

Charleston, dnia 13 marca 2019 roku

**dr Dariusz Pytel**

**AUTOREFERAT**  
**(Załącznik 2a)**

**Charleston 2019**

**1. Imię i Nazwisko:** Dariusz Pytel**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2005 – magister biologii o specjalności genetyka, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, tytuł pracy magisterskiej: „Rola BCR/ABL w oporności komórek białaczkowych na leki i promieniowanie”, promotor: prof. dr hab. Ireneusz Majsterek

2008 – doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, tytuł rozprawy doktorskiej: „Oddziaływanie kinazy tyrozynowej BCR/ABL z glikozylazą uracylową DNA”, promotor: prof. dr hab. Janusz Błasiak

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

2005 – 2008                      Staż doktorski, stanowisko ang. Research Scholar  
Wydział Mikrobiologii i Immunologii  
Szkoła Medyczna Uniwersytetu Temple,  
Filadelfia, PA, USA

2008 – 2013                      Staż podoktorski, stanowisko ang. Postdoctoral Fellow  
Wydział Biologii Nowotworów  
Centrum Onkologii Instytutu Naukowego im. Abramson  
Szkoły Medycznej Perelman na Uniwersytecie Pensylwania,  
Filadelfia, PA, USA

9/2009 – 12/2010                      Staż podoktorski, stanowisko ang. Postdoctoral Fellow  
Centrum Badań nad Lekami w chorobach neurodegeneracyjnych  
(LDDN)  
Szpital Brigham and Women's  
Szkoła Medyczna Harvard,

Boston/Cambridge, MA, USA

12/2013 – 06/2014 Stanowisko młodszego profesora ang. Research Assistant Professor  
Wydział Biologii Nowotworów  
Centrum Onkologii Instytutu Naukowego im. Abramson  
Szkoly Medycznej Perelman na Uniwersytecie Pensylwania,  
Filadelfia, PA, USA

07/2014 – obecnie Stanowisko młodszego profesora ang. Research Assistant Professor  
Wydział Biochemii i Biologii Molekularnej  
Centrum Onkologii im. Hollings  
Uniwersytet Medycznym Południowej Karoliny,  
Charleston, SC, USA.

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

**Znaczenie kinazy retikulum endoplazmatycznego PERK w patogenezie i terapii chorób nowotworowych**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 publikacji (4 artykułów oryginalnych i 1 artykułu przeglądowego) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (**impact factor**) **IF = 36.694**, sumarycznej liczbie **punktów MNiSW = 200** oraz łącznej liczbie cytowań wg bazy **Web of Science (stan z dnia 13 marca 2019) = 190**

1. Bobrovnikova-Marjon E<sup>#</sup>, Pytel D<sup>#</sup>, Riese MJ, Vaites LP, Singh N, Koretzky GA, Witze ES, Diehl JA “PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation” (2012) *Molecular and Cellular Biology*, Volume: 32, Issue: 12, Pages: 2268-2278 (**IF=5.372, IF5=4.486, pkt.**

**MNiSW=40).**

# **Bobrovnikova-Marjon E, Pytel D** dzielą równorzędne pierwsze autorstwo

Manuskrypt został wyróżniony przez edytora czasopisma *Science Signaling* w oparciu o wyjątkowe zainteresowanie i znaczenie w dziedzinie badań nad przekaźnictwem komórkowym.

VanHook A “PERKing Up the ER Stress Response” (2012) *Science Signaling*, Vol.5, Issue: 226, Pages: ec151 (**IF=7.648, IF<sub>5</sub>=7.251, pkt. MNiSW=40**).

2. Chitnis NS, **Pytel D**, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA “MiR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner” (2012) *Molecular Cell*, Volume: 48, Issue: 3, Pages: 353-364 (**IF=15.280, IF<sub>5</sub>=14.703, pkt. MNiSW=50**).

Manuskrypt został wybrany i wyróżniony przez czasopismo *Nature Cell Biology*.

Chenette E “MiR-211 negotiates life and death decisions” (2012) *Nature Cell Biology* Volume: 14, Issue: 11, Pages: 1129 (**IF=20.761, IF<sub>5</sub>=20.460, pkt. MNiSW=45**).

3. **Pytel D**, Seyb K, Liu M, Ray SS, Concannon J, Huang M, Cuny GD, Diehl JA, Glicksman MA “Enzymatic characterization of ER stress-dependent kinase, PERK, and development of a high-throughput assay for identification of PERK inhibitors” (2014) *Journal of Biomolecular Screening*, Volume:19, Issue: 7, Pages: 1024-1034 (**IF=2.423, IF<sub>5</sub>=2.243, pkt. MNiSW=25**).

4. **Pytel D**<sup>#</sup>, Majsterek I, Diehl JA<sup>#</sup> “Tumor progression and the different faces of the PERK kinase” (2016) *Oncogene*, Volume: 35, Issue: 10, Pages: 1207-1215 (**IF=7.519, IF<sub>5</sub>=6.933, pkt. MNiSW=40**).

# **Pytel D**, Diehl JA, autorzy korespondencyjni

5. **Pytel D**, Gao Y, Mackiewicz K, Katlinskaya YV, Staschke KA, Paredes MC, Yoshida A, Qie S, Zhang G, Chajewski OS, Wu L, Majsterek I, Herlyn M, Fuchs SY, Diehl JA. "PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma." (2016) *PLoS Genetics*, Volume: 12, Issue: 12, Pages: 1-22 (**IF=6.100, IF5=6.685, pkt. MNiSW=45**).

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

Moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół badania roli podobnej do PRK kinazy retikulum endoplazmatycznego PERK w regulacji wzrostu nowotworów, proliferacji komórkowej, a także próbie rozwikłania, w jaki sposób zależna od PERK regulacja metabolizmu lipidów wpływa na biologię nowotworów. Równocześnie, podejmuję starania mające na celu rozwinięcie nowych strategii terapeutycznych, przede wszystkim skupiając się na możliwości stosowania nowych niskocząsteczkowych związków chemicznych, jako leków. Wykorzystując modele przedkliniczne, poszukuję rozwiązań wysoce efektywnych, jednocześnie posiadających możliwie najwięcej cech pożądanych przy wprowadzaniu do badań klinicznych. Moje szerokie doświadczenie w badaniu biologii nowotworów, a także aktywności kinaz białkowych, wykorzystuję w realizacji projektów naukowych traktujących o odpowiedzi biochemicznej na pojawienie się błędnie fałdowanych białek, wynikłego z niej stresu retikulum endoplazmatycznego (RE) oraz działania w tym kontekście kinazy PERK.

Dojrzewanie oraz fałdowanie wszystkich białek szlaku sekrecyjnego zachodzi w przestrzeni wewnątrz retikulum endoplazmatycznego. Zakłócenie biosyntezy białek w RE można osiągnąć stosując środki farmakologiczne upośledzające glikozylację białek (tunikamycyna) lub zaburzające homeostazę jonów wapnia (tapsygargina), bądź wywierając stres fizjologiczny, tj. pozbawienie dostępu do glukozy. W rezultacie dochodzi do błędnego fałdowania białek, co w kulminacyjnym momencie uruchamia szlak odpowiedzi na stres określany, jako UPR (ang. Unfolded Protein Response). Aktywacja UPR charakteryzuje się zwiększoną ekspresją białek opiekuńczych (chaperonowych) RE, tj. BiP/GRP78, GRP94, disulfidoizomery białek (PDI) oraz czynnika transkrypcyjnego CHOP (C/EBP homologous protein) znanego również, jako gen zaangażowany w hamowanie wzrostu oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA (ang. GADD153 growth arrest and DNA damage gene-153)

Komórki ssaków posiadają trzy trans-błonowe kinazy białkowe działające, jako

proksymalne efekторы UPR. Izoformy Ire1 (powszechnie ekspresjonowana forma  $\alpha$  oraz tkankowo specyficzna forma  $\beta$ ) składają się z wewnątrz-siateczkowej domeny będącej bezpośrednim sensorem stresu, pojedynczej domeny trans-błonowej, oraz cytoplazmatycznego ogona, w skład, którego wchodzi domena o aktywności kinazy oraz domena o funkcji enzymatycznej RNAzy. Ire1 reguluje ekspresję genów poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego XBP1. Wykorzystując funkcję RNAzy, Ire1 katalizuje reakcję splicingu Xbp1, generując w ten sposób krótszy wariant jego mRNA, bardziej aktywny translacyjnie, w efekcie dochodzi do akumulacji Xbp1. PERK jest kolejnym białkiem transbłonowym stymulowanym przez stres RE analogicznie do Ire1. W aktywnym stanie PERK katalizuje reakcję fosforylacji eIF2 $\alpha$  w pozycji Ser51, co prowadzi do represji syntezy białek. Trzecim sensorem stresu RE jest międzybłonowy czynnik transkrypcyjny ATF6 $\alpha/\beta$ . W warunkach fizjologicznych ATF6 zakotwiczony jest w błonie RE, jednak w trakcie UPR, migruje do aparatu Golgiego, gdzie ulega przetworzeniu przez S1P/S2P, czego wynikiem jest uwolnienie N-końcowej domeny wiążącej DNA o charakterze czynnika transkrypcyjnego. Aktywacja PERK, Ire1 oraz ATF6 wymaga oddysocjowania BiP od ich domen wewnątrz-siateczkowych, zatem nagromadzenie nieprawidłowo pofalowanych białek powoduje „miareczkowanie” BiP pozwalające na oligomeryzację PERK/Ire1 oraz proteolityczną modyfikację ATF6. Wspólnie, wszystkie trzy sensory transdukują sygnał wywołujący zwiększenie poziomu białek opiekuńczych (chaperonowych) oraz czynników transkrypcyjnych ATF4 oraz CHOP, przy jednoczesnym zahamowaniu globalnej syntezy białek, włączając w to promotor progresji cyklu komórkowego cyklinę D1, czego skutkiem jest zatrzymanie cyklu. W ograniczaniu translacji pośredniczy kinaza PERK poprzez fosforylację eukariotycznego czynnika inicjującego 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), który jest niezbędny w początkowych etapach translacji. PERK uczestniczy także bezpośrednio w aktywacji Nrf2, czynnika regulującego ekspresję enzymów antyoksydacyjnych. Wysokie tempo proliferacji komórek nowotworowych wymusza potrzebę syntezy dużej ilości białek, co jest źródłem stresu RE oraz indukcji UPR. Towarzyszy temu nadprodukcja reaktywnych form tlenu, którą komórka kompensuje aktywacją szlaków odpowiedzi na stres oksydacyjny. Biorąc pod uwagę kierunki aktywności PERK, stanowi on obiecujący cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów, dla których obecnie dostępne chemioterapeutyki zawodzą.

PERK jest kluczowym regulatorem przeżywalności komórkowej, dlatego biorąc pod uwagę specyficzne mikrośrodowisko nowotworów, na które składa się hipoksja, ograniczony dostęp do substancji odżywczych oraz intensywna biosynteza białek, inhibicja PERK wydaje się mieć znaczący potencjał antynowotworowy. Nowatorskim odkryciem

w moich badaniach jest wykazanie, iż PERK działając, jako kinaza lipidów, fosforyluje diacyloglicerol (DAG), przyczyniając się do powstania kwasu fosfatydowego (PA). DAG jest ważnym przekaźnikiem wtórnym w komórce, wymaganym w aktywności białkowej kinazy C (PKC). DAG jest prekursorem PA, który przyczynia się do aktywacji sygnalizacji MAPK przez oddziaływanie z efektem kinazy tyrozynowej RAS. PA uruchamia również szlak mTOR poprzez bezpośrednie wiązanie się i aktywację kinazy AKT. PERK fosforyluje wiele rodzajów DAG. Zależna od stresu RE produkcja PA jest kontrolowana przez PERK, co jest kluczowe w aktywacji AKT oraz podtrzymaniu aktywności MAPK. W warunkach umiarkowanego stresu czynny szlak AKT/MAPK działa na rzecz przeżycia komórki, zapewniając jej mechanizmy umożliwiające przywrócenie homeostazy. Gdy okazuje się to niemożliwe, komórka kierowana jest na szlak apoptozy. Działanie PERK zależy również od płynności błon, co warunkowane jest przez ich kompozycję lipidową. Kontrolowana przez PERK biosynteza lipidów nie tylko dostarcza drugorzędowych przekaźników sygnału, ale także produktów pośrednich metabolizmu lipidów, które modulują takie aspekty funkcjonowania komórki jak proliferacja, autofagia, oraz sekrecja. W swojej pracy wykazałem, iż aktywność PERK jako kinazy lipidów jest regulowana przez p85 $\alpha$ - domenę regulatorową/adaptorową kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K). Odkryłem również zależną od PERK aktywację AKT oraz mTOR. Co więcej, analizując model zwierzęcy zaobserwowałem, iż akumulacja ciał lipidowych w fibroblastach mysich z knock-outem PERK jest znacząco zredukowana w porównaniu z fibroblastami o genotypie dzikim, co sugeruje, iż PERK jest istotnym czynnikiem w różnicowaniu się adipocytów (Bobrovnikova-Marjon E, Pytel D, Riese MJ, Vaites LP, Singh N, Koretzky GA, Witze ES, Diehl JA “PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation” (2012) *Molecular and Cellular Biology*, Volume: 32, Issue: 12, Pages: 2268-2278). Opisana w niniejszej publikacji nowa aktywność kinazy PERK wskazuje na jej istotną rolę w procesie kancerogenezy oraz także w sygnalizacji insulinowej i może pomóc w planowaniu nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na szlak PI3K / mTOR.

PERK jest kluczowym modulatorem przeżywalności komórki zarówno w warunkach hodowli komórkowych, jak i w modelach zwierzęcych. Inaktywacja PERK uwrażliwia komórki na różne formy stresu RE, co obniża przeżywalność nowotworów oraz hamuje ich progresję. Jak wspomniano wyżej, kluczowym elementem programu pro-przeżyciowego dla komórki w warunkach stresu RE jest globalne wyciszenie translacji poprzez fosforylację czynnika eIF2 $\alpha$ . Istnieje jednak grupa mRNA, która posiada alternatywne, tzw. małe otwarte ramki odczytu (uORF) w regionie 5'UTR służące

selektywnej aktywacji danych genów w warunkach globalnej represji translacji. W taki sposób PERK indukuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego ATF4, ten zaś stymuluje ekspresję dwóch rozbieżnych grup genów, tj. pro-apoptotycznych oraz promujących przeżycie. Jako regulator wielu genów zaangażowanych w utrzymywanie homeostazy redox, ATF4 wykazuje działanie ochronne na komórkę. Równolegle, ATF4 posiada zdolność promowania ekspresji pro-apoptotycznego białka CHOP. W moich badaniach wykazałem, iż aby zapobiec przedwczesnej apoptozie związanej z akumulacją CHOP, PERK indukuje ekspresję miR-211, który antagonizuje program apoptozy poprzez czasowe wyciszenie ekspresji CHOP. MiR-211 odgrywa rolę pro-przeżyciowego czynnika, który jako represor CHOP wyznacza próg jego akumulacji. Ekspresja miR-211 powoduje metylację histonu H3K27 w obrębie promotora CHOP. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych przedstawiłem model, gdzie PERK jest mediatorem aktywacji miR-211, którego ekspresja zapobiega przedwczesnemu nagromadzeniu CHOP, co zapewnia „okno czasowe” pozwalające komórce na przywrócenie stanu homeostazy zanim uruchomiona zostanie programowa śmierć komórki (Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA “MiR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner” (2012) *Molecular Cell, Volume: 48, Issue: 3, Pages: 353-364*).

Najnowsze badania przeprowadzone na licznej grupie rakowych linii komórkowych wykazały obecność szeregu mutacji występujących w dwóch domenach PERK (domenie wiążącej PiB oraz domenie kinazowej). W swojej publikacji przedstawiłem dowody na możliwość funkcjonowania PERK zarówno w charakterze supresora nowotworowego, jak i czynnika pro-adaptacyjnego, gdzie determinantem jest doza genu PERK w modelu nowotworu skóry, czerniaka (PERK wykazuje haploinsuficjencję; 50% redukcja aktywności PERK powoduje zależną od mutacji BRAF V600E transformację nowotworową czerniaka, podczas gdy całkowita inaktywacja pełni rolę supresorową). Znamienny jest również fakt, iż mutacje PERK występujące w czerniaku są hipomorficzne. Opublikowane przeze mnie dane ujawniają, iż PERK wykazuje zależną od dozy genu funkcję supresorową w melanocytach. W badaniach wykorzystałem model myszy z chemicznie indukowalną (traktowanie tamoxifenem) mutacją BRAF V600E. U myszy z genotypem *Braf<sup>CA/+</sup>;Tyr:CreER<sup>+/o</sup>*, mutacja BRAF V600E jest wprowadzana w locus endogennego genu BRAF, którego ekspresję wycisza wklonowana sekwencja lox-stop-lox (LSL). Wycięcie sekwencji LSL oraz włączenie ekspresji BRAFV600E, uzyskiwane jest przez miejscowe dozowanie tamoxifenu, który aktywuje



ekspresję rekombinazy Cre wyłącznie w melanocytach, gdyż działa poprzez promotor tyrozynazy. Wprowadzenie mutacji BRAF V600E w melanocytach typu dzikiego, powoduje ich raptowną pigmentację prowadzącą do starzenia komórek, nie nadając im potencjału neoplastycznego. Progresja nowotworowa wymaga dodatkowych mutacji w kluczowych genach supresorowych, tj. PTEN, p16 lub Fbxo4.

Pierwszym celem moich badań było sprawdzenie, czy ekspresja BRAFV600E uruchamia sygnalizację UPR in vivo. W istocie, zaobserwowałem podwyższony poziom mRNA CHOP w komórkach skóry już po pierwszym tygodniu od indukcji BRAFV600E, jednakże nie stwierdzono obecności aktywnego wariantu Xbp1 czy akumulacji BiP, co sugeruje, iż BRAFV600E specyficznie indukuje PERK. Podobne wnioski wysunięto po infekcji melanocytów pierwotnych reowirusem kodującym BRAFV600E. Kluczowym aspektem badań było ustalenie roli PERK w regulacji odpowiedzi melanocytów na pojawienie się mutacji BRAFV600E. W tym celu monitorowałem rozwój choroby nowotworowej w kohorcie myszy o następujących genotypach: *Braf*<sup>CA/+;Tyr::CreER+/-</sup>, BRAFV600E vs *Braf*<sup>CA/+;Tyr::CreER+/-</sup>, BRAFV600E/*PERK*<sup>fl/+</sup> oraz *Braf*<sup>CA/+;Tyr::CreER+/-</sup>, BRAFV600E/*PERK*<sup>fl/fl</sup>. Delecja jednego allelu PERK powodowała szybki rozwój agresywnej formy czerniaka, podczas gdy jedynie 3 z 27 myszy z podwójną delecją PERK wykształciły czerniaka, co ważne w każdym z tych guzów zanotowano około 30% ekspresji PERK dodatkowo potwierdzając, iż aktywność PERK odgrywa kluczową rolę w nowotworzeniu. Uzyskane wyniki demonstrują, iż istnieje próg poziomu PERK, którego przekroczenie ujawnia jego potencjał kancerogeny. Czerniak, który rozwinął się w układzie heterozygotycznym *PERK*<sup>+/-</sup> wskazuje, iż haploinsuficjencja PERK leży u podstaw uzyskanego fenotypu, z kolei jego brak w układzie homozygotycznym *PERK*<sup>-/-</sup> sugeruje, iż funkcja pro-przeżyciowa PERK jest istotna na etapie inicjowania zmian neoplastycznych. Otwartym pytaniem pozostawało czy rozwój nowotworu zależy bezpośrednio od utrzymywanej w komórce częściowej ekspresji PERK. Do rozwikłania tej kwestii wykorzystałem opracowany przez firmę Eli Lilly niskocząsteczkowy inhibitor PERK o nazwie roboczej LY4. Kohorta myszy, u których rozwinął się czerniak została poddana działaniu inhibitora, co wywołało zahamowanie progresji nowotworu objawiające się podwyższonym poziomem apoptozy oraz obniżeniem proliferacji. Paradoksalnie, długotrwałe podawanie LY4 nie przyczyniło się do zwiększonej częstości występowania spontanicznego czerniaka na tle genetycznym BRAFV600E bez ingerencji w PERK, co jest dobrym prognostykiem w kontekście możliwości zastosowania klinicznych inhibitorów. Podsumowując, opublikowane przeze mnie wyniki jednoznacznie wskazują, iż częściowa redukcja aktywności PERK kształtuje podatność komórki na transformację nowotworową.

Przedstawiony model demonstuje, iż PERK działając w warunkach mutacji BRAFV600E prowadzi do rozwoju nowotworu złośliwego skóry, co jest uzależnione bezpośrednio od poziomu genu PERK, którą na potrzeby terapeutyczne można regulować poprzez zastosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK (Pytel D, Gao Y, Mackiewicz K, Katlinskaya YV, Staschke KA, Paredes MC, Yoshida A, Qie S, Zhang G, Chajewski OS, Wu L, Majsterek I, Herlyn M, Fuchs SY, Diehl JA. “PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma.” (2016) *PLoS Genetics*, Volume: 12, Issue: 12, Pages: 1-22).

W moich dotychczasowych badaniach wykazałem, iż utrata PERK jest czynnikiem ograniczającym wzrost komórek raka sutka w warunkach in vitro oraz in vivo. Inni autorzy ujawnili w swych pracach aktywację szlaku PERK w chłoniaku Hodgkina (Hodgkins lymphomas). Zjawisko błędnego fałdowania białek jest także związane z patologią chorób neurodegeneracyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Alzheimerera, gdzie dochodzi do tworzenia się złożeń beta-amyloidu czy tworzenia splotów neurofibrylarnych. Mając na uwadze krytyczną rolę sygnalizacji PERK w progresji i wzroście wielu typów nowotworów, a także w innych chorobach, następnym obranym przeze mnie celem była próba identyfikacji inhibitorów kinazy PERK, mogących posłużyć do rozwinięcia nowych terapii. W czasie mojego stypendium odbywanego w Centrum Badań nad Lekami Uniwersytetu Harvard, dokonałem szczegółowej charakterystyki enzymatycznej kinazy PERK, co pozwoliło na zaprojektowanie i przeprowadzenie wysokowydajnego testu przesiewowego (HTS, ang. high-throughput-screening assay). W toku HTS przeanalizowałem 80 000 związków, spośród których wyłoniono inhibitory PERK. Bardziej szczegółowe analizy pozwoliły wyselekcjonować dwa związki, pierwszy z nich wykazuje wysoki poziom inhibicji w warunkach in vitro, natomiast drugi ma zdolność inhibicji o charakterze niekompetycyjnym w stosunku do ATP oraz eIF2 $\alpha$ . Uzyskane wyniki są obiecującym prologiem w procesie odkrywania nowych leków. (Pytel D, Seyb K, Liu M, Ray SS, Concannon J, Huang M, Cuny GD, Diehl JA, Glicksman MA “Enzymatic characterization of ER stress-dependent kinase, PERK, and development of a high-throughput assay for identification of PERK inhibitors” (2014) *Journal of Biomolecular Screening*, Volume:19, Issue: 7, Pages: 1024-1034). Wyrażam nadzieję, iż opisana powyżej historia moich badań nad kinazą PERK przyczynia się istotnie do lepszego zrozumienia jej roli w procesie kancerogenezy, a także otwiera możliwość wprowadzenia nowych efektywnych środków leczenia opartych na inhibicji/aktywacji PERK. W mojej opinii przedstawione w moich badaniach związki hamujące aktywność PERK mogą być

poddane testom na różnych modelach chorobowych (takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, cukrzyca, choroby serca itp.) gdzie odnotowano implikacje związane z kinazą PERK.

Podsumowanie moich najważniejszych osiągnięć z zakresu funkcjonowania PERK oraz UPR zestawionych z publikacjami innych wiodących autorów w dziedzinie stresu RE zostało zawarte w pracy przeglądowej, którą opublikowałem w czasopiśmie *Oncogene*. **(Pytel D, Majsterek I, Diehl JA “Tumor progression and the different faces of the PERK kinase” (2016) *Oncogene*, Volume: 35, Issue: 10, Pages: 1207-1215)**. Przewodnią sugestią, która płynie z badań, które przeprowadziłem jest wskazanie, iż PERK działa, jako „broń obusieczna”, która ma zdolność zarówno do promowania procesu nowotworzenia jak i jego supresji.

### **Podsumowanie prac w ramach cyklu:**

Tezy habilitacyjne zawarte w opisie cyklu obejmują następujące odkrycia:

- Aktywność kinazy PERK zależy od składu lipidowego membran komórkowych. PERK jest bifunkcyjnym enzymem, który obok kanonicznej aktywności kinazy białek posiada zdolność fosforylacji lipidów, w tym diacyloglicerolu (DAG), co skutkuje możliwością generowania kwasu fosfatydowego (PA). Kontrolując produkcję PA, PERK przyczynia się do regulacji sygnalizacji MAPK oraz mTOR, a także fosforylacji Akt w pozycji Ser473.
- Anty-apoptotyczny microRNA-211 indukowany jest w warunkach stresu RE na drodze zależnej od PERK.
- PERK odgrywa rolę w sygnalizacji zarówno pro-apoptotycznej, jak i pro-przeżyciowej komórki, jednak mechanizm odpowiedzialny za balans pomiędzy obiema aktywnościami pozostaje wciąż nieznanym
- Analiza genetyczna wskazuje na haploinsuficjencję PERK w komórkach nowotworowych (indukowanych przez mutację BRAF), gdzie obecność pojedynczej kopii genu PERK prowadzi do rozwoju agresywnej formy czerniaka w porównaniu z występowaniem znacznie mniej złośliwej formy w przypadku całkowitej delecji PERK. Użycie związków chemicznych blokujących działanie PERK u myszy przynosi znaczący efekt terapeutyczny w postaci ograniczenia wzrostu guzów oraz wolniejszej progresji choroby.

- Odkrycie terapeutyków, specyficznie celujących w aktywność PERK. Dwa związki efektywnie inhibują aktywność kinazową PERK (w kierunku eIF2 $\alpha$ ). Pierwszy, oddziałuje z PERK na drodze niekompetycyjnej do miejsca wiązania ATP oraz eIF2 $\alpha$ , drugi natomiast wykazuje wyższą aktywność w komórkach. Wykryte w ten sposób narzędzia chemiczne manipulacji PERK mogą okazać się przydatne w ocenie możliwości leczenia szerszej grupy schorzeń takich jak choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera) oraz inne choroby, w których odnotowano aktywność kinazy PERK.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Mój dorobek naukowy (wyłączając publikacje wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego) składa się z 33 prac (22 artykułów oryginalnych 11 prac przeglądowych) o łącznym współczynniku oddziaływania (**impact factor**) **IF = 98.435** oraz **punktacji MNiSW = 728** i liczbie cytowań wg **Web of Science (stan z dnia 13 marca 2019) = 478**

### a) Osiągnięcia naukowo – badawcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Podczas studiów magisterskich moje zainteresowania skupiały się na roli onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL w oporności komórek białaczkowych na leki i promieniowanie. Prowadziłem również badania nad rolą, jaką odgrywa kinaza BCR/ABL w uszkodzeniach DNA i systemach ich naprawy. Po ukończeniu studiów magisterskich w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego zostałem przyjęty do studium doktoranckiego Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki na Uniwersytecie Łódzkim, pod opieką prof. dr hab. Janusza Błasiaka. Następnie miałem możliwość kontynuowania pracy dotyczącej kinazy BCR/ABL i prowadzenia badań w ramach mojej pracy doktorskiej w Katedrze Mikrobiologii i Immunologii na Uniwersytecie Medycznym Temple w Filadelfii w USA, w laboratorium prof. Tomasza Skórskiego, w ramach współpracy między Uniwersytetem Łódzkim a Uniwersytetem Medycznym Temple. Moja praca doktorska dotyczyła interakcji pomiędzy kinazą BCR/ABL a glikozylazą DNA uracylu. Badania, które przeprowadziłem na kinazie BCR/ABL, kinazach tyrozynowych, glikozylazach i szlakach naprawy DNA, pokazują, że związek STI571 (Imatinib mesylate) hamuje naprawę DNA w komórkach białaczkowych z ekspresją kinazy BCR/ABL. Ponadto kinaza BCR/ABL stymuluje szlaki naprawy DNA, takie jak naprawa poprzez rekombinację homologiczną (HRR), niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) i przez dopasowanie fragmentów jednoniciowych (SSA). Ponadto BCR/ABL stymuluje ekspresję i

zwiększa jądrową lokalizację helikazy DNA WRN należącej do rodziny helikazy RecQ, co sprzyja przeżywalności i niestabilności genomowej komórek. Ponadto, BCR/ABL może hamować glikozylazę DNA uracylu UNG2 (zaangażowaną w szlak naprawy wycinania zasad DNA (BER)). Wszystkie te badania są opisane w cyklu 11 publikacji (4 prace zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora, ale badania zawarte w tych publikacjach zostały rozpoczęte w czasie trwania moich studiów doktoranckich):

1. Majsterek I, **Pytel D**, Błasiak J (2005) Tyrosine kinases. New target of anticancer therapy. *Postepy Biochem. (Advances in Biochem.)* 51(3):251-60.
2. Majsterek I, Sliwinski T, Poplawski T, **Pytel D**, Kowalski M, Slupianek A, Skorski T, Błasiak J (2006) Imatinib mesylate (STI571) abrogates the resistance to doxorubicin in human K562 chronic myeloid leukemia cells by inhibition of BCR/ABL kinase-mediated DNA repair. *Mutat Res.*603:74-82.
3. **Pytel D**, Wysocki T, Majsterek I (2006) Comparative study of DNA damage, cell cycle and apoptosis in human K562 and CCRF-CEM leukemia cells: role of BCR/ABL in therapeutic resistance. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 144:85-92.
4. Majsterek I, Arabski M, Czechowska A, **Pytel D**, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Błasiak J (2006) Imatinib (STI571) inhibits DNA repair in human leukemia oncogenic tyrosine kinase-expressing cells. *Z Naturforsch [C].* 61:896-902.
5. Slupianek A, **Pytel D**, Majsterek I (2007) The role of oncogenic tyrosine kinases in cellular response to anticancer therapy. *Postepy Hig Med Dosw. (Advances in Hygiene and Experimental Medicine)* 61:819-827.
6. **Pytel D**, Rusin P, Sliwinska A, Morawiec-Bajda A, Drzewoski J, Majsterek I (2007) Role of homologous recombination repair and non-homologous end joining in therapeutic resistance of BCR/ABL-expressing leukemia cells. *Gene Ther Mol Biol.* 11:289-298.
7. **Pytel D**, Slupianek A, Ksiazek D, Skorski T, Błasiak J (2008) Uracil-DNA glycosylases. *Postepy Biochem. (Advances in Biochem.)* 54:362-370.
8. **Pytel D**, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I (2009) Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 9:66-76.

9. Rusin P, Walczak A, Zwierzchlejska A, Olszewski J, Morawiec-Bajda A, Kaczmarczyk D, Kusmierczyk K, Garncarek P, **Pytel D**, Sliwinski T, Majsterek I (2009) "DNA damage and repair of head and neck cancer cells after radio- and chemotherapy". *Z Naturforsch [C]* 64:601-610.

10. Slupianek A, Poplawski T, Jozwiakowski SK, Cramer K, **Pytel D**, Stoczynska E, Nowicki MO, Blasiak J, Skorski T (2011) BCR/ABL Stimulates WRN to Promote Survival and Genomic Instability. *Cancer Res.* 71:842-851

11. Slupianek A, Falinski R, Znojek P, Stoklosa T, Flis S, Doneddu V, **Pytel D**, Synowiec E, Blasiak J, Bellacosa A, Skorski T (2013) BCR-ABL1 kinase inhibits uracil DNA glycosylase UNG2 to enhance oxidative DNA damage and stimulate genomic instability. *Leukemia* 27:629-634.

**b) Osiągnięcia naukowo – badawcze po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, moja rozległa wiedza i doświadczenie w biologii nowotworów i badaniach nad kinazami skierowały moje zainteresowania w kierunku badań nad odpowiedzią komórkową na: nieprawidłowe fałdowanie białek (UPR), stres retikulum endoplazmatycznego oraz kinazą PERK. W 2008 roku zostałem przyjęty na staż podoktorski (stanowisko ang. Postdoctoral Fellow) w laboratorium profesora J. Alana Diehla na Wydziale Biologii Nowotworów Centrum Onkologii Instytutu Naukowego im. Rodziny Abramsonów Szkoły Medycznej Perelman na Uniwersytecie Pensylwania, w Filadelfii, USA. W pracy, której jestem współautorem, wykazaliśmy, że utrata PERK w modelu zwierzęcym raka sutka powoduje znaczące osłabienie proliferacji komórek nowotworowych, która wynika ze zwiększonego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Zmniejszona proliferacja komórek koreluje z zaburzeniem sygnalizacji szlaku Nrf2. Ponadto, sygnalizacja PERK/Nrf2 może chronić komórki nowotworowe przed stresem oksydacyjnym, a PERK może regulować homeostazę redoks komórek nowotworowych, regulując akumulację reaktywnych form tlenu (ROS), a tym samym upośledzając aktywację punktu kontrolnego uszkodzenia oksydacyjnego DNA. Ablacja PERK hamuje wzrost guza, co otwiera możliwości podejścia terapeutycznego i opracowania małowcząsteczkowych inhibitorów molekularnych przeciwko kinazie PERK.

12. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, **Pytel D**, Zhang F, Ye J, Koumenis C,

Cavener D, Diehl JA (2010) PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 29:3881-3895

Przyczyniłem się również do odkrycia, że FBXO4, który należy do nadrodziny białek F-box i działa jako czynniki specyficzności substratowej dla kompleksów ligazy ubikwitynowej Skp1 – Cul1 – F-box (SCF), wykazuje funkcje supresorowe wzrostu guzów na modelu czerniaka BrafV600E-zależnego.

13. Lee E, Lian Z, D'Andrea K, Letrero R, Sheng W, Liu S, Diehl N, **Pytel D**, Barbash O, Schuchter L, Amaravaradi R, Xu X, Herlyn M, Nathanson K, Diehl JA (2013) The FBXO4 tumor suppressor functions as a barrier to BrafV600E-dependent metastatic melanoma. *Mol Cell Biol*. 33: 4422-4433

Ponadto, badałem również rolę innej kinazy lipidowej; kinazy diacylglicerolu (DGK $\zeta$ ). Moja praca przyczyniły się do odkrycia, że DGK $\zeta$  odgrywa selektywną rolę w hamowaniu rozwoju komórek T<sub>reg</sub> i dominującą rolę w tłumieniu sygnalizacji Ras za pośrednictwem DAG.

14. Joshi RP, Schmidt A, Das J, **Pytel D**, Riese MJ, Lester M, Diehl JA, Behrens EM, Kambayashi T, Koretzky GA (2013) A predominant role for the  $\zeta$  isoform of diacylglycerol kinase in regulatory T cell development and TCR-mediated Ras. *Science Signal*. 26;6(303).

Moje wcześniejsze badania pokazały, że PERK promuje ekspresję anty-apoptotycznego mikro-RNA (miR-211). To odkrycie zwróciło moją uwagę na inne ważne miRNA, które są regulowane podczas stresu RE, w wyniku, czego przyczyniłem się do powstania poniższej pracy.

15. Chitnis NS, **Pytel D**, Diehl JA (2013) UPR-inducible miRNAs contribute to stressful situations. *Trends Biochem Sci*. 38:447-452.

Rozszerzyłem także swoją wiedzę i badania w zakresie kinazy PERK, zjawiska nieprawidłowego fałdowania białek, związanego z nim UPR oraz szlaków napraw uszkodzeń DNA o dodatkowe choroby, w tym chorobę Alzheimera, neuroblastomę, cukrzycę typu 2 i inne rodzaje nowotworów, takich jak rak jelita, rak piersi. Przyczyniłem się do opublikowania dodatkowych 11 manuskryptów (w ośmiu z nich jestem pierwszym ko-autorem lub autorem korespondencyjnym):

16. Rozpedek W, Markiewicz L, Diehl JA, **Pytel D**, Majsterek I (2015) Unfolded Protein response and PERK kinase as a new therapeutic target in the pathogenesis of Alzheimer's

disease. *Curr Med Chem.* 22:3169-3184.

17. Rozpedek W, Markiewicz L, Diehl JA, **Pytel D**, Majsterek I (2015) The role of the adaptive stress response in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, cancer and diabetes mellitus type 2. *Pol Merkur Lekarski.* 39:393-397

18. Rozpedek W, **Pytel D**, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I (2016) The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med.* 16:533-544.

19. Rozpedek W, **Pytel D**, Diehl JA, Majsterek I (2016) Small molecule inhibitors of PERK-dependent signaling pathway as a novel, therapeutic molecular strategy in Alzheimer's disease treatment. *Pol Merkur Lekarski.* 41:5-10.

20. Cuchra M, Mucha B, Markiewicz L, Przybyłowska-Sygut K, **Pytel D**, Jeziorski A, Kordek R, Majsterek I (2015) The role of base excision repair in pathogenesis of breast cancer in the Polish population. *Mol Carcinog.* 55:1899-1914.

21. Rozpedek W, Nowak A, **Pytel D**, Diehl JA, Majsterek I (2017) Molecular Basis of Human Diseases and Targeted Therapy Based on Small-Molecule Inhibitors of ER Stress-Induced Signaling Pathways. *Curr Mol Med.* 17(2):118-132

22. Rozpedek W, **Pytel D**, Dziki Ł, Nowak A, Dziki A, Diehl JA, Majsterek I (2017) Inhibition of PERK-dependent pro-adaptive signaling pathway as a promising approach for cancer treatment. *Pol Przegl Chir.* 89(3):7-10.

23. Rozpedek W, **Pytel D**, Nowak-Zdunczyk A, Lewko D, Wojtczak R, Diehl JA, Majsterek I (2018) Breaking the DNA damage response via serine/threonine kinase inhibitors to improve cancer treatment. *Curr Med Chem.* [Epub ahead of print]

24. Mucha B, **Pytel D**, Markiewicz L, Cuchra M, Szymczak I, Przybyłowska-Sygut K, Dziki A, Majsterek I, Dziki L (2018) Nucleotide Excision Repair Capacity and XPC and XPD Gene Polymorphism Modulate Colorectal Cancer Risk. *Clin Colorectal Cancer.* 17(2):e435-e441.

25. Rozpedek W, **Pytel D**, Diehl JA, Majsterek I (2019) Niskocząsteczkowe inhibitory



szlaku adaptacyjnej odpowiedzi na stres zależnego od kinazy PERK jako nowatorska strategia terapeutyczna w leczeniu choroby Alzheimera. *Pol Merkur Lekarski* 46(271):9-15.

26. Rozpędek W, **Pytel D**, Popławski T, Walczak A, Gradzik K, Wawrzynkiewicz A, Wojtczak R, Mucha B, Diehl JA, Majsterek I (2019) Inhibition of the PERK-dependent Unfolded Protein Response signaling pathway involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. [Epub ahead of print]

W oparciu o moją wiedzę i dotychczasowe doświadczenie w zakresie szlaków naprawy DNA, polimorfizmu genów w ludzkich chorobach, małowczątkowych inhibitorów molekularnych i związków syntetycznych, byłem współautorem i pomogłem przygotować serię dodatkowych publikacji:

27. Nowak A, Majsterek I, Przybyłowska-Sygut K, Pytel D, Szymanek K, Szaflik J, Szaflik JP (2015) Analysis of the expression and polymorphism of APOE, HSP, BDNF and GRIN2B genes associated with the neurodegeneration process in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Biomed Res Int*. 2015:258281

28. Cuchra M, Markiewicz L, Mucha B, **Pytel D**, Szymanek K, Szemraj J, Szaflik J, Szaflik JP, Majsterek I (2015) The role of base excision repair in the development of primary open angle glaucoma in the Polish population. *Mutat Res*. 778:26-40

29. Markiewicz L, **Pytel D**, Mucha B, Szymanek K, Szaflik J, Szaflik JP, Majsterek I (2015). Altered expression levels of MMP1, MMP9, MMP12, TIMP1 and IL-1 $\beta$  as a risk factor for the elevated IOP and optic nerve head damage in the primary open angle glaucoma patients. *Biomed Res Int*. 2015:812503

30. Skąła E, Rijo P, Garcia C, Sitarek P, Kalemba D, Toma M, Szemraj J, **Pytel D**, Wysokińska H, Śliwiński T (2016) The Essential Oils of *Rhaponticum carthamoides* Hairy Roots and Roots of Soil-Grown Plants: Chemical Composition and Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:8505384

31. Sitarek P, Rijo P, Garcia C, Skąła E, Kalemba D, Białas AJ, Szemraj J, **Pytel D**, Toma M, Wysokińska H, Sliwinski T (2017). Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and

Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus sibiricus* L. and Their Chemical Composition. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:7384061

32. Skala E, Kowalczyk T, Toma M, Szemraj J, Radek M, Pytel D, Wieczfinska J, Wysokińska H, Śliwiński T, Sitarek P (2018) Induction of apoptosis in human glioma cell lines of various grades through the ROS-mediated mitochondrial pathway and caspase activation by *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract. *Mol Cell Biochem*. 445(1-2):89-97

33. Kowalczyk T, Sitarek P, Skala E, Toma M, Wielanek M, Pytel D, Wieczfinska J, Szemraj J, Śliwiński T (2019) Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from *Menyanthes trifoliata* L. in human cancer cells. *Cytotechnology* (1):165-180.

## 6. Konferencje naukowe:

### Prezentacje plakatu

Majsterek I, Sliwinski T, **Pytel D**, Blasiak J (2004) “STI571 the inhibitor of tyrosine kinases breaks leukemia cells resistance on doxorubicin in dependent mechanism from DNA repair”. *Polish Congress of Genetics*, Gdansk, Poland, 6-9 wrzesień.

Majsterek I, **Pytel D**, Slupianek A, Blasiak J (2005) “DNA repair determine BCR/ABL-leukemia cells response to drug treatment”. *Keystone Symposia C2: Genome Instability and Repair*, Taos, New Mexico, USA, 15-20 marzec.

Majsterek I, Sliwinski T, Poplawski T, **Pytel D**, Slupianek A, Skorski T, Blasiak J (2006) “Imatinib mesylate (STI571) abrogates the resistance of chronic myeloid leukemia cells by inhibition of BCR/ABL kinase-mediated DNA repair”. *First ESH-AACR Conference on the molecular basis for targeted therapy for leukemia*, Cascais, Portugal, 3-5 luty.

Majsterek I, Wysocki T, **Pytel D**, Blasiak J (2006) “DNA damage and repair, cell cycle and apoptosis in human leukemia cells: Role of BCR/ABL in therapeutic resistance”. *Second ESH Euroconference on myeloproliferative disorders: Molecular pathogenesis and therapy*, Madeira, Portugal, 14-16 wrzesień.

Slupianek A, Jozwiakowski S, **Pytel D**, Poplawski T, Nowicki M, Skorski T (2007) “BCR/ABL stimulates WRN helicase activity to facilitate DNA double-strand breaks

repair”. *The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition*, Atlanta, Georgia, USA, 8-11 grudzień.

Majsterek I, **Pytel D**, Markiewicz L, Sliwinski T, Rusin P, Olszewski J, Morawiec-Sztandera A and Szemraj J (2009) “The role of NER pathway in DNA recovery of head and neck squamous cell carcinomas”. *The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting*, Honolulu, Hawaii, USA, 20-24 październik.

**Pytel D**, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA (2012) “PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to mediate Akt activation and adipocyte differentiation” 5th Annual Cancer Biology Departmental Retreat Mohonk Mountain House New Paltz, New York, USA. 8-10 czerwiec.

**Pytel D**, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA (2012). “PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to mediate Akt activation and adipocyte differentiation” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Mechanism and Models of Cancer, Cold Spring Harbor, New York, USA, 14-18 sierpień.

Chitnis N, **Pytel D**, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas N, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA (2012) “miR-211 is a pro-survival micro-RNA that regulates *chop* expression in a PERK-dependent manner” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Regulatory & Non-Coding RNAs, Cold Spring Harbor, New York, USA. 28 sierpień -1 wrzesień.

### **Wygłoszone referaty**

**Pytel D** „Identification of potential small molecule regulators of PERK”

Cancer Metabolism Meeting, 27 maj 2011, Princeton University, Princeton, NJ, USA.

**Pytel D** „PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to regulate Akt activity” Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets Meeting. Aegean Conference. 4-9 październik 2012 Chania, Kreta, Grecja.

**Pytel D** „PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to regulate Akt activity” P01 Scientific Advisory Board Meeting entitled „Cancer Cell Adaptation to Metabolic Stress”. 10 styczeń 2013, University of Pennsylvania, Filadelfia, PA, USA.

**Pytel D** “PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to regulate Akt activity”

6 th Annual Cancer Biology Departmental Retreat May 31 maj – 2 czerwiec, 2013  
Mohonk Mountain House New Paltz, New York, USA.

**Pytel D** „ER Stress and Lipid Signaling” LSC-COBRE in Lipidomics and Pathobiology  
Research Retreat, 20 luty, 2015 Daniel Island Club, Charleston, SC, USA.

**Pytel D** “Small molecule inhibitors of the PERK kinase as a new approach for Alzheimer’s disease” VIII Ibero-American Congress on Alzheimer’s Disease. 15 październik, 2015, Rio De Janeiro, Brazylia.

**Pytel D** „Gene dose determines tumor-suppressive versus tumor promoting properties of PERK in melanoma” Tristate Cancer Metabolism Meeting, 14październik, 2016, Princeton University, Princeton, NJ, USA.

**Pytel D** „New strategies targeting the unfolded protein response (PERK signaling) for cancer treatment” Instytut Mechatroniki i Systemów informatycznych, Politechnika Łódzka, Konferencja ABLAKOM, 23 listopad, 2018, Łódź, Polska.

## 7. Działalność naukowa

a) Członek panelu recenzentów czasopism naukowych:

- DNA and Cell Biology,
- Acta Ophthalmologica,
- Folia Histochemica et Cytobiologica,
- Molecular Biology Reports

Redaktor goszczący specjalnego wydania po tytułem: „Interplay between Redox Signaling, Oxidative Stress, and Unfolded Protein Response (UPR) in Pathogenesis of Human Diseases” w czasopiśmie Oxidative Medicine and Cellular Longevity Journal, opublikowanego w lutym 2019.

b) Współpraca naukowa

Prowadzę współpracę z następującymi ośrodkami naukowymi:

Glaxo Smith Kline (GSK), badania nad inhibitorami PERK

Eli Lilly and Company, badania nad inhibitorami PERK

Atomwise, Inc., badania nad inhibitorami PERK

University of Florida, badania nad inhibitorami PERK

Szkoła Medyczna Harvard, badania nad inhibitorami PERK

Szkoła Medyczna Perelman Uniwersytetu Pensylwania, badania nad kinazą PERK i UPR

Instytut Wistar, badania nad kinazą PERK, UPR oraz czerniakiem

Uniwersytet Medyczny Południowej Karoliny, badania nad kinazą PERK, UPR oraz lipidami

Uniwersytet Medyczny w Łodzi, badania nad kinazą PERK i UPR

## **8. Fundusze i stypendia**

2009 – 2011 Tytuł projektu: „Poszukiwanie małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy retikulum endoplazmatycznego, PERK” („The development of small molecule inhibitors of the endoplasmic reticulum associated kinase, PERK”).

Fundusze przyznane przez: National Center for Drug Discovery in Neurodegeneration (NCDDN), National Institutes of Health (NIH), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Award (U24) NS04933901.

(Numer grantu 5U24NS049339-05)

Projekt był realizowany na Uniwersytecie Medycznym Harvard Boston/Cambridge, MA, USA

- (Harvard NeuroDiscovery Center, Harvard Medical School)  
Boston/Cambridge, MA, USA)
- 2011 – 2014 Tytuł projektu: „Identyfikacja potencjalnych niskocząsteczkowych molekuł regulatorowych kinazy PERK”  
Fundusze przyznane przez: Ruth L. Kirschstein National Research Service Award (NRSA) Institutional Research Training Grants (T32)  
(2011 – 2012 T32 numer grantu 2T32CA009140-36)  
(2012 – 2013 T32 numer grantu 5T32CA009140-37)  
(2013 – 2014 T32 numer grantu 5T32CA009140-38)  
Projekt był realizowany na Uniwersytecie Medycznym Perelman, Uniwersytetu Pensylwania, Filadelfia, PA, USA  
(Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania)  
Philadelphia, PA, USA
- 2015 – 2016 Tytuł projektu: „Mapowanie funkcjonalnej interakcji między kinazą PERK a sfingolipidami” („Mapping the functional interplay between PERK and sphingolipids”).  
Fundusze przyznane przez: Pilot Research Funding from the COBRE in Lipidomics and Pathobiology  
(Numer grantu 5P30GM103339-03)  
Projekt był realizowany na Uniwersytecie Medycznym Południowej Karoliny, Charleston, SC, USA  
(Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA)
- 2014 – 2017 Tytuł projektu: „Inhibitory zależnej od stresu ER kinazy PERK, jako potencjalnie nowe podejście do terapii choroby Alzheimer'a”  
Fundusze przyznane przez: Narodowe Centrum Nauki  
(Numer grantu 2013/10/M/NZ1/00280)  
Projekt był realizowany na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz Uniwersytecie Medycznym Południowej Karoliny, Charleston, SC, USA (współpraca)  
(Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA)
- Luty, 2010 Stypendium dla utalentowanych młodych badaczy, dla rozwoju kariery

następnej generacji naukowców w dziedzinie chorób neurodegeneracyjnych  
IV Konferencja „Drug Discovery for Neurodegeneration”  
Houston, TX, USA

## 9. Działalność dydaktyczna

2009 – 2014 Opiekun naukowy magistra Nickpreet Singh, podczas wykonywania jego pracy magisterskiej: „Construction of analogue-sensitive protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase alleles as a mechanism for regulation” w Szkole Medycznej Perelman na Uniwersytecie Pensylwania, USA.  
Magister Nickpreet Singh obronił pracę z wyróżnieniem Vagelos w dziedzinie chemia (ang. Vagelos honors in chemistry).

Opiekun naukowy dwóch laureatów stypendium Fulbright (ang. Fulbright Junior Advanced Research Award Scholars), ufundowanego przez Departament Stanu USA, podczas ich stażów w USA, gdzie wykonywali część prac doktorskich:

2012-2013 dr Łukasz Markiewicz (Numer stypendium Fulbright ID 15122314).  
Stypendium realizowane w Szkole Medycznej Perelman na Uniwersytecie Pensylwania, Filadelfia, PA, USA.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Znaczenie ekspresji oraz polimorfizmów genów metaloproteinaz macierzowych dla rozwoju jaskry otwartego kąta”

2015-2016 dr Bartosz Mucha (Numer stypendium Fulbright ID 15151715)  
Stypendium realizowane na Uniwersytecie Medycznym Południowej Karoliny, Charleston, SC, USA.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Związek naprawy DNA z polimorfizmem genów HRR i NHEJ u pacjentów z rakiem jelita grubego”

Promotor pomocniczy pracy doktorskiej magister Wioletty Rozpędek pt.: „Inhibitory zależnej od stresu ER kinazy PERK, jako potencjalne nowe podejście do terapii choroby Alzheimera” realizowanej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

## 10. Plany na przyszłość

Badania, które obecnie prowadzę, mają na celu opracowanie nowych strategii

leczenia nowotworów. Na obecnym etapie istotne jest określenie, czy zaobserwowany w moich badaniach nad czerniakiem patologiczny efekt aktywności PERK występuje w innych typach nowotworów, a także czy jest tkankowo-specyficzny. Ponieważ rola PERK w patogenezie nowotworów jest bardziej złożona niż pierwotnie przypuszczano m.in., ze względu na obecność mutacji, moje najbliższe plany badawcze obejmują scharakteryzowanie mutacji PERK pod kątem ich roli w karcynogenezie. Innym analizowanym przeze mnie aspektem funkcji PERK w biologii raka jest jego zdolność do regulowania metabolizmu lipidów oraz odwrotnie, możliwość regulacji aktywności PERK przez specyficzne lipidy. Badanie tego zagadnienia otwiera nowe możliwości poszukiwania endogennych regulatorów PERK. Takie podejście jest innowacyjne, a zarazem stanowiące wyzwanie ze względu na ograniczenia metodologiczne. Dlatego jestem zaangażowany w opracowywanie rozwiązań technicznych i eksperymentalnych nad interakcjami lipidy-białka.

W grudniu 2018 r. złożyłem wniosek OPUS 17 do Narodowego Centrum Nauki (NCN) pt.: „Oddziaływanie pomiędzy białkiem sygnałowym stresu retikulum endoplazmatycznego PERK a sfingolipidami w biologii nowotworów” w ramach mojej współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi (prof. dr hab. Ireneuszem Majsterkiem). Zaproponowany projekt przedstawia jedną z pierwszych prób ustalenia interakcji między lipidami i białkami odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego. W przypadku zakwalifikowania wniosku do finansowania planowane eksperymenty będą realizowane na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Ponadto, w ramach działalności dydaktycznej, wspieram i promuję polskich studentów starających się o uzyskanie finansowania umożliwiającego odbycie staży (takich jak program Fulbright Research Award, Stypendium Fundacji Kościuszkowskiej itp.) na uniwersytetach w USA. W ten sposób staram się otwierać nowe obszary współpracy pomiędzy polskimi uczelniami oraz amerykańskimi ośrodkami.

## 11. Dane bibliometryczne

Całkowity dorobek naukowy stanowi cykl 38 prac (26 artykułów oryginalnych, 12 prac przeglądowych) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (**impact factor**) **IF = 135.129**, sumarycznej liczbie **punktów MNiSW = 928** oraz łącznej liczbie cytowań wg **bazy Web of Science (stan z dnia 13 marca 2019) = 668**

Osiągnięcie naukowe cyklu habilitacyjnego stanowi cykl 5 publikacji (4 artykułów oryginalnych, 1 artykułu przeglądowego) o sumarycznym współczynniku oddziaływania



(**impact factor**) IF = 36.694, sumarycznej liczbie punktów MNiSW = 200 oraz łącznej liczbie cytowań wg bazy Web of Science (stan z dnia 13 marca 2019) = 190

Dodatkowy dorobek naukowy (wyluczając publikacje wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego) stanowi cykl 33 prac (22 artykułów oryginalnych, 11 prac przeglądowych) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (**impact factor**) IF = 98.435, sumarycznej liczbie punktów MNiSW = 728 oraz łącznej liczbie cytowań wg bazy Web of Science (stan z dnia 13 marca 2019) = 478

Indeks Hirscha: 13 (wg SCOPUS and Web of Science)

*Dariusz Pytel*