1*). Mechanizm molekularny leżący u podstaw różnicowania komórek SH-SY5Y nie został jeszcze w pełni scharakteryzowany. Jest prawdopodobne, że następują zmiany w ekspresji różnych genów, które sekwencyjnie oddziałują na proces różnicowania w różnych przedziałach komórki. W związku z tym zastosowaliśmy traktowanie komórek SH-SY5Y w warunkach indukujących różnicowanie w kierunku neuronów (medium RA-NBM z kwasem all-trans retinowym; modyfikacja metody opisanej w <sup>71</sup>). Naszym celem była identyfikacja zmian w ekspresji genów podczas procesu różnicowania. Badania zostały przeprowadzone z użyciem metody globalnego sekwencjonowania RNA, co zostało opisane w następnym artykule zawartym w moim osiągnięciu naukowym (**Pezzini et al., Cellular and Molecular Neurobiology 2017 <sup>72</sup>**). Aby poznać funkcje biologiczne i szlaki molekularne istotne dla procesu różnicowania, wdrożyliśmy analizy bioinformatyczne zidentyfikowanych genów, które różniły się poziomem ekspresji (DEG; ang. **differentially expressed genes**) w komórkach niezróżnicowanych oraz poddanych hodowli na pożywce RA-NBM. Fenotyp neuronopodobny zróżnicowanych komórek SH-SY5Y oceniano morfometrycznie oceniając stan i liczbę powstałych odgałęzień

aksonalnych. Analiza transkryptomu wykazała ponad 2000 DEG związanych z różnicowaniem się komórek SH-SY5Y. Większość DEG była funkcjonalnie połączona ze szlakami komórkowymi związanymi z różnicowaniem neuronów, przy czym niektóre rodziny genów zostały opisane po raz pierwszy (np. *SLITRK* i semaforyny). Podsumowując, nasze analizy ujawniły, że indukcja RA-NBM w komórkach SH-SY5Y powoduje pojawienie się zróżnicowanych neuronopodobnych komórek, wykazujących ekspresję markerów neuronowych i posiadających długie aksony oraz wiele drugorzędowych i trzeciorzędowych odgałęzień. Ponadto obserwowaliśmy częściowo zróżnicowane komórki MAP2C-dodatnie i komórki „podobne do macierzystych” (wyznakowane nestyną), zdolne do namnażania, a także niezróżnicowane komórki podobne do guza nerwiaka z obniżoną zdolnością do proliferacji. **Takie asynchroniczne różnicowanie się komórek odnotowano również w innych eksperymentach badających rolę białka prekursorowego amyloidu  $\beta$ , A $\beta$ PP<sup>73</sup> w modelu SH-SY5Y, co ponownie zwraca naszą uwagę na związek NCL z innymi chorobami neurologicznymi. Ekspozycja komórek na czynniki różnicujące może zmienić ich aktywność (np. odpowiedź na stres oksydacyjny), co wpływa na zdolność do reagowania na różne bodźce, zaburzając zdolność komórek do przeżycia, co bezpośrednio oddziałuje na różne sieci białek / genów i transdukcję sygnałów w komórce.**

W kolejnym etapie kontynuowałem badania nad CLN1. Przeprowadziliśmy analizy zdarzeń molekularnych wywołanych przez nadekspresję niezmutowanego genu *PPT1* i genu *PPT1* z mutacjami wykrytymi wcześniej u dzieci dotkniętych CLN1, zgodnie z paradygmatem różnicowania opisanym we wcześniejszym badaniu (**Pezzini i wsp., *Cellular and Molecular Neurobiology* 2017<sup>72</sup>**). Wyniki tych analiz zostały opisane w kolejnej pracy wchodzącej w skład proponowanego osiągnięcia habilitacyjnego (**Pezzini et al. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017<sup>74</sup>**). Do tych badań, wybraliśmy trzy różne mutacje zmiany sensu (c.665T>C/p.L222P, c.541G>A/p.V181M i c.541G>T/p.V181L), delecję drugiego eksonu (c.125\_235del/p.G42\_E78del), w którym utrzymywana jest otwarta ramka odczytu oraz insercję jednej zasady (c.169dupA/p.M57Nfs\*45) powodującą przesunięcie ramki odczytu wraz z przedwczesnym wystąpieniem kodonu stop w aminokwasie 101. Wspomniane linie zostały przeanalizowane techniką RNA-seq w porównaniu do linii komórkowej SH-SY5Y z nadekspresją genu CLN1 typu dzikiego (SH-p.wtCLN1), komórek kontrolnych transfekowanych pustym wektorem i komórkami dzikimi SH-SY5Y. Akumulację białka PPT1 następnie scharakteryzowano metodą western blot i stosując immunolokalizację z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Analiza western

blot ujawniła różnice we wzorcach ekspresji PPT1 w komórkach z nadekspresją niezmutowanego genu *PPT1* i genu PPT1 z mutacjami, przy czym dwa prążki o ciężarze molekularnym 38-36 kDa odnosiły się prawdopodobnie do mono- i di-glikozylowanych izoform dojrzalego PPT1 (jak opisano wcześniej dla komórek neuronalnych<sup>54,75</sup>), podczas gdy prążek ~43 kDa, obecny na podobnym poziomie we wszystkich analizowanych lizatach komórkowych, prawdopodobnie był niescharakteryzowaną izoformą PPT1 specyficzną dla komórek SH-SY5Y<sup>54</sup>. U poszczególnych mutantów *CLN1* zaobserwowano różne poziomy białka PPT1. Podczas gdy mutacje typu zmiany sensu wykazywały wysoki poziom białka PPT1, mutacja w ramce odczytu i mutant delecyjny nie wykazywały widocznego wzrostu akumulacji białka PPT1, pomimo wysokiego poziomu mRNA dla PPT1. Trzykrotny wzrost aktywności tioesterazy PPT1 wykazany w badaniach spektrofotometrycznych (prowadzonych jak w publikacjach **Scifo i wsp. 2015 oraz Scifo i wsp. 2015a**<sup>44,53,54</sup>) zaobserwowano jedynie w komórkach z nadekspresją dzikiego genu *CLN1* (SH-p.wtCLN1). Linie komórkowe niosące mutacje zmiany sensu nie wykazywały aktywności tioesterazy PPT1, pomimo nadekspresji białka PPT1, co sugeruje dysfunkcję enzymatyczną zmutowanych białek. Różnicowanie neuronów na pożywce RA-NBM z kwasem all-trans retinowym było obserwowane we wszystkich analizowanych liniach komórkowych, podobnie jak to opisano dla rodzicielskich komórek SH-SY5Y (**Pezzini i wsp., Cellular and Molecular Neurobiology 2017**<sup>72</sup>), a ekspresja PPT1 nie ulegała zmianie w trakcie różnicowania. Analiza RNA-seq ujawniła 802 transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w analizowanych komórkach. Ekspresja 286 transkryptów była podwyższona, a 516 obniżona w komórkach SH-p.wtCLN1 w porównaniu do kontrolnych komórek dzikich, transfekowanych pustym wektorem. Liczba transkryptów o zróżnicowanej ekspresji zidentyfikowana w dwóch mutantach *PPT1* była znacząco niższa. Zidentyfikowano 629 transkryptów specyficznych tylko dla komórek SH-p.wtCLN1. Analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników wykazała szereg anotacji funkcjonalnych związanych ze zmianami kształtu komórek neuronalnych, ich reorganizacją, powstawaniem nowych zakończeń aksonalnych, a także różnicowaniem neuronów. Większość z tych anotacji wskazywała na inhibicję wspomnianych funkcji w komórkach SH-p.wtCLN1 i SH-p.L222P w porównaniu do komórek dzikich, podczas gdy dla SH-p.M57Nfs\*45 wskazania te były mniej znaczące statystycznie. Zaburzone były również funkcje związane z transmisją sygnałów nerwowych takich jak: długotrwałe wzmocnienie, sekrecja neurotransmiterów czy kiełkowanie neuronów. Następnie skupiliśmy się na DEG odpowiedzialnych za palmitoilację białek neuronalnych. Największe różnice w ekspresji wykazano dla genów kodujących palmitylowane białka o funkcjach neuronalnych,

odpowiedzialnych za wzrost aksonów i przedziału synaptycznego. Obserwowano między innymi obniżenie ekspresji *CRMP1* i *NEFM* (ang. neurofilament medium polypeptide) oraz transkryptu *GAP43* kodującego neuromodulinę. Wyniki te potwierdzono metodą western blot na poziomie białek.

Aby zidentyfikować nowe, potencjalne cele terapeutyczne choroby CLN1, staraliśmy się wykazać możliwe powiązania z innymi typami NCL, szczególnie CLN4<sup>76</sup> i CLN10, które mają wiele wspólnych cech fenotypowych z CLN1<sup>1</sup>. Zaobserwowaliśmy między innymi podwyższenie poziomu mRNA katepsyny D w komórkach SH-wtCLN1. Katepsyna D jest palmitoilowanym enzymem lizosomalnym, biorącym udział w szeregu procesach biologicznych<sup>76</sup>. Dojrzewanie katepsyny D zachodzi w lizosomach i jest zaburzone u myszy *Ppt1*<sup>-/-</sup>, prawdopodobnie z powodu podwyższonego pH w tych organellach<sup>77</sup>.

Zaburzenia „dawki genów”, wywołane przez delecję lub duplikację genów są podstawą mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw szeregu chorób neurologicznych u ludzi. Wyniki naszego badania można uznać za efekt nadekspresji genu *PPT1*. **Chociaż modele zwierzęce typu nokaut lub z nadekspresją genu nie mogą być bezpośrednio porównywane do sytuacji fizjologicznych, nasze badania po raz pierwszy pokazują wpływ deregulowanych sieci genów kodujących białka palmitoilowane na procesy kiełkowania aksonów i proliferacji neuronów przy niedoborze *PPT1*.** Odkrycia te zostały potwierdzone niedawno przez innych badaczy w pracy dotyczącej roli procesu palmitoilacji w dynamice aksonów<sup>78</sup>. Wnioskowaliśmy, że **nadekspresja enzymu depalmitoilującego może zaburzyć proces S-acylacji, tym samym wpływając na palmitoilowane białka błonowe, co może mieć odzwierciedlenie w patogenezie choroby CLN1.**

Choroba CLN5 odnosi się do rzadkiej późnodziecięcej postaci NCL wywołanej mutacją w genie *CLN5*, choć istnieje również dorosła postać tej choroby. *CLN5* koduje rozpuszczalną, mało scharakteryzowaną, glikoproteinę macierzy lizosomalnej (**Tabela 1**), która bierze udział w transporcie wewnątrzkomórkowym na poziomie retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego i endosomów, a także w kontroli sortowania receptorów lizosomalnych. Mózgi pacjentów z CLN5 wykazują wczesną i wyraźną atrofię mózdzku, której towarzyszy odkładanie się materiału spichrzeniowego, utrata neuronów i mieliny oraz astrocytoza<sup>3</sup>. Również dysfunkcja mitochondriów, jako przyczyna pierwotna lub wtórna, jest często obserwowana w patogenezie tych zaburzeń neurodegeneracyjnych, ponieważ neurony wykorzystują fosforylację oksydacyjną jako źródło energii i mają niską zdolność do regulacji poziomu ATP pochodzącego z glikolizy. Defekty w kompartmentcie

mitochondrialnym postulowano w różnych typach NCL<sup>65,79,80</sup> i wydaje się, że są one kluczowe dla inicjacji procesu apoptozy wywołującej uszkodzenie neuronów. Ponadto, szereg transbłonowych transporterów mitochondrialnych oddziałuje z białkami CLN1, CLN3 i CLN5<sup>44,53,54,60</sup>. W pracy **Doccini i wsp. Cell Death Discovery, 2020**<sup>81</sup>, zastosowaliśmy proteomiczne podejście typu label-free i spektrometrię mas DIA-HDMS<sup>E</sup> (ang. **data-independent acquisition high definition MS<sup>E</sup>**<sup>82,83</sup>) ukierunkowane na analizę mitochondriów oraz badania funkcjonalne z udziałem komórkowych i mysich modeli CLN5, a także fibroblastów od pacjentów z CLN5. W wyniku tych badań **zidentyfikowaliśmy nowe, zupełnie wcześniej nieznane funkcje białka CLN5** oraz czynniki modyfikujące stan choroby. Początkowo, do eksperymentów wybrano komórki HEK 293T ze względu na ich przydatność do edycji genów w metodzie CRISPR-Cas9 a następnie komórki SH-SY5Y. W obu typach komórek wyłączono ludzki gen *CLN5* (*CLN5*<sup>-/-</sup>). Profilowanie proteomów mitochondrialnych w komórkach HEK 293T z nokautem genu *CLN5* i bioinformatyczna analiza danych z wykorzystaniem nowego schematu zaprojektowanego do analizy białek mitochondrialnych, pozwoliły na identyfikację 62 białek o zróżnicowanej akumulacji (mtDEP; ang. **mitochondrial differentially expressed proteins**); spośród których 46 wykazywało podwyższony a 16 obniżony poziom w porównaniu do komórek dzikich. Analizy bioinformatyczne ujawniły powiązanie procesu fosforylacji oksydacyjnej z nokautem ludzkiego genu *CLN5*. Następnie przeprowadzono analizę mitochondrialnego proteomu pochodzącego z mózgu presymptomatycznych (3 miesiące) i symptomatycznych (9 miesięcy) homozygotycznych myszy z nokautem genu *CLN5* (*Cln5*<sup>-/-</sup>)<sup>84,85</sup>. Zidentyfikowano 12 mtDEP w mitochondriach myszy przedobjawowych (11 z obniżoną i 1 z podwyższoną akumulacją w porównaniu do myszy dzikich), podczas gdy na etapie objawowym 11 mtDEP (w tym 4 z obniżoną i 7 z podwyższoną ekspresją). We wczesnym stadium choroby CLN5 stwierdzono statystycznie znamienne zmiany w fosforylacji/defosforylacji NAD, cyklu TCA i degradacji rodników ponadtlenkowych. Walidacja uzyskanych wyników z użyciem techniki western blot, przeprowadzona na lizatach komórkowych HEK 293T i SH-SY5Y potwierdziła wyniki profilowania proteomicznego. Co istotne, funkcjonalna analiza metabolizmu energetycznego komórek SH-SY5Y z nokautem CLN5 wykazała obniżenie potencjału błon mitochondrialnych, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (ROS) czy zmiany w morfologii mitochondriów. Wykazano również, że podstawowe tempo zużycia tlenu było zmniejszone, a maksymalne oddychanie mitochondrialne obniżone, natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic w oddychaniu niemitochondrialnym (test Seahorse XF Cell Mito Stress). Późniejsze spektrofotometryczne oznaczenie aktywności enzymów łańcucha oddechowego



w korze mózgowej myszy z objawami ujawniło ogólne zaburzenie fosforylacji oksydacyjnej ze znacznym obniżeniem aktywności kompleksów III i I + III oraz wzrostem aktywności syntazy cytrynianowej, jako wskaźnika proliferacji mitochondriów. W procesie mitofagii fragmentacja mitochondriów jest silnie powiązana z tworzeniem autofagosomów. Ponadto komórki SH-SY5Y *CLN5*<sup>-/-</sup> wykazały zwiększoną kolokalizację mitochondriów i markerów autofagosomów (TOMM20 i LC3), co sugeruje aktywację procesu mitofagii. W celu wskazania rozregulowanych szlaków mitochondrialnych u pacjentów z *CLN5*, wykorzystano fibroblasty skóry pochodzące od pacjentów z mutacjami w genie *CLN5*. **Wyniki tych analiz potwierdziły obserwacje uzyskane w modelach zwierzęcych *CLN5*, tj. obniżony metabolizm tlenowy i podwyższoną produkcję ROS, wskazując, że zaburzenie homeostazy mitochondrialnej jest silnie powiązane z przebiegiem choroby *CLN5* u człowieka. Ujawnienie udziału mitochondriów w patogenezie choroby posłuży w przyszłości do zdefiniowania nowych celów terapeutycznych w chorobie *CLN5*.**

Moja praca skupiająca się na chorobach neurodegeneracyjnych z wykorzystaniem narzędzi biologii systemów zaowocowała również w międzyczasie powstaniem pracy przeglądowej ([Scifo i wsp. Expert Reviews Proteomics, 2017](#)<sup>86</sup>). W artykule tym przeanalizowaliśmy różne podejścia eksperymentalne oparte na spektrometrii mas, które są obecnie wdrażane w celu badania dynamiki mózgu w stanach chorobowych w tym zaburzeniach neurodegeneracyjnych i neuropsychiatrycznych. Omówiliśmy obecnie używane metody proteomiczne służące do izolacji i wzbogacania określonych populacji komórek lub regionów mózgu, czy przygotowywania próbek. Krytycznej analizie poddano też obecnie stosowane techniki z użyciem spektrometrii mas służące do porównawczej, ilościowej oceny proteomów, analizy modyfikacji potranslacyjnych, a także metod obrazowania mózgu. Omówiono również przyszłe kierunki, w tym analizę kompartmentów komórkowych, celowane analizy MS oraz zastosowanie cytometrii mas, którą można wykorzystać do jednoczesnego wykrywania i oznaczania ilościowego szeregu markerów w poszczególnych neuronach<sup>87</sup>. Sygnatury molekularne pojedynczych populacji komórek na poziomie transkryptomu zostały z powodzeniem wykorzystane do wnioskowania o liniach komórkowych, subpopulacjach lub cechach biologicznych specyficznych dla komórki. Podobne podejście na poziomie białek będzie miało istotne znaczenie w przyszłej diagnostyce, identyfikacji subpopulacji chorych komórek czy ocenie lekooporności. Ponadto różne metody frakcjonowania subkomórkowego, takie jak przygotowanie synaptosomów, wzbogacanie gęstości postsynaptycznych lub izolacja mitochondriów i endosomów, w połączeniu z aktywowanym fluorescencyjnie sortowaniem komórek (FACS; ang.

fluorescent-activated cell sorting), mogą być stosowane w celu analizy proteomów subkomórkowych, czy tych wywodzących się ze zdefiniowanych struktur mózgowych (np. w obecnie realizowanym przez moją grupę projektu w ramach konsorcjum ERANET coFund, dotyczącego roli mikrogleju w mózgu). Przyszłe badania powinny również oprzeć się o metodologie dotyczące dynamiki białek w różnych populacjach komórkowych, np. wykorzystując linie myszy *Cre-driver* specyficzne dla typu komórki w połączeniu z określonymi reporterami. Metoda MACS (ang. **magnetic-activated cell sorting**), który podobnie jak FACS umożliwia segregację określonych populacji komórkowych z wykorzystaniem sortowania magnetycznego i ukierunkowanego wiązania przeciwciał z białkami powierzchniowymi (na przykład na neuronach <sup>88</sup>), ułatwi również szczegółowe badania proteomiczne.

Aktywowane fluorescencyjnie sortowanie jąder (FANS; ang. **fluorescence activated nuclei sorting**), sprzężone z analizą metodą tandemowej spektrometrii mas zostało również wykorzystane do identyfikacji i ilościowego oznaczenia białek ludzkiej kory czołowej <sup>89</sup>. Aby poznać dynamikę przestrzenną procesów w różnych lokalizacjach subkomórkowych (np. bouton synaptyczne, aksony, neuryty i kolce dendrytyczne), należy dalej rozwijać narzędzia proteomiczne specyficzne dla regionu subkomórkowego w połączeniu z metodami frakcjonowania. Zmiany w lokalizacjach subkomórkowych są powiązane ze stanami patologicznymi (np. aberracje kolców dendrytycznych w HD, ataksjach, AD i PD), dlatego te szczegółowe analizy mogą dostarczyć istotnych informacji na temat odrębnych/wspólnych procesów chorobowych i ich patogenez. Połączenie różnych strategii omicznych (np. metabolomika nieukierunkowana i celowana, proteomika i transkryptomika pojedynczych komórek) pozwoli na głębsze zrozumienie szlaków chorobowych, które mogą służyć do celowanej interwencji farmakologicznej. Ponadto szybki postęp metodologiczny i instrumentalny w obrazowaniu metodą spektrometrii mas może skutkować dostarczeniem kompleksowych danych na temat subkomórkowej lokalizacji przestrzennej analitów w tkankach, zapewniając tym samym bardziej pełny obraz fizjopatologii badanych tkanek. **Obecnie moja grupa we współpracy z włoskimi partnerami opracowuje takie multiomiczne podejścia, które mają zostać wdrożone w badaniach nad zaburzeniami NCL.**

### **Wnioski i perspektywy na przyszłość**

Wykorzystanie metodologii opracowanej do globalnej analizy interakcji białko-białko w skali całego proteomu umożliwiło zbadanie sieci białek zaburzonych w grupie rzadkich,

dziedzicznych schorzeń - NCL. Zmapowaliśmy wspólny interaktom CLN3-CLN5 ujawniając, że podobieństwa fenotypowe obu chorób mogą bazować na wspólnych mechanizmach molekularnych. Zidentyfikowaliśmy zmiany funkcjonalne związane z niedoborem katepsyny D w modelach mysich, której mutacje są przyczyną choroby CLN10, potwierdziliśmy również udział katepsyny D w procesach adhezji i migracji komórek. Nasze wyniki sugerują, że zmiany cytoszkieletu mogą być krytycznym mediatorem patogenezы choroby, przyczyniając się do zapoczątkowania zmian synaptycznych i zwyrodnienia neuronalnego obserwowanego przy niedoborze katepsyny D. Analizy kompleksów białkowych przeprowadzone na modelu neuronów dopaminergicznych potwierdziły wpływ białka CLN3 na transport przez błonowy, homeostazę lipidów, pobudliwość neuronów i jego udział w autofagii. Indukcja tych komórek ujawniła ich asynchroniczne różnicowanie w kierunku fenotypu neuronalnego. Analiza interaktomu PPT1 pozwoliła określić zupełnie nieznaną do tej pory funkcję tego białka, takie jak migracja neuronów czy udział w szlaku sygnałowym receptora dopaminy. Co więcej, badania nokautu mysiego genu PPT1 ujawniły, że zaburzone funkcje molekularne różnicują w zależności od stopnia zaawansowania choroby, co może być pomocne w opracowywaniu terapii celowanych. Analiza komórek z nadekspresją genu PPT1 typu dzikiego i zmutowanego wykazała wpływ rozregulowanych sieci genów kodujących białka palmitoilowane na proces kiełkowania i proliferację neuronów. Przeprowadziliśmy również kompleksowe badania modelu z nokautem genu CLN5, co pozwoliło na ujawnienie zaburzeń homeostazy mitochondrialnej objawiające się zmniejszonym metabolizmem tlenowym i podwyższoną produkcją reaktywnych form tlenu, a także silny związek obserwowanych zmian z postępem choroby CLN5. Podsumowując, poprzez połączenie globalnej analizy proteomu i transkryptomu z funkcjonalną bioinformatyką, eksploracją baz danych i immunologicznymi technikami walidacyjnymi oraz analizami funkcjonalnymi komórek w modelach NCL, ujawniono funkcje czterech białek NCL, a mianowicie CLN1, CLN3, CLN5 i CLN10 oraz wskazano rozregulowane ścieżki sygnałowe, które stać się mogą w przyszłości celem badań farmaceutycznych. Badania prowadzone na mysich modelach uzupełniliśmy o ludzkie linie nerwiaka SH-SY5Y oraz komórki uzyskane od pacjentów z NCL. Jak wspomniano powyżej, choroby NCL należą do grup schorzeń rzadkich. W związku z tym niewiele ośrodków naukowych zajmuje się tymi schorzeniami, co nie dziwi ze względu na dość ograniczoną dostępność materiału pacjentów do badań. Dlatego też przyszłe prace powinny się skupić na połączeniu informacji uzyskanych z różnych modeli choroby z danymi uzyskanymi od pacjentów z NCL, a także z innymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi wykazującymi podobny obraz fenotypowy.

Ponadto, ponieważ pozyskiwanie funduszy na badania nad rzadkimi chorobami jest sporym wyzwaniem, nasze starania powinny zmierzać ku połączeniu wysiłków różnych grup badawczych rozsianych po całym świecie i podnoszeniu świadomości wśród opinii publicznej. Zastosowanie technologii multiomicznych i przełożenie wniosków na badania kliniczne ułatwi szybszą i dokładniejszą diagnozę, a także rzuci światło na dokładniejszą patogenezę tych chorób. Wykorzystanie podejść biologii systemowej pozwoli na połączenie informacji o podłożu molekularnym procesów zachodzących w NCL uzyskanych w wyniku analizy materiału od pacjentów, z systemów *in vitro*, np. organoidów wyhodowanych z mózgu oraz modeli NCL *in vivo* (myszy z nokautem). Wyniki takich analiz będą podstawą opracowania nowych metod molekularnych ułatwiających szybszą, funkcjonalną i spersonalizowaną diagnostykę chorób rzadkich, typu NCL.

### Literatura uzupełniająca:

Publikacje prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego zaznaczono pogrubioną czcionką i oznaczono dwoma gwiazdkami \*\*. Niektóre z pozycji piśmiennictwa w tym rozdziale dotyczą innych osiągnięć naukowych kandydata. Pozycje te zaznaczone zostały jedną gwiazdką \*.

- 1 Haltia, M. & Goebel, H. H. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1795-1800, doi:10.1016/j.bbadis.2012.08.012 (2013).
- 2 Haltia, M. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 850-856, doi:10.1016/j.bbadis.2006.06.010 (2006).
- 3 Mole, S. E. & Cotman, S. L. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochim Biophys Acta* **1852**, 2237-2241, doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.011 (2015).
- 4 Anderson, G. W., Goebel, H. H. & Simonati, A. Human pathology in NCL. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1807-1826, doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.014 (2013).
- 5 Radke, J., Stenzel, W. & Goebel, H. H. Human NCL Neuropathology. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 2262-2266, doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.007 (2015).
- 6 Cotman, S. L., Karaa, A., Staropoli, J. F. & Sims, K. B. Neuronal ceroid lipofuscinosis: impact of recent genetic advances and expansion of the clinicopathologic spectrum. *Current neurology and neuroscience reports* **13**, 366, doi:10.1007/s11910-013-0366-z (2013).
- 7 Cherukuri, A. *et al.* Immunogenicity to cerliponase alfa intracerebroventricular enzyme replacement therapy for CLN2 disease: Results from a Phase 1/2 study. *Clin Immunol* **197**, 68-76, doi:10.1016/j.clim.2018.09.003 (2018).
- 8 Schulz, A. *et al.* Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. *N Engl J Med* **378**, 1898-1907, doi:10.1056/NEJMoa1712649 (2018).
- 9 Zareba-Kozioł, M., Figiel, I., Bartkowiak-Kaczmarek, A. & Włodarczyk, J. Insights Into Protein S-Palmitoylation in Synaptic Plasticity and Neurological Disorders: Potential and Limitations of Methods for Detection and Analysis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**, doi:ARTN 17510.3389/fnmol.2018.00175 (2018).
- 10 Mirza, M. *et al.* The CLN3 gene and protein: What we know. *Mol Genet Genom Med* **7**, doi:ARTN e85910.1002/mgg3.859 (2019).
- 11 Carcel-Trullols, J., Kovacs, A. D. & Pearce, D. A. Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 2242-2255, doi:10.1016/j.bbadis.2015.04.027 (2015).
- \*\*12 Stelzl, U. *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957-968 (2005).**

- 13 Rual, J. F. *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173-1178 (2005).
- 14 Breitkreutz, A. *et al.* A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* **328**, 1043-1046, doi:10.1126/science.1176495 (2010).
- 15 Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**, 68-76 (2010).
- 16 Bennett, E. J., Rush, J., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell* **143**, 951-965, doi:10.1016/j.cell.2010.11.017 (2010).
- 17 Hein, M. Y. *et al.* A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* **163**, 712-723, doi:10.1016/j.cell.2015.09.053 (2015).
- 18 Uversky, V. N., Oldfield, C. J. & Dunker, A. K. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* **37**, 215-246, doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924 (2008).
- 19 Shimizu, K. & Toh, H. Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network. *J Mol Biol* **392**, 1253-1265, doi:10.1016/j.jmb.2009.07.088 (2009).
- 20 Zhao, R. *et al.* Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**, 715-727 (2005).
- 21 Kaltenbach, L. S. *et al.* Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* **3**, e82 (2007).
- \*22 Goehler, H. *et al.* A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol. Cell* **15**, 853-865 (2004).
- 23 Lim, J. *et al.* A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* **125**, 801-814 (2006).
- 24 Limviphuvadh, V., Tanaka, S., Goto, S., Ueda, K. & Kanehisa, M. The commonality of protein interaction networks determined in neurodegenerative disorders (NDDs). *Bioinformatics* **23**, 2129-2138, doi:10.1093/bioinformatics/btm307 (2007).
- 25 Giorgini, F. & Muchowski, P. J. Connecting the dots in Huntington's disease with protein interaction networks. *Genome Biol.* **6**, 210 (2005).
- 26 Humbert, S. & Saudou, F. The ataxia-ome: connecting disease proteins of the cerebellum. *Cell* **125**, 645-647 (2006).
- 27 Goh, K. I. *et al.* The human disease network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 8685-8890 (2007).
- 28 Lage, K. *et al.* A large-scale analysis of tissue-specific pathology and gene expression of human disease genes and complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 20870-20875 (2008).
- 29 Lage, K. *et al.* A human phenome-interactome network of protein complexes implicated in genetic disorders. *Nat. Biotechnol.* **25**, 309-316 (2007).
- 30 Gersten, M. *et al.* An integrated systems analysis implicates EGR1 downregulation in simian immunodeficiency virus encephalitis-induced neural dysfunction. *J. Neurosci.* **29**, 12467-12476 (2009).
- 31 Perreau, V. M. *et al.* A domain level interaction network of amyloid precursor protein and Abeta of Alzheimer's disease. *Proteomics* **10**, 2377-2395, doi:10.1002/pmic.200900773 (2010).
- 32 Soler-Lopez, M., Zanzoni, A., Lluis, R., Stelzl, U. & Aloy, P. Interactome mapping suggests new mechanistic details underlying Alzheimer's disease. *Genome Res* **21**, 364-376, doi:10.1101/gr.114280.110 (2011).
- \*33 Hosp, F. *et al.* Quantitative interaction proteomics of neurodegenerative disease proteins. *Cell reports* **11**, 1134-1146, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.030 (2015).
- 34 Chen, X. & Burgoyne, R. D. Identification of common genetic modifiers of neurodegenerative diseases from an integrative analysis of diverse genetic screens in model organisms. *BMC Genomics* **13**, 71, doi:10.1186/1471-2164-13-71 (2012).

- 35 Khurana, V. *et al.* Genome-Scale Networks Link Neurodegenerative Disease Genes to alpha-Synuclein through Specific Molecular Pathways. *Cell Syst* **4**, 157-170 e114, doi:10.1016/j.cels.2016.12.011 (2017).
- 36 Na, D., Rouf, M., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. & Gsponer, J. NeuroGeM, a knowledgebase of genetic modifiers in neurodegenerative diseases. *BMC Med Genomics* **6**, 52, doi:10.1186/1755-8794-6-52 (2013).
- 37 Haenig, C. *et al.* Interactome Mapping Provides a Network of Neurodegenerative Disease Proteins and Uncovers Widespread Protein Aggregation in Affected Brains. *Cell reports* **32**, 108050, doi:10.1016/j.celrep.2020.108050 (2020).
- 38 Stroedicke, M. *et al.* Systematic interaction network filtering identifies CRMP1 as a novel suppressor of huntingtin misfolding and neurotoxicity. *Genome Res.*, doi:10.1101/gr.182444.114 (2015).
- 39 Kollmann, K. *et al.* Cell Biology and Function of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis-related Proteins. *Biochim Biophys Acta* **S0925-4439(13)00033-1**. (2013).
- 40 Koch, S. *et al.* Morphologic and functional correlates of synaptic pathology in the cathepsin D knockout mouse model of congenital neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 1089-1096, doi:10.1097/NEN.0b013e318238fc28 (2011).
- \*\*41 Koch, S. *et al.* Cathepsin D deficiency induces cytoskeletal changes and affects cell migration pathways in the brain. *Neurobiol Dis* **50**, 107-119, doi:10.1016/j.nbd.2012.10.004 (2013).**
- 42 Fritchie, K. *et al.* Novel mutation and the first prenatal screening of cathepsin D deficiency (CLN10). *Acta Neuropathol.* **117**, 201-208, doi:10.1007/s00401-008-0426-7 (2009).
- 43 Siintola, E. *et al.* Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **129**, 1438-1445 (2006).
- \*\*44 Scifo, E. *et al.* Drafting the CLN3 protein interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: a label-free quantitative proteomics approach. *J Proteome Res* **12**, 2101-2115, doi:10.1021/pr301125k (2013).**
- 45 An Haack, K. *et al.* Screening for calcium channel modulators in CLN3 siRNA knock down SH-SY5Y neuroblastoma cells reveals a significant decrease of intracellular calcium levels by selected L-type calcium channel blockers. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 186-191, doi:10.1016/j.bbagen.2010.09.004 (2011).
- 46 Karsan, A. The role of notch in modeling and maintaining the vasculature. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **83**, 14-23, doi:10.1139/y04-125 (2005).
- 47 Kitao, Y. *et al.* Does ORP150/HSP12A protect dopaminergic neurons against MPTP/MPP(+)-induced neurotoxicity? *Antioxidants & redox signaling* **9**, 589-595, doi:10.1089/ars.2006.1518 (2007).
- 48 Aberg, L. E., Rinne, J. O., Rajantie, I. & Santavuori, P. A favorable response to antiparkinsonian treatment in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurology* **56**, 1236-1239 (2001).
- 49 Skarra, D. V. *et al.* Label-free quantitative proteomics and SAINT analysis enable interactome mapping for the human Ser/Thr protein phosphatase 5. *Proteomics* **11**, 1508-1516, doi:10.1002/pmic.201000770 (2011).
- \*50 Horn, S. C. *et al.* Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2. *J Neural Transm* **113**, 1081-1090 (2006).**
- 51 Cao, Y. *et al.* Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* **281**, 20483-20493, doi:10.1074/jbc.M602180200 (2006).
- 52 Tynnela, J., Cooper, J. D., Khan, M. N., Shemilts, S. J. & Haltia, M. Hippocampal pathology in the human neuronal ceroid-lipofuscinoses: distinct patterns of storage deposition, neurodegeneration and glial activation. *Brain Pathol.* **14**, 349-357 (2004).
- \*\*53 Scifo, E. *et al.* Quantitative analysis of PPT1 interactome in human neuroblastoma cells. *Data in Brief* **4**, 207-216 (2015).**
- \*\*54 Scifo, E. *et al.* Proteomic analysis of the palmitoyl protein thioesterase 1 interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Proteomics* **123**, 42-53, doi:10.1016/j.jprot.2015.03.038 (2015).**

- 55 Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359-362, doi:10.1038/nmeth.1322 (2009).
- 56 Cho, S. & Dawson, G. Palmitoyl protein thioesterase 1 protects against apoptosis mediated by Ras-Akt-caspase pathway in neuroblastoma cells. *J Neurochem* **74**, 1478-1488 (2000).
- 57 Hellsten, E., Vesa, J., Olkkonen, V. M., Jalanko, A. & Peltonen, L. Human palmitoyl protein thioesterase: evidence for lysosomal targeting of the enzyme and disturbed cellular routing in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *EMBO J* **15**, 5240-5245 (1996).
- 58 Chu-LaGriff, Q., Blanchette, C., O'Hern, P. & Denefrio, C. The Batten disease Palmitoyl Protein Thioesterase 1 gene regulates neural specification and axon connectivity during *Drosophila* embryonic development. *PLoS ONE* **5**, e14402, doi:10.1371/journal.pone.0014402 (2010).
- 59 Ahtiainen, L. *et al.* Palmitoyl protein thioesterase 1 (Ppt1)-deficient mouse neurons show alterations in cholesterol metabolism and calcium homeostasis prior to synaptic dysfunction. *Neurobiol Dis* **28**, 52-64 (2007).
- 60 Sapir, T. *et al.* The Interactome of Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 (PPT1) Affects Neuronal Morphology and Function. *Front Cell Neurosci* **13**, 92, doi:10.3389/fncel.2019.00092 (2019).
- 61 Bible, E., Gupta, P., Hofmann, S. L. & Cooper, J. D. Regional and cellular neuropathology in the palmitoyl protein thioesterase-1 null mutant mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* **16**, 346-359, doi:10.1016/j.nbd.2004.02.010 (2004).
- 62 Gupta, P. *et al.* Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13566-13571, doi:10.1073/pnas.251485198 (2001).
- 63 Jalanko, A. *et al.* Mice with Ppt1Deltaex4 mutation replicate the INCL phenotype and show an inflammation-associated loss of interneurons. *Neurobiol. Dis.* **18**, 226-241 (2005).
- 64 von Schantz, C. *et al.* Brain gene expression profiles of Cln1 and Cln5 deficient mice unravels common molecular pathways underlying neuronal degeneration in NCL diseases. *BMC Genomics* **9**, 146 (2008).
- \*\*65 Tikka, S. *et al.* Proteomic Profiling in the Brain of CLN1 Disease Model Reveals Affected Functional Modules. *Neuromolecular medicine* **18**, 109-133, doi:10.1007/s12017-015-8382-6 (2016).**
- \*66 Mainini, V. *et al.* MALDI-Imaging Mass Spectrometry on Tissues. *Methods in molecular biology* **1243**, 139-164, doi:10.1007/978-1-4939-1872-0\_8 (2015).**
- 67 Braakman, R. B. *et al.* Optimized nLC-MS workflow for laser capture microdissected breast cancer tissue. *J Proteomics* **75**, 2844-2854, doi:10.1016/j.jprot.2012.01.022 (2012).
- 68 Blom, T. *et al.* Exacerbated neuronal ceroid lipofuscinosis phenotype in Cln1/5 double-knockout mice. *Disease models & mechanisms* **6**, 342-357, doi:10.1242/dmm.010140 (2013).
- 69 Sleat, D. E. *et al.* Analysis of Brain and Cerebrospinal Fluid from Mouse Models of the Three Major Forms of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Reveals Changes in the Lysosomal Proteome. *Mol Cell Proteomics* **18**, 2244-2261, doi:10.1074/mcp.RA119.001587 (2019).
- 70 Meyer, M., Kovacs, A. D. & Pearce, D. A. Decreased sensitivity of palmitoyl protein thioesterase 1-deficient neurons to chemical anoxia. *Metab Brain Dis* **32**, 275-279, doi:10.1007/s11011-016-9919-6 (2017).
- 71 Gimenez-Cassina, A., Lim, F. & Diaz-Nido, J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res* **84**, 755-767, doi:10.1002/jnr.20976 (2006).
- \*\*72 Pezzini, F. *et al.* Transcriptomic Profiling Discloses Molecular and Cellular Events Related to Neuronal Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cellular and molecular neurobiology* **37**, 665-682, doi:10.1007/s10571-016-0403-y (2017).**
- 73 da Rocha, J. F., da Cruz e Silva, O. A. & Vieira, S. I. Analysis of the amyloid precursor protein role in neuritogenesis reveals a biphasic SH-SY5Y neuronal cell differentiation model. *J Neurochem* **134**, 288-301, doi:10.1111/jnc.13133 (2015).
- \*\*74 Pezzini, F. *et al.* The Networks of Genes Encoding Palmitoylated Proteins in Axonal and Synaptic Compartments Are Affected in PPT1 Overexpressing Neuronal-Like Cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **10**, doi:10.3389/fnmol.2017.00266 (2017).**

- 75 Lyly, A. *et al.* Glycosylation, transport, and complex formation of palmitoyl protein thioesterase 1 (PPT1)--distinct characteristics in neurons. *BMC Cell Biol* **8**, 22 (2007).
- 76 Henderson, M. X. *et al.* Neuronal ceroid lipofuscinosis with DNAJC5/CSPalpha mutation has PPT1 pathology and exhibit aberrant protein palmitoylation. *Acta Neuropathol* **131**, 621-637, doi:10.1007/s00401-015-1512-2 (2016).
- 77 Bagh, M. B. *et al.* Misrouting of v-ATPase subunit V0a1 dysregulates lysosomal acidification in a neurodegenerative lysosomal storage disease model. *Nature communications* **8**, 14612, doi:10.1038/ncomms14612 (2017).
- 78 Holland, S. M. & Thomas, G. M. Roles of palmitoylation in axon growth, degeneration and regeneration. *J Neurosci Res* **95**, 1528-1539, doi:10.1002/jnr.24003 (2017).
- 79 Das, A. M., von Harlem, R., Feist, M., Lucke, T. & Kohlschutter, A. Altered levels of high-energy phosphate compounds in fibroblasts from different forms of neuronal ceroid lipofuscinoses: further evidence for mitochondrial involvement. *Eur J Paediatr Neurol* **5 Suppl A**, 143-146 (2001).
- 80 Pezzini, F. *et al.* Involvement of the mitochondrial compartment in human NCL fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **416**, 159-164, doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.016 (2011).
- \*\*81 Doccini, S. *et al.* Proteomic and functional analyses in disease models reveal CLN5 protein involvement in mitochondrial dysfunction. *Cell death discovery* **6**, **18**, doi:10.1038/s41420-020-0250-y (2020).**
- \*82** Lalowski, M. M. *et al.* Characterizing the Key Metabolic Pathways of the Neonatal Mouse Heart Using a Quantitative Combinatorial Omics Approach. *Frontiers in Physiology* **9**, doi:10.3389/fphys.2018.00365 (2018).
- \*83** Laakkonen, E. K. *et al.* Estrogenic regulation of skeletal muscle proteome: a study of premenopausal women and postmenopausal MZ cotwins discordant for hormonal therapy. *Aging Cell* **16**, 1276-1287, doi:10.1111/accel.12661 (2017).
- 84 Holmberg, V. *et al.* The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. *Neurobiol Dis* **16**, 29-40 (2004).
- 85 Kopra, O. *et al.* A mouse model for Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, CLN5, reveals neuropathology associated with early aging. *Hum Mol Genet* **13**, 2893-2906 (2004).
- \*\*86 Scifo, E. *et al.* Recent advances in applying mass spectrometry and systems biology to determine brain dynamics. *Expert Rev Proteomics* **14**, **545-559**, doi:10.1080/14789450.2017.1335200 (2017).**
- 87 Ornatsky, O. *et al.* Highly multiparametric analysis by mass cytometry. *J Immunol Methods* **361**, 1-20, doi:10.1016/j.jim.2010.07.002 (2010).
- 88 Welzel, G., Seitz, D. & Schuster, S. Magnetic-activated cell sorting (MACS) can be used as a large-scale method for establishing zebrafish neuronal cell cultures. *Scientific reports* **5**, 7959, doi:10.1038/srep07959 (2015).
- 89 Dammer, E. B. *et al.* Neuron enriched nuclear proteome isolated from human brain. *J Proteome Res* **12**, 3193-3206, doi:10.1021/pr400246t (2013).

#### **d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych**

Wykaz publikacji nie wchodzących w skład głównego osiągnięcia naukowego znajduje się w załączniku nr 4.

Swoje zainteresowania mechanizmem powstawania płytek amyloidowych A $\beta$  rozpocząłem już na etapie studiów doktoranckich prowadzonych w laboratorium pod kierunkiem prof. Blasa Frangione, na Wydziale Patologii, NYU Medical Center, w Nowym Jorku. Był to wspólny program prowadzony z Instytutem Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej



PAN w Warszawie (obecnie im. M. Mossakowskiego; lata 1992-1996). Po powrocie z USA, spędziłem rok w Warszawie, badając mechanizmy modyfikatorów genetycznych choroby Alzheimera i próbując potwierdzić rolę białka apolipoproteiny E (APOE) jako czynnika ryzyka choroby Alzheimera (AD) w polskiej populacji (Lalowski i inni, *Acta Neurobiol Exp*, 1998 i 2001 oraz Kieszek i inni, *Alzheimer Reports*, 1999). **Były to pierwsze na ten temat opublikowane raporty w Polsce.** Badania te zostały następnie kontynuowane w kolejnych publikacjach dotyczących roli APOE w AD (Czyżewski i inni, 2001 oraz Luczywek E i in., *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2002), w których jestem współautorem<sup>90-93</sup>. Za te osiągnięcia zostałem nagrodzony prestiżowym stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w latach 1996-1997 (<https://www.fnnp.org.pl/laureaci-start-1996/>).

W kolejnym etapie postanowiłem poszerzyć zakres moich możliwości badawczych i odbyłem pierwszy staż podoktorski na Wydziale Patologii, Uniwersytetu Helsińskiego w latach 1998-2001. Moje badania koncentrowały się na różnych aspektach formowania cytoszkieletu i zmian w białkach wchodzących w jego skład w zaburzeniach neurodegeneracyjnych i mięśniowych (w szczególności białkach, **białku dystrofii obręczowo-kończynowej typu 1A, LGMD1A- miotylinie (MYOT)** i jego pierwszym opisanym ludzkim homologu **palladynie (PALLD)**). Podczas tego stażu opracowałem i zoptymalizowałem protokoły oczyszczania, ekspresji i charakteryzowania nierozpuszczalnych białek cytoszkieletowych przy użyciu metod klasycznej biologii molekularnej, chemii białek, biologii strukturalnej i spektrometrii mas. Staż podoktorski zaowocował trzema publikacjami w czasopismach: *Human Molecular Genetics* (cytowana **105** razy), *Molecular Biology of the Cell* (cytowana **107** razy) i *Biochemical Biophysical Research Communications* (cytowana **17** razy)<sup>94-96</sup>.

Aby kontynuować studia w dziedzinie proteomiki i neurodegeneracji, w kierunku biologii systemowej, w lutym 2002 r. dołączyłem do grupy wiodącego eksperta w dziedzinie sieci białkowych i zaburzeń neurodegeneracyjnych, prof. Ericha E. Wankera z Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine. Głównym celem moich prac badawczych w MDC była próba zrozumienia lokalnych sieci komórkowych powstających w wyniku interakcji białko-białko (PPI), i odgrywających istotną rolę w rozwoju chorób człowieka na poziomie biologii systemu. Brałem czynny udział w zorganizowaniu specjalistycznego zespołu, wykwalifikowanego w zastosowaniu wysokoprzepustowych metod biologicznych przydatnych do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu zaburzeń neurodegeneracyjnych. Opracowanie zautomatyzowanego drożdżowego systemu dwuhybrydowego do analiz ludzkich PPI zaowocowało powstaniem kilku szeroko cytowanych w świecie nauki publikacji.

Opublikowany przez nasz zespół, w 2005 roku, w czasopiśmie *Cell*, ludzki interaktom stanowił źródło anotacji do dalszych badań ludzkiego proteomu<sup>12</sup>.

Jednocześnie pracowaliśmy nad opracowaniem sieci interakcji białko-białko dla innego ludzkiego schorzenia neurodegeneracyjnego, choroby Huntingtona (HD). Dzięki połączeniu biblioteki i platformy Y2H nasz zespół, jako pierwszy na świecie stworzył sieć PPI dla choroby Huntingtona. Wspomniana sieć zawiera 186, głównie nowych interakcji pomiędzy 86 różnymi białkami, a białkiem huntingtyną (Htt), odpowiedzialnym za rozwój HD (*Mol Cell*, 2004)<sup>22</sup>. Korzystając z opracowanej sieci PPI udało nam się zidentyfikować białko GIT1, silnie stymulujące tworzenie agregatów zmutowanego białka Htt. Przeprowadzone następnie badania immunohistochemiczne wykazały, że białko GIT1 jest obecne w neuronalnych wtrętach jądrowych, które są cechą charakterystyczną w patogenezie HD. Zasugerowaliśmy więc, że utrata funkcji białka GIT1 lub jego niewłaściwa lokalizacja w neuronach przyczynia się do nasilenia procesu chorobowego (Göhler i wsp., 2004). **Opublikowana w czasopiśmie *Molecular Cell* praca na ten temat była cytowana do tej pory ponad 300 razy.** Wyniki te pokazały, że systematyczne mapowanie interakcji w połączeniu z podejściami opartymi na hipotezach, koncentrujących się na konkretnych i medycznie istotnych pytaniach, mogą prowadzić do identyfikacji potencjalnych modyfikatorów chorób neurodegeneracyjnych. Innowacyjne metodologie opracowane w powyższych badaniach zostały następnie wykorzystane w moich kolejnych projektach dotyczących chorób Parkinsona (Dachsel i wsp., 2005<sup>97</sup>) i Huntingtona. Z wykorzystaniem metody Y2H zweryfikowaliśmy między innymi interakcję pomiędzy białkami Htt i GASP2, biorącym udział w degradacji receptora błonowego w HD. Badane interakcje zostały dodatkowo zwalidowane z wykorzystaniem techniki koimmunoprecypitacji i kolokoalizacji w komórkach SH-SY5Y. Zademonstrowaliśmy, że białka Htt i GASP2 formują kompleksy w komórkach SH-SY5Y oraz mają możliwość interakcji w komórkach neuronalnych (Horn i wsp., 2006)<sup>50</sup>. Dzięki opracowaniu wspomnianych sieci PPI, możliwe stało się opracowanie kompleksowej mapy interaktomu ludzkiego.

W kolejnym etapie mojej kariery naukowej rozpocząłem wspólne badania z grupami badawczymi M. Vidala, AL Barabasiego, J. Taverniera i E. Wankera, w celu utworzenia zintegrowanej platformy, dostarczającej dane wysokiej jakości na temat interakcji białko-białko w chorobach neurodegeneracyjnych. Badania te zaowocowały w 2009 powstaniem publikacji w czasopiśmie *Nature Methods* (**praca cytowana ponad 500 razy**)<sup>98</sup>. W latach 2005-08 byłem również kierownikiem projektu, w którym generowano i analizowano w sposób funkcjonalny przeciwciała wytwarzane przeciwko ponad 120 różnym ludzkim

białkom związanym z HD i innymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi (projekt NGFN2 KB-P04T03).

Kolejny projekt, w którym miałem przyjemność uczestniczyć, dedykowany był opracowaniu metod bioinformatycznych do oceny zestawów danych pochodzących z analiz technikami spektrometrii mas. Uzyskane wyniki umożliwiły badania natywnych kompleksów białkowych i doprowadziły do powstania trzech publikacji (cytowane ogółem 52 razy, Wolski i inni, 2005, 2005a, 2006) <sup>99-101</sup>.

Podsumowując, okres mojej kariery, który spędziłem w Berlinie zaowocował powstaniem **8 recenzowanych publikacji** (załącznik nr 4), **17 prezentacjami plakatowymi** oraz **2 patentami** dotyczącymi metodologii badań przesiewowych Y2H (EP03013957.0.) i sieci HD (EP04030994.0). W tym czasie byłem również promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich dotyczących rozwoju metod opartych o spektrometrię mas i mechanizmów agregacji huntingtyny w mózgu w chorobie HD.

Za osiągnięcia w badaniach schorzeń neurodegeneracyjnych, opublikowanych w 13 pracach, w listopadzie 2011 roku zostałem nagrodzony w Finlandii tytułem docenta (**Dosentti/Adjunct Professor**). Wymagania dotyczące tytułu docenta na uniwersytecie w Helsinkach obejmują badania naukowe równoważne co najmniej dwóm rozprawom doktorskim opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Moja aplikacja była oceniana przez niezależnych recenzentów.

W ramach mojej pracy naukowej opracowuję również i wdrażam różne technologie proteomiczne, między innymi obrazowanie tkanek metodami spektrometrii mas MALDI (MALDI-MSI), umożliwiające ustalanie przestrzennych i molekularnych rozkładów cząsteczek w różnych stanach chorobowych bezpośrednio w tkankach. Przykładem takich badań jest np. analiza składu płytek A $\beta$  w rzadkim genetycznym wariacie choroby Alzheimera (tzw. mutacja „arktyczna”, E22G w pozycji 22 peptydu A $\beta$ ; *Neurobiol of Aging*, 2012; *Acta Neuropathol Commun*, 2013 <sup>102,103</sup>). Ostatnio z powodzeniem zastosowaliśmy również technikę MSI w celu wyjaśnienia mechanizmu działania leku przeciwcukrzycowego – metforminy, w wątrobie (*Front Pharmacol*, 2018 <sup>104</sup> oraz komentarz do artykułu). Stosując techniki obrazowania, systematycznie analizujemy także mechanizmy penetracji leków przeciwnowotworowych oraz wykorzystanie przez nich poszczególnych szlaków metabolicznych w celu dotarcia do tkanek docelowych (umowa z firmą Pfizer, **załącznik 4**).

Zainicjowałem również szereg współprac, których celem była analiza kompleksów białkowych powiązanych z chorobami mózgu, na przykład, opisane w *PNAS*, 2012 <sup>105</sup>; *Nature Commun*, 2013 <sup>106</sup>; *Mol Cell Proteomics*, 2014 <sup>107</sup>, *Cell Reports*, 2015 <sup>33</sup>, lub

związanych ze zmianami w dynamice proteomu w różnych stanach chorobowych, np. *Aging Cell*, 2017<sup>83</sup>; *Nature Commun*, 2018<sup>108</sup>; *Rheumatology (London)*, 2019<sup>109</sup>; *Cell Mol Life Sci*, 2019<sup>110</sup> (pełna lista publikacji, **załącznik nr 4**).

Moja grupa badawcza, przy finansowym wsparciu Akademii Fińskiej (projekt PropAD, JPND-coFUND; <http://pahnelab.eu/funding/prop-ad-jpnd/>; projekt zakończony 31.12.2019), koncentrowała się na ustaleniu dróg propagacji peryferyjnie podawanego amyloidu  $\beta$  (A $\beta$ ) do mózgu. Projekt ten był wspólnie realizowany z grupami badawczymi z Uniwersytetu w Oslo (Norwegia), Karolinska Institutet (Szwecja), Uniwersytetu w Tel Aviv (Izrael) oraz Uniwersytetu w Moguncji (Niemcy). W tym celu wykorzystaliśmy transgeniczny myszy model AD, APPPS1 wzbogacany określonymi ilościami znakowanych <sup>15</sup>N peptydów A $\beta$ 1-40/42. Znakowane izotopowo peptydy A $\beta$ , podawano dootrzewnowo myszom, aby śledzić profil odkładania się peptydów amyloidu w różnych punktach czasowych w różnych strukturach mózgu i narządach obwodowych. W ramach projektu stworzyliśmy platformę do identyfikacji amyloidu w otrzymanych próbkach na poziomie attomolarnym i monitorowaliśmy, w jaki sposób znakowane peptydy A $\beta$  pochodzące z wstrzykniętych otrzewnowo ekstraktów mózgu, są w stanie przeniknąć do różnych narządów obwodowych i struktur mózgowych u myszy APPPS1. W tych eksperymentach zmierzaliśmy nieznaczne ilości znakowanego węglem <sup>13</sup>C na lizynie (<sup>13</sup>C-Lys) A $\beta$  zdolnego do penetracji mózgu, co stanowiło poniżej 0,01% całkowitego zmierzonego A $\beta$ , w setnym dniu po inokulacji. Tkankę mózgową poddano dalszej ilościowej i jakościowej ocenie pod kątem obecności A $\beta$  w płytkach starczych oraz poziomu aktywacji komórek mikrogleju. Jak oceniono na podstawie ilościowych pomiarów <sup>13</sup>C-Lys A $\beta$  w mózgu, podawanie A $\beta$  poprzez krążenie nie powoduje jego aktywnego transportu do mózgu, bądź proces ten zachodzi na bardzo niskim poziomie. Planujemy, aby te ustalenia i opracowane metodologie były dalej realizowane w ramach wspólnego grantu finansowanego przez UE. Badania te mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów odkładania oraz usuwania A $\beta$  w mózgu z AD.

Kolejny projekt, który realizujemy do **31.12.2021 roku** dotyczy roli mikrogleju w ciężkich zaburzeniach depresyjnych (Major Depressive Disorders, MDD), (projekt **ERANET-Neuron coFUND MicroSynDEP**; <https://www.neuron-eranet.eu/en/790.php>). Projekt ten realizowany jest we współpracy z grupami badawczymi z CRCHU de Québec-Université Laval (Montreal-Kanada), Istituto Superiore di Sanità (Rzym- Włochy), DZNE (Bonn-Niemcy), Instytutem im. Nenckiego, PAN (Warszawa- Polska), King' s College London (Londyn, Wielka Brytania). MDD jest jednym z najpoważniejszych wyzwań dla zdrowia publicznego, zarówno pod względem klinicznym i społecznym, jak i ekonomicznym,

pochłaniającym ponad 120 miliardów euro w samej Europie. Jednak metody umożliwiające modulowanie funkcji mikrogleju wciąż są mało obiecujące w tworzeniu nowych i skuteczniejszych strategii terapeutycznych w leczeniu MDD. Rolą mojej grupy badawczej w tym projekcie jest wykorzystanie i optymalizacja różnych ilościowych platform proteomicznych w połączeniu z badaniami metabolomicznymi i bioinformatyką funkcjonalną do wyjaśnienia upośledzenia funkcji mikrogleju oraz jego interakcji z synapsami w MDD. W tym celu wykorzystujemy różne modele mysie i materiał biologiczny pobrany od pacjentów w ośrodkach w Kanadzie, Niemczech i we Włoszech.

Trzeci międzynarodowy projekt badawczy (<https://sztest.eu/>), którego jestem jednym z liderów, trwający do **31.12.2021**, koncentruje się na opracowaniu narzędzi do diagnostyki molekularnej i wczesnego wykrywania schizofrenii. W tym projekcie mój zespół wykorzystuje narzędzia spektrometrii mas do oszacowania markerów białkowych schizofrenii, w tym ich wykrywaniu i charakterystyce specyficznych dla neuronów czynników transkrypcyjnych (manuskrypt po recenzji, Vanaveski *et al.*).

W obliczu nadchodzącej ery medycyny spersonalizowanej kluczowe jest zrozumienie, w jaki sposób komórki funkcjonują zarówno w stanie normy jak i patologii. Wyjaśnienie dynamiki syntezy białek i identyfikacja kompleksowych zmian zachodzących w ich chemicznej budowie oraz dystrybucji komórkowej jest w tym kontekście niezwykle istotne. Opracowana przez mój zespół metodologia, nie tylko umożliwi badania dynamiki proteomu mózgu, ale również dostarcza informacji o interakcjach zachodzących w komórkach w różnych stanach patologicznych. Wsparcie stosowanymi przez nas technikami obrazowania metodami spektrometrii mas, mikrodysekcji laserowej i wiedzą neuropatologiczną, a także innymi już istniejącymi platformami w IChB i helsińskim kampusie Meilahti, może przyczynić się do identyfikacji zmian specyficznych dla chorób neurodegeneracyjnych i przyczynić się do osiągnięcia dalekosiężnego celu, jakim jest opracowanie strategii terapeutycznych tych chorób.

Należy również podkreślić, jak istotne jest połączenie stosowanych w moich badaniach, proteomiki/neuronauki/spektrometrii mas z innymi, alternatywnymi dyscyplinami naukowymi i współpracą z różnymi grupami badawczymi. Obecnie, kładę duży nacisk na ten aspekt i rozwijam intensywnie różne współprace naukowe z grupami z Finlandii i innych krajów, nie tylko europejskich. Moim zdaniem, takie współdziałanie powinno być oparte, nie tylko na opracowywaniu metodologii, ale także obejmować kompleksową analizę danych.

Kolejną zasadą, która według mnie jest niezwykle istotna, jest utrzymywanie monotematycznej, własnej linii badawczej, ale i równoległe służeńie społeczności naukowej.

Mając na uwadze tę zasadę, uczestniczyłem w organizacji trzech, bardzo silnych filarów (grupa badawcza / placówka usługowa / zajęcia dydaktyczne) w Klinicznym Ośrodku Proteomicznym, w kampusie Meilahti w Helsinkach.

W sierpniu 2020 roku rozpocząłem pracę w niepełnym wymiarze godzin w Zakładzie Proteomiki Biomedycznej (Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu), w celu opracowania różnych metod obliczeniowych wspomagających analizę danych omicznych. W podsumowaniu, wprowadzając osobisty aspekt, odkąd zaprzyjaźniłem się z kilkoma badaczami z instytutu ICHB PAN, a także odkąd poznałem ich dokonania badawcze prezentowane na różnych sympozjach naukowych i pracy w zarządzie Fińskiego Towarzystwa Proteomicznego a także czasopiśmie *Frontiers of Molecular Neuroscience*, myślę, że byłoby istotne, aby móc połączyć moje badania z ich dokonaniem, wspólnie rozwijając działania eksperymentalne i edukacyjne.

Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR) dla artykułów niedotyczących osiągnięcia habilitacyjnego wynosi: **254.673**. Łączna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MniSW<sub>2019</sub>) wynosi **5490**. Łączna liczba cytowań według bazy danych WoS (dostęp: 13.11.2020) to **2070** (bez autocytowań). W 17 pracach jestem pierwszym autorem lub autorem korespondencyjnym. Mój zespół badawczy współpracuje obecnie z ponad 20 grupami z całego świata, w tym z Polski. Mój indeks Hirscha wynosi **21** (WoS).

#### Literatura uzupełniająca:

Niektóre z cytowanych pozycji literatury w tym rozdziale znajdują się w spisie literatury odnoszącej się do osiągnięcia naukowego i są zaznaczone gwiazdką \*.

- 90 Czyzewski, K., Lalowski, M. M., Pfeffer, A. & Barcikowska, M. Lipid metabolism parameters in patients with Alzheimer's disease and their first degree relatives. *Acta neurobiologiae experimentalis* **61**, 21-26 (2001).
- 91 Lalowski, M. M., Czyzewski, K., Pfeffer, A., Barcikowska, M. & Kwiecinski, H. ApoE polymorphism in Polish patients with Alzheimer's disease. *Acta neurobiologiae experimentalis* **58**, 65-68 (1998).
- 92 Luczywek, E. *et al.* Cognitive deficits and polymorphism of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **13**, 171-177 (2002).
- 93 Luczywek, E. *et al.* [Patterns of cognitive impairment and apolipoprotein genotype in persons with Alzheimer's disease]. *Neurologia i neurochirurgia polska* **35**, 1021-1033 (2001).
- 94 Mogni, L., Moza, M., Lalowski, M. M. & Carpen, O. Characterization of mouse myotilin and its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 1001-1009, doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.074 (2005).
- 95 Mykkanen, O. M. *et al.* Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Mol Biol Cell* **12**, 3060-3073 (2001).

- 96 Salmikangas, P. *et al.* Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet* **12**, 189-203 (2003).
- 97 Dachsel, J. C. *et al.* Parkin interacts with the proteasome subunit alpha4. *FEBS Lett* **579**, 3913-3919, doi:10.1016/j.febslet.2005.06.003 (2005).
- 98 Venkatesan, K. *et al.* An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**, 83-90 (2009).
- 99 Wolski, W. E. *et al.* Analytical model of peptide mass cluster centres with applications. *Proteome science* **4**, 18, doi:10.1186/1477-5956-4-18 (2006).
- 100 Wolski, W. E., Lalowski, M., Jungblut, P. & Reinert, K. Calibration of mass spectrometric peptide mass fingerprint data without specific external or internal calibrants. *BMC Bioinformatics* **6**, 203, doi:10.1186/1471-2105-6-203 (2005).
- 101 Wolski, W. E. *et al.* Transformation and other factors of the peptide mass spectrometry pairwise peak-list comparison process. *BMC Bioinformatics* **6**, 285, doi:10.1186/1471-2105-6-285 (2005).
- 102 Kalimo, H. *et al.* The Arctic AbetaPP mutation leads to Alzheimer's disease pathology with highly variable topographic deposition of differentially truncated Abeta. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 60, doi:10.1186/2051-5960-1-60 (2013).
- 103 Philipson, O. *et al.* The Arctic amyloid-beta precursor protein (AbetaPP) mutation results in distinct plaques and accumulation of N- and C-truncated Abeta. *Neurobiol Aging* **33**, 1010 e1011-1013, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.022 (2012).
- 104 Calza, G. *et al.* Lactate-Induced Glucose Output Is Unchanged by Metformin at a Therapeutic Concentration - A Mass Spectrometry Imaging Study of the Perfused Rat Liver. *Frontiers in pharmacology* **9**, 141, doi:10.3389/fphar.2018.00141 (2018).
- 105 Chua, J. J. *et al.* Phosphorylation-regulated axonal dependent transport of syntaxin 1 is mediated by a Kinesin-1 adapter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5862-5867, doi:10.1073/pnas.1113819109 (2012).
- 106 Krauss, S. *et al.* Translation of HTT mRNA with expanded CAG repeats is regulated by the MID1-PP2A protein complex. *Nature communications* **4**, 1511, doi:10.1038/ncomms2514 (2013).
- 107 Zareba-Kozioł, M., Szwałda, A., Dadlez, M., Wyslouch-Cieszynska, A. & Lalowski, M. Global Analysis of S-nitrosylation Sites in the Wild Type (APP) Transgenic Mouse Brain-Clues for Synaptic Pathology. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2288-2305, doi:10.1074/mcp.M113.036079 (2014).
- 108 Piazza, R. *et al.* SETBP1 induces transcription of a network of development genes by acting as an epigenetic hub. *Nature communications* **9**, 2192, doi:10.1038/s41467-018-04462-8 (2018).
- 109 Barreto, G. *et al.* Functional analysis of synovial fluid from osteoarthritic knee and carpometacarpal joints unravels different molecular profiles. *Rheumatology (Oxford)* **58**, 897-907, doi:10.1093/rheumatology/key232 (2019).
- 110 Arasu, U. T. *et al.* HAS3-induced extracellular vesicles from melanoma cells stimulate IHH mediated c-Myc upregulation via the hedgehog signaling pathway in target cells. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-019-03399-5 (2019).

## **e) Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.**

### **I. Zakres doświadczenia pedagogicznego w zakresie edukacji podstawowej:**

**1989-1990:** Nauczyciel biologii w 41-liceum w Warszawie (liceum im Joachima Lelewela; <http://www.lelewel.waw.pl/>)

Uniwersytet w Helsinkach (Wydział medyczny; lata 2008-2020; kursy dla studentów medycyny oraz dla magistrantów)

- 1) Organizacja zajęć laboratoryjnych na kursie **Basic Metabolism** dla studentów medycyny 1 roku (listopad-grudzień **2011**, listopad-grudzień **2012** oraz listopad-grudzień **2013**). Organizacja egzaminów kursowych (2013, 2014).
- 2) **30496 TRANSMED Introduction to proteomics and metabolomics (2015-2017)**, zaprojektowanie kursu, wykłady, laboratorium, nadzór nad egzaminami
- 3) **TMED-912 Introduction to Clinical Proteomics (2018-2020, )**, zaprojektowanie kursu, wykłady, laboratorium, nadzór nad egzaminami (<https://moodle.helsinki.fi/course/view.php?id=32841>),
- 4) Kurs: 375005 Solun rakenne ja toiminta/Cellens struktur och function/cell structure and function (prowadzenie grup w języku angielskim w oparciu o Problem Based Learning, PBL, przygotowanie do egzaminów i nadzór nad egzaminami, **2014-2020**),
- 5) Planowanie kursu i ogólny nadzór nad przebiegiem zajęć: Immunological methods **2013-2018**,
- 6) Planowanie kursu i ogólny nadzór nad przebiegiem zajęć: Measurement techniques for Bioinformatics **2014-2015**,
- 7) Kurs: Molekyylibiologia / Molekylärbiologi / Molecular Biology (prowadzenie grup w języku angielskim w oparciu o Problem Based Learning, PBL, przygotowanie do egzaminów i nadzór nad egzaminami, **2014-2015**),
- 8) Kurs: Perimä ja Kehitys / Genom och utveckling / Genome and Development (prowadzenie grup w języku angielskim w oparciu o Problem Based Learning, PBL, przygotowanie do egzaminów i nadzór nad egzaminami, **2016-2020**).
- 9) Kurs: Clinical proteomics for dummies (2016-2019) dla studentów medycyny (zaprojektowanie kursu, wykłady, laboratorium), <https://moodle.helsinki.fi/course/view.php?id=27430>
- 10) Kurs: **NEU-561 Principles of bioscience omics (2018-2020)**, Proteomics and mass spectrometry imaging module (zaprojektowanie kursu, wykłady, laboratorium, nadzór nad egzaminami), <https://moodle.helsinki.fi/course/search.php?search=neu-561>

## **II. Zakres doświadczenia pedagogicznego w zakresie edukacji doktorantów i postdocs:**

Max Delbrück Center; lata 2002-2008; kursy dla doktorantów i na poziomie postdocs

- 1) Organizacja kursów laboratoryjnych dotyczących interaktomiki przy użyciu drożdżowego systemu dwuhybrydowego (yeast-two-hybrid interactomics methodology) zorganizowanych dla platformy badawczej EUROSCA (2005); Max Delbrück Center, Berlin- Niemcy,
- 2) Zaprojektowanie kursu, wykłady: Proteomics and Protein-Protein Interactions: MSc/PhD Program in Molecular Medicine at the Charité University Hospital, Berlin (2006-2008). Module 4, Functional Genomics (<http://www.molecular-medicine-berlin.com/>)

Uniwersytet w Helsinkach (Wydział medyczny; lata 2008-2020; studia doktoranckie i na poziomie postdocs)

- 3) Zaprojektowanie i prowadzenie cyklicznego kursu (wykłady, laboratoria, nadzór nad egzaminami): Advanced Courses in Proteomics and Protein Chemistry held at the Biomedicum Helsinki, Meilahti Clinical Core Proteomics Facility (Wrzesień 2009, Maj 2010; Wrzesień 2011, 2012, 2013)
- 4) Zaprojektowanie i prowadzenie cyklicznego kursu (wykłady, laboratoria, nadzór nad



egzaminami): Introduction to Basic Protein Chemistry and Proteomics with Clinical Applications; Październik 2012, 2013 (Biomedicum Helsinki, Meilahti Clinical Core Proteomics)

5) Zaprojektowanie i prowadzenie cyklicznego kursu (wykłady): Proteomics and Systems biology lectures at the TransMed curriculum (2011-2013, Biomedicum Helsinki, Meilahti Clinical Core Proteomics)

6) Zaprojektowanie i prowadzenie kursu (wykłady, laboratoria): Special Course in Mass Spectrometry Imaging (MALDI-Imaging) 2009, EuroKUP course; Biomedicum Helsinki. Październik 12-14, 2009.

7) Zaprojektowanie i prowadzenie kursu (wykłady, laboratoria): Training School on MALDI Imaging of Kidney Tissue (BM0702/COST/ESF/2010).

8) Wykładowca na kursie: Cyprus Clinical Proteomics (Wrzesień 2010), Nicosia, Cyprus.

9) Wykładowca na kursie: Advanced Proteomics course, Zakopane, Polska (Kwiecień 2011), zorganizowany przez European Science Foundation.

10) Wykładowca na cyklicznym kursie: Protein-protein interactions (2013-2019), zorganizowany przez Docent Sanna Lehtonen (UH, Finland).

11) Wykładowca na kursie: Biological Mass Spectrometry (Maj 2014), zorganizowany przez Docent Tuula Nyman (UH, Finlandia).

12) Główny organizator i wykładowca na kursie: Bioinformatics, zorganizowany przez FinnProt (Marzec, 16-17 2017), UH- Finlandia,

13) Główny organizator i wykładowca na: 2nd Finnish Symposium on Biological Mass Spectrometry, 31.10-01.11.2017 (Vanajalinna, Finland)  
<http://www.finnprot.fi/2017/04/2nd-finnish-symposium-on-biological-mass-spectrometry/>

14) Wykładowca na kursie: Introduction to Proteomics Course, CSC, (25.03.2019, Espoo, Finlandia) <https://www.csc.fi/fi/web/training/-/introduction-to-proteomics>

## Sprawowanie opieki naukowej nad studentami

### I. Prace magisterskie i inne:

Unwersytet w Helsinkach (Wydział medyczny)

**1) 2016** Promotor- Susann Sundqvist: Tripeptidin IPP:n kvantitointimenetelmän kehitys eri HPLC-kolonneilla sekä yhdisteen varmistus MALDI:lla ja ESI/MS:llä. Metropolia Ammattikorkeakoulu Laboratorioanalyttikko (AMK). <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-201605198696>

**2) 2017** Promotor- Nyberg, Elisabeth. Development of quantitative methods for measuring Abeta peptides in Alzheimer's disease brain. MSc Thesis. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:aalto-201712187965>

**3) 2019** Promotor- Anna Kristiina Lundgren: Application of MALDI-mass spectrometry for quantitative assessment of anti-cancer drugs on tissues (Metropolia Ammattikorkeakoulu Laboratorioanalyttikko (AMK)). <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2019121125974>

### II. Prace doktorskie:

Max Delbrück Center for Molecular Medicine

- 1) **2007** Promotor pomocniczy, Eryk W. Wolski “*Analysis of sets and collections of Peptide Mass Fingerprint data*”, MPI for Molecular Genetics, Berlin (2004-2007).
- 2) **2009** Promotor pomocniczy, Yacine Bounab. “*CRMP1 Protein Complexes Modulate PolyQ-Mediated Htt Aggregation and Toxicity in Neurons*”, MDC-Berlin Buch, Berlin (2005-2009).

Universytet w Helsinkach (Wydział medyczny)

- 1) **2014** Promotor, Enzo Scifo: “*Systematic Analysis of disease pathways in Congenital, Infantile and Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinoses*”, Faculty of Medicine, University of Helsinki (<http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-51-0360-4>).

Trwające prace doktorskie:

- 2) Kopromotor pracy doktorskiej: Arvydas Dapkunas, MSc. (2017-2021), University of Helsinki “*Bioimage analysis in developmental biology and disease: depicting biochemical pathways in kidney development and NCL disease model*”.
- 3) Kopromotor pracy doktorskiej: Vignesh Srinivasan, MSc (2018-2022), University of Helsinki “*Targeting the proteostasis and transcriptional defects associated with Huntington’s disease*”.
- 4) Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: Katarzyna Frątczak, MsEng (2018-2022), Silesian University of Technology “*Methods of dimensionality reduction, feature extraction and selection in clustering MS data*”.
- 5) Kopromotor pracy doktorskiej: Annunziata Cascone, MD (2020-2022), University of Helsinki “*Elucidating the role of LACTB in mitochondria- physiology and disease*”.

### III. Członek komisji doktoranckiej (Universytet w Helsinkach)

MSc Julia Casado, Division of Bioinformatics, Faculty of Medicine, Uni. of Helsinki (2014-ongoing); [Research Program in Systems Oncology](#), Doctoral Programme in Biomedicine.

MSc Juuso H. Taskinen, Minerva Foundation Institute for Medical Research, 2020- ongoing, Doctoral Programme in Integrative Life Science.

### Recenzent prac doktorskich

- 1) Praca doktorska: Vasudheva Reddy Akepati, “*Molecular characterization of Optic Atrophy protein OPA1*”; MDC, Berlin (2007);
- 2) Praca doktorska: Sandra Söderholm, “*Phosphoproteomics characterization of viral infection*”, Faculty of Biological Sciences, University of Helsinki (2016);
- 3) Praca doktorska: Wojciech Cypryk, “*Extracellular vesicles in innate immunity proteomic investigations*”, Faculty of Biological Sciences, University of Helsinki (2016);
- 4) Praca doktorska: Santosh Bhosale, “*Serum proteomics to detect early changes in type 1 diabetes and carotid atherosclerosis*”, University of Turku (2018);
- 5) Praca doktorska: Stefano Doccini, “*Functional omics approaches towards affected molecular pathways underlying various forms of Neuronal Ceroid Lipofuscinoses*”, University of Florence, Doctoral programme Tuscan PhD in Neurosciences (2018);
- 6) Praca doktorska: Andrii Bugai, “*Regulation of Pol II polymerase transcriptional response to DNA-damage by RBM7 and P-TEFb*”, Faculty of Medicine, University of Helsinki (2020)

## Materiały do nauki na poziomie uniwersyteckim

- 1) Jako wykładowca na Uniwersytecie w Helsinkach, sprawowałem opiekę nad kilkudziesięcioma doktorantami na kursach z zakresu podstawowych i zaawansowanych metod biochemii, białek, chemii, proteomiki i spektrometrii mas. Pliki PDF z tymi wykładami są dostępne, jako materiały dydaktyczne i można je znaleźć pod adresem: <http://research.med.helsinki.fi/corefacilities/proteinchem/courses.htm>
- 2) Moodle: (Uniwersytet Helsiński): 30496 **TRANSMED Introduction to proteomics and metabolomics; TMED-912 Introduction to Clinical Proteomics**, 2018-2020; **NEU-561 Principles of bioscience omics**, 2018-2020)
- 3) Podczas zajęć praktycznych na Uniwersytecie w Helsinkach Prowadziłem również kilka seminariów tematycznych, których wydruki były udostępniane jako materiały dydaktyczne dla uczestniczących studentów.

## Podręczniki akademickie

1. Strosznajder Joanna i **Łałowski Maciej**. Peptydy Amyloidu  $\beta$  w mózgu starczym i w patomechanizmie choroby Alzheimera. W *Mózg i starzenie*. Pod redakcją Joanny B. Strosznajder i Mirosława J. Mossakowskiego. Warszawa 2001. Upowszechnianie nauki-oświata "UN-O" Sp. z o.o., Warszawa, str. 106-129. Rozdział w języku polskim.
2. **Łałowski Maciej** i Czyżewski Krzysztof. Dziedziczne kongiofilne angiopatie. W *Otępienie*. Pod redakcją Andrzeja Szczudlika, Pawła P. Liberskiego, Marii Barcikowskiej. Krakow 2004. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. Rozdział w języku polskim.
3. Zaręba-Kozioł Monika, **Łałowski Maciej**, Wystouch-Cieszyńska Aleksandra. Label-free LC-MS/MS comparative analysis of protein S-nitrosome in synaptosomes from wild type and APP transgenic mice. W *Analysis of Post-Translational Modifications and Proteolysis in Neuroscience. Neuromethods*, 2016. Wydawca: Humana Press. Pod redakcją Jennifer Elizabeth Grant i Hong Li, str. 1-24.

## Udział w projektowaniu programów nauczania i administrowaniu oświatą

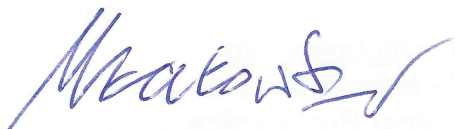
Wybrany jako członek Master's Degree Program in Translational Medicine (**TRANSMED**; <http://www.helsinki.fi/transmed/>), dotyczący studiów magisterskich na Wydziale medycznym Uniwersytetu w Helsinkach, od października 2009.

## Inne osiągnięcia dydaktyczne

- 1) Aktywność naukowo dydaktyczna prowadzona przez towarzystwo proteomiczne FinnProt ([www.finnprot.fi](http://www.finnprot.fi)),
- 2) W trakcie studiów magisterskich byłem prywatnym korepetytorem biologii i chemii (1989-1991, Warszawa - Polska),
- 3) Podczas stażu naukowego w Nowym Jorku prowadziłem również weekendowe zajęcia konwersacyjne z języka polskiego dla dzieci emigrantów (1994-1995, NYC, USA),
- 4) Podczas stażu naukowego w Berlinie brałem udział w organizacji Dni Nauki, przeznaczonych dla szerokiego grona odbiorców spoza świata nauki (pokazy robotyki i automatyki w Max Delbrück Center for Molecular Medicine), która odbyły się w 2006 i 2007 roku. Pokazy odbywały się w języku niemieckim.

18.11.2020

Z poważaniem



Dr Maciej Łałowski, Docent

University of Helsinki, HiLIFE, Meilahti Clinical Proteomics Core facility

Helsinki, Finlandia

oraz

Zakład Proteomiki Biomedycznej, Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk, Poznań