

Autoreferat

dr n. med. Maciej Gagat

**Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Dane kontaktowe:

dr n. med. Maciej Gagat
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Karłowicza 24
85-092 Bydgoszcz
Polska

tel.: (52) 585-37-33
fax: (52) 585-37-34
tel. kom.: 603-774-977
e-mail: mgagat@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 2018

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO.....	5
2. WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW I STOPNI NAUKOWYCH.....	5
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	6
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.).....	6
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	6
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	6
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....	8
4.3.1. POWIĄZANIE FUNKCJONALNE NUKLEOSZKIELETU Z PROCESAMI ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ	9
4.3.2. ZAANGAŻOWANIE F-AKTYNY W ORGANIZACJĘ POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH.....	21
4.3.3. POSZUKIWANIE NIEKANONICZNYCH FUNKCJI BIAŁEK CYKLU KOMÓRKOWEGO	30
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	33
5.1. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA	33
5.2. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	35
6. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO	37

1. IMIĘ I NAZWISKO

Maciej Gagat

2. WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW I STOPNI NAUKOWYCH

- 2015 r. **Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej**,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
- Tytuł rozprawy doktorskiej: „Udział filamentów aktynowych w
adhezji międzykomórkowej ludzkiego śródbłonka naczyń w
warunkach sprzyjających rozwojowi procesów miażdżycowych”
- Promotor: prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka
- Stopień nadano uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego CM UMK
z dn. 25.03.2015 r.
- Rozprawa doktorska została wyróżniona decyzją Rady
Wydziału Lekarskiego CM UMK z dn. 22.04.2015 r.
- 2009 r. **Magister biotechnologii o specjalności biotechnologia
medyczna**, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
- Tytuł pracy magisterskiej: „Ocena wpływu temperatury na
morfologię i ultrastrukturę fibroblastów CHO AA8”
- Promotor: prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka
- 2007 r. **Licencjat biotechnologii o specjalności biotechnologia
medyczna**, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
- Tytuł pracy licencjackiej: „Polimorfizm sekwencji
mitochondrialnego DNA w populacji Słowian zachodnich,
wschodnich i południowych”
- Promotor: prof. dr hab. n. med. Tomasz Grzybowski

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

od 01.07.2015 r. **Adiunkt**, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium
do chwili obecnej Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Forma zatrudnienia: mianowanie

od 02.07.2010 r. **Asystent**, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
do 31.06.2015 r. Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Forma zatrudnienia: umowa o pracę/mianowanie

od 01.02.2010 r. **Prowadzący zajęcia z przedmiotu *Histologia z***
do 13.06.2010 r. ***cytofizjologią* na studiach anglojęzycznych Wydziału**
Lekarskiego, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Forma zatrudnienia: umowa-zlecenie

od 01.10.2008 r. **Starszy technik**, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
do 30.06.2010 r. Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Forma zatrudnienia: umowa o pracę

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.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

„**Udział białek cytoszkieletu oraz cyklu komórkowego w ważnych procesach fizjologicznych i patologicznych komórek**” na podstawie **8** wybranych prac opublikowanych w czasopismach naukowych oraz **1** opatentowanego wynalazku.

4.2. WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem **8** przedstawionych poniżej prac naukowych oraz **1** opatentowanym wynalazkiem. Prace opublikowano w recenzowanych czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation

Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor (IF) wg JCR równym **30.367** i liczbie punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) równej **215**.

Publikacje zostały uszeregowane tematycznie, a nie zgodnie z rokiem wydania. Wartość IF wg JCR oraz liczbę punktów wg MNiSW dla poszczególnych pozycji podano zgodnie z obowiązującą punktacją w roku ich opublikowania, z wyjątkiem publikacji opublikowanych w roku 2018, dla których przyjęto IF i punkty wg MNiSW zgodnie z obowiązującymi za 2017 rok.

Określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie poniżej wymienionych prac oraz wynalazku znajduje się w Załączniku nr 3, oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim w Załączniku nr 4, a kopie publikacji w Załączniku nr 5.

- 1) Grzanka D., Izdebska M., Klimaszewska-Wiśniewska A., **Gagat M.** The alterations in SATB1 and nuclear F-actin expression affect apoptotic response of the MCF-7 cells to geldanamycin. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015; 53: 79-87.
IF = 1.060; MNiSW = 15
- 2) Grzanka D., Kowalczyk A.E., Izdebska M., Klimaszewska-Wisniewska A., **Gagat M.** The interactions between SATB1 and F-actin are important for mechanisms of active cell death. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015; 53: 152-61.
IF = 1.060; MNiSW = 15
- 3) Izdebska M.*, **Gagat M.***, Grzanka A. Overexpression of lamin B1 induces mitotic catastrophe in colon cancer LoVo cells and is associated with worse clinical outcomes. *Int J Oncol.* 2018; 52: 89-102. **równoważny udział autorów w pracy, IF = 3.333; MNiSW = 25*
- 4) Izdebska M., Zielińska W., Grzanka D., **Gagat M.** The role of actin dynamics and actin-binding proteins expression in epithelial-to-mesenchymal transition and its association with cancer progression and evaluation of possible

therapeutic targets. Biomed Res Int. 2018; 2018: 4578373. **IF = 2.583; MNiSW = 25**

- 5) **Gagat M.**, Grzanka D., Izdebska M., Sroka W.D., Hałas-Wiśniewska M., Grzanka A. Tropomyosin-1 protects transformed alveolar epithelial cells against cigaret smoke extract through the stabilization of F-actin-dependent cell-cell junctions. Acta Histochem. 2016; 118: 225-35. **IF = 1.360; MNiSW = 15**
- 6) **Gagat M.***, Grzanka D.* Letter by Gagat and Grzanka regarding article, "Neutrophil activation of endothelial cell-expressed TRPM2 mediates transendothelial neutrophil migration and vascular injury". Circ Res. 2017; 121: e86. **równoważny udział autorów w pracy*, **IF = 15.211; MNiSW = 50**
- 7) **Gagat M.**, Zielińska W., Grzanka A. Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review). Int J Mol Med. 2017; 40: 1615-1623. **IF = 2.784; MNiSW = 20**
- 8) **Gagat M.**, Grzanka A., Grzanka D. Stent wewnątrznaczyniowy, zwłaszcza naczyń wieńcowych. Patent udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej. Data i nr zgłoszenia: 13.07.2017 r., P.422210; Data wydania decyzji o udzieleniu prawa wyłącznego i nr prawa wyłącznego: 13.06.2018 r., PAT.230281. **MNiSW = 30**
- 9) **Gagat M.***, Krajewski A.*, Grzanka D., Grzanka A. Potential role of cyclin F mRNA expression in the survival of skin melanoma patients: Comprehensive analysis of the pathways altered due to cyclin F upregulation. Oncol Rep. 2018; 40: 123-144. **równoważny udział autorów w pracy*, **IF = 2.976; MNiSW = 20**

4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe oparte jest na **8** tematycznie wybranych publikacjach naukowych oraz **1** opatentowanym wynalazku, których powstanie było **efektem kontynuacji moich wcześniejszych badań i zaangażowania w liczne**

projekty badawcze. Tematyka prac włączonych w powyższy cykl opracowań naukowych jest ściśle związana z **udziałem cytoszkieletu oraz białek cyklu komórkowego w fizjologicznych i patologicznych procesach komórkowych**, pozostając jednocześnie w nurcie aktualnych, światowych badań nad mechanizmami śmierci komórek, mechanotransdukcji i sygnalizacji komórkowej oraz przebiegiem cyklu komórkowego. Zakres badań uwzględnionych w zgłoszonym osiągnięciu naukowym został podzielony na **trzy główne obszary: powiązanie funkcjonalne nukleoszkieletu z procesami śmierci komórkowej, zaangażowanie F-aktyny w organizację połączeń międzykomórkowych oraz poszukiwanie niekanonicznych funkcji białek cyklu komórkowego.** Celem powyżej określonych obszarów badawczych było nie tylko wyjaśnienie procesów zachodzących na terenie komórki, ale również ich wpływ na interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową lub innymi komórkami. Prace włączane do osiągnięcia naukowego pokazują, że ta niezwykle skomplikowana sieć wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi komponentami komórkowymi, poprzez cząsteczki adhezyjne, stanowi podstawę „integralnej macierzy” regulującej stan czynnościowy tkanek w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych. Ponadto dynamiczna natura cytoszkieletu podczas progresji komórek przez cykl wskazuje na ścisłą i skoordynowaną zależność pomiędzy zmianami mechanicznymi cytoszkieletu, adhezją komórkową oraz podziałem komórek. Należy nadmienić, że każde z podjętych zadań badawczych ma **aspekt aplikacyjny, który opiera się na poszukiwaniu zależnych czynników predykcyjnych lub nowych metod ukierunkowanego leczenia.**

4.3.1. POWIĄZANIE FUNKCJONALNE NUKLEOSZKIELETU Z PROCESAMI ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ

Śmierć komórki jest jednym z podstawowych procesów biologicznych pełniących kluczową rolę zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych organizmu. Liczne dowody eksperymentalne zgromadzone w przeciągu kilku ostatnich dziesięcioleci ujawniły i szczegółowo scharakteryzowały zestaw mechanizmów ukierunkowanej eliminacji zbędnych, nieodwracalnie uszkodzonych lub potencjalnie szkodliwych komórek. Komórki mogą umierać w sposób pasywny, w następstwie poważnego uszkodzenia ich integralności strukturalnej, lub aktywny, np. w wyniku uszkodzenia DNA. Regulowana śmierć komórek (RCD, ang. regulated cell death) jest kontrolowanym procesem, który z punktu widzenia organizmu wielokomórkowego, jest

niezwykle istotny dla jego prawidłowego rozwoju, zachowania integralności tkankowej oraz homeostazy. Deregulacja tego procesu związana jest z patogenezą różnych stanów, w tym zaburzeń rozwojowych i immunologicznych, chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych.

W ostatnich latach obserwuje się wyraźny regres w liczbie publikacji na temat wyjaśnienia szczegółowych mechanizmów śmierci komórkowej. Natomiast wzrasta liczba prac przedstawiających translacyjne aspekty śmierci komórek, m.in. w chorobach układu sercowo-naczyniowego, patologiach neurodegeneracyjnych oraz z zakresu onkologii. Tym samym przejście z badań podstawowych nad mechanizmami śmierci komórkowej w kierunku badań translacyjnych w zasadniczej większości dotyczy interwencji genetycznych oraz farmakologicznych regulatorów maszynerii śmierci komórkowej oraz prób identyfikacji nowych możliwości regulacji tego procesu. W świetle powyższego oraz potencjalnego celu w terapii, zwłaszcza przeciwnowotworowej, cytoskielet aktynowy wydaje się być niezwykle atrakcyjny. Wykazano m.in., że jest on jednocześnie inicjatorem i mediatorem aktywnej śmierci komórek, a dynamika aktyny odgrywa kluczową rolę w regulacji sygnalizacji apoptozy.

Aktyna jest białkiem globularnym, które posiada zdolność do polimeryzacji w filamenty. Polimeryzacja monomerów aktyny (G-aktyny) w postaci filamentarną (F-aktynę) jest ściśle regulowana poprzez szereg białek wiążących aktynę (ABPs, ang. actin-binding proteins), a ciągła przebudowa F-aktyny warunkuje dynamiczną naturę mikrofilamentów. Powyższa właściwość F-aktyny jest niezbędna i kluczowa dla wielu istotnych procesów komórkowych, tj. migracja, adhezja, transport wewnątrzkomórkowy, czy cytokineza. Funkcje aktyny nie są jednak ograniczone tylko do cytoplazmy. Obecna jest ona również w jądrze komórkowym, gdzie pełni szereg, często odmiennych funkcji. Pierwsze doniesienia na temat obecności jądrowej aktyny, zwłaszcza w postaci spolimeryzowanej, traktowane były dość sceptycznie. Jednym z głównych powodów wątpliwego podejścia wielu grup badawczych co do istnienia jądrowej F-aktyny były ograniczenia metodyczne wynikające z braku możliwości wyznakowania krótkich lub rozproszonych polimerów jądrowej aktyny technikami fluorescencyjnymi lub na poziomie ultrastrukturalnym. Jednakże rozwój technologiczny, wraz z opracowaniem szeregu nowych metod badawczych, umożliwił zlokalizowanie i powiązanie funkcjonalne jądrowej aktyny. Wykazano jej udział m.in. w rearanżacji chromatyny czy regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych. Poziom aktyny jądrowej jest znacznie niższy niż cytoplazmatycznej i jest stale regulowany

poprzez transport jądrowo-cytoplazmatyczny. Import aktyny do jądra komórkowego odbywa się w kompleksie z kofiliną (CFL, ang. cofilin) i zachodzi przy udziale importyny-9 (IPO9, ang. Importin-9), natomiast eksport poprzez eksportynę-6 (XPO6, ang. exportin-6).

Pierwszy z obszarów włączonych do osiągnięcia naukowego jest kontynuacją mojego zaangażowania w szereg projektów, w ramach których opracowaliśmy metody umożliwiające nie tylko potwierdzenie obecności F-aktyny na terenie jądra komórkowego, ale również określenie jej funkcjonalnych relacji z innymi białkami macierzy jądrowej. Podczas realizacji grantu MNiSW pt.: „Ocena reorganizacji puli aktyny jądrowej i cytoplazmatycznej oraz zmiany ekspresji kofiliny w procesie apoptozy i katastrofy mitotycznej w wybranych liniach komórkowych” napotkaliśmy trudności z lokalizacją spolimeryzowanej postaci aktyny na poziomie mikroskopu elektronowego, zwłaszcza na terenie jądra komórkowego. Problem ten został rozwiązany podczas realizacji grantu Rektora UMK pt.: „Zastosowanie nanocząsteczek w celu lokalizacji filamentów aktynowych z użyciem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej po indukcji śmierci komórek linii HL-60 i CHO AA8”. Wykazaliśmy, że ultrastrukturalne znakowanie F-aktyny możliwe jest poprzez inkubację komórek z biotynylowaną falloidyną techniką „przed-zatopieniem” oraz jej detekcję „po-zatopieniu” za pomocą nanokryształów półprzewodnikowych opłaszczonych streptawidyną (Oncol Rep. 2012, 28: 2138-48; Acta Histochem. 2013, 115: 487-95). Metoda ta pozwoliła nam na uwidocznienie F-aktyny w jądrze komórkowym, a dokładniej jej zlokalizowanie przede wszystkim w komórkach umierających na drodze aktywnej śmierci w miejscach granicznych pomiędzy skondensowaną i zdekondensowaną chromatyną. Odkrycie to wykazało udział jądrowej F-aktyny w procesach rearanżacji chromatyny, a także pozwoliło nam wnioskować o obecności polimerycznej aktyny na terenie jądra komórkowego w postaci dłuższej niż 7 podjednostek aktynowych. Ponadto, metoda ta okazała się być kompatybilna z techniką ultrastrukturalnego znakowania białek „immuno-Gold” i pozwoliła na detekcję złożonych kompleksów białkowych zaangażowanych w różne procesy zachodzące w jądrze komórkowym z udziałem F-aktyny, np. z białkiem SATB1 (ang. special AT-rich binding protein 1) w komórkach umierających na drodze śmierci aktywnej (Acta Histochem. 2013, 115: 775-82; Int J Mol Med. 2014, 33: 1441-50; Folia Histochem Cytobiol. 2015, 53: 152-61). Kolejny problem napotkaliśmy podczas realizacji grantu MNiSW pt.: „Powiązanie funkcjonalne

puli F-aktyny jądrowej i białka SATB1 w komórkowym modelu raka piersi” i dotyczył on możliwości wykazania fizycznych kompleksów jądrowej F-aktyny z białkiem SATB1. Wprawdzie techniki oparte na wizualizacji, tj. kolokalizacja na poziomie mikroskopu konfokalnego, technika FRET, czy wspomniane już podwójne znakowanie F-aktyny i białka SATB1 na poziomie ultrastrukturalnym, sugerowały o możliwości istnienia bezpośrednich interakcji SATB1 z jądrową F-aktyną. Jednakże dopiero opracowanie metody separacji magnetycznej kompleksów białkowych z F-aktyną potwierdziło występowanie białka SATB1 w molekularnej interakcji z F-aktyną podczas aktywnej śmierci komórek (Int J Mol Med. 2014, 33: 1441-50).

Jądra komórek eukariotycznych uważane są za dynamiczne oraz wysoko zorganizowane struktury, w których cała informacja genetyczna musi być dostępna do replikacji i transkrypcji. Geny są typowo zorganizowane w pętli chromatyny o różnych rozmiarach, które przyłączone są do białkowej macierzy jądrowej w miejscach zwanych regionami przylegania macierzy jądrowej (MARs, ang. matrix attachment regions). Powyższe sekwencje DNA stanowią nietranskrybowane regiony genów i tworzą fizyczne granice pomiędzy indywidualnymi pętlami DNA. Jednym z lepiej poznanych białek macierzy jądrowej, stanowiących zarazem istotny element moich zainteresowań badawczych, jest białko SATB1. Białko to zostało po raz pierwszy opisane w 1992 roku przez zespół Kowi-Shigematsu i jest istotnym elementem macierzy jądrowej zaangażowanym w organizację genomu. Wiąże się do zmienionego rdzenia cukrowo-fosforanowego wyspecjalizowanych regionów dwuniciowego DNA, zwanych regionami niesparowanych zasad (BURs, ang. base unpairing regions) DNA. BURs scharakteryzowane zostały jako regiony bogate na jednej nici w adeninę, tyminę i cytozynę, ale nie w guaninę, i często zlokalizowane są w obrębie MARs. Białko SATB1 w sposób szczególny wiąże się do BURs. Nie przyłącza się do odsłoniętych zasad DNA, lecz wsuwa się w mniejszy rowek na zewnątrz dwuniciowych sekwencji BURs. Ponadto zamiast rozpoznawać konkretną sekwencję pierwotną, SATB1 rozpoznaje „kontekst sekwencji ATC” (ang. ATC sequence context), czyli miejsce niesparowanych zasad, które posiada tendencję do rozejścia się, gdy znajduje w miejscu napięcia spowodowanego przez negatywne superskręty DNA. Dzięki temu białko to może być z jednej strony bardzo specyficzne, a z drugiej działać wszechstronnie. Wykazano również, że na terenie jądra komórkowego SATB1 tworzy charakterystyczną trójwymiarową strukturę otaczającą heterochromatynę. Jądrowa organizacja „sieci regulacyjnej SATB1” (ang. SATB1 regulatory network) wyglądem

przypomina „klatkę” lub „siatkę ogrodzeniową” i z funkcjonalnego punktu widzenia jest to o tyle istotne, że opisywane białko umożliwia selektywną i skoordynowaną ekspresję wielu odległych od siebie genów równocześnie. Ponadto reguluje ekspresję wybranych genów poprzez rekrutację kompleksów przebudowy/modyfikacji chromatyny oraz czynników transkrypcyjnych do wybranych loci genomowych. Pierwotnie funkcję białka SATB1 opisywano w dojrzewaniu tymocytów lub różnicowaniu komórek macierzystych. Jednakże rola tego białka nie ogranicza się jedynie do procesów fizjologicznych. Powiązanie funkcjonalne białka SATB1 z sygnalizacją Wnt/ β -katenina otworzyło nowe i godne uwagi pod względem klinicznym kierunki dla dalszych badań nad udziałem SATB1 w kancerogenezie. Odmienna od tej obserwowanej w prawidłowej tkance ekspresja SATB1 zidentyfikowana została w wielu typach nowotworów, m.in. w agresywnym raku sutka, jelita grubego, trzustki, prostaty, wątroby, płuc, czy w chłoniakach.

W zakresie pierwszego obszaru badań ujętych w osiągnięciu naukowym istotne są prace dotyczące powiązania jądrowej ekspresji białka SATB1 oraz jego interakcji z jądrową F-aktyną w odpowiedzi modelowych komórek raka sutka linii MCF7 na działanie geldanamycyny (GA, ang. geldanamycin). Po serii doniesień naukowych pokazujących zaangażowanie jądrowej F-aktyny w procesy śmierci komórkowej (Folia Histochem Cytobiol. 2010, 48: 377-386) oraz powiązanie białka SATB1 ze śmiercią komórek CHO AA8 (Int J Mol Med. 2014, 33: 1441-50) i Jurkat (Oncol Rep. 2015, 33: 250-66), a także wykazaniu rokowniczego potencjału białka SATB1 w chłoniakach skóry z komórek T (Pol J Pathol. 2012, 63: 101-5; Oncol Rep. 2015, 33: 250-266), postanowiliśmy określić na ile obserwowany wcześniej mechanizm jest uniwersalny. Przeprowadzenie tych badań było również szczególne ze względu na doniesienia innych zespołów naukowych oraz w świetle toczących się dyskusji o zaangażowaniu SATB1 w raku sutka. W 2008 roku, Han i wsp. ze wspomnianego wcześniej zespołu Kowi-Shigematsu pokazali, że SATB1 wykazuje ekspresję w agresywnych komórkach raka sutka, a jego poziom ekspresji ma znaczenie rokownicze, niezależne od statusu węzłów chłonnych. Równocześnie wykazano, że wyciszenie SATB1 techniką interferencji RNA (RNAi, ang. RNA interference) powodowało zmiany w ekspresji ponad 1000 genów zaangażowanych w wiele aspektów nowotworzenia. Wyciszenie ekspresji zmieniało fenotyp komórek agresywnego raka sutka na nieinwazyjny o morfologii przypominającej „kostkę brukową” oraz hamowało wzrost guza i metastazy *in vivo*. Natomiast wzbudzenie

ekspresji SATB1 w komórkach nieagresywnego raka sutka prowadziło do zmian profilu ekspresyjnego w kierunku komórek inwazyjnych i wzmagало metastazę *in vivo*. Co więcej, analiza losowo wybranych genów zależnych od ekspresji SATB1 potwierdziła bezpośrednie wiązanie się SATB1 do BURs leżących w ich obrębie oraz wykazała zaangażowanie tego białka w epigenetyczną modyfikację badanych loci genomowych. Jednakże w 2010 roku Iorns i wsp. z zespołu Lippman'a nie zaobserwowali korelacji pomiędzy ekspresją SATB1 a pokazanymi przez Han i wsp. zmianami fenotypu komórek zarówno w liniach agresywnego, jak i nieagresywnego raka sutka. Nie wykazali również zależności pomiędzy ekspresją SATB1 w nieagresywnych liniach raka sutka a wzrostem guza czy ujawnieniem się fenotypu metastatycznego *in vivo*. Ponadto, wykorzystując niezależne dane mikromacierzowe, nie zaobserwowali korelacji pomiędzy ekspresją SATB1 a przeżyciem pacjentek z rakiem sutka. Co ciekawe, zgodnie z obserwacjami Iorns i wsp., zwiększone przeżycie pacjentów wydawało się być związane z wysoką ekspresją SATB1. Brak powiązania SATB1 jako negatywnego czynnika rokowniczego w raku sutka zaprezentowali również w 2011 roku Hanker i wsp. opierając się tylko na badaniach mikromacierzowych. Wykazali oni lepszą prognozę pacjentów z ekspresją receptorów estrogenowych wobec wysokiej ekspresji SATB1 na poziomie transkryptu. Powodów różnic w uzyskanych wynikach może być wiele. Han i wsp. w 2010 roku podkreślili, że wynikają one przede wszystkim z heterogenności linii komórkowych oraz analizy ekspresji tylko na poziomie transkryptu, która nie jest przecież ograniczona wyłącznie do komórek nowotworowych. Zasugerowali również wpływ podścieliska oraz fakt, że aktywowane komórki podścieliska wykazują ekspresję SATB1. Dodatkowo warto tu zwrócić uwagę na niespecyficzną używanych przeciwciał przeciwko SATB1 i wysokie podobieństwo do SATB2, które wykazuje aż 61% homologię na poziomie aminokwasowym. Biorąc pod uwagę powyższe oraz wyniki badań naszego zespołu, należy stwierdzić, że rola SATB1 w nowotworzeniu nie jest jednoznaczna. Stąd konieczne są dalsze badania dokładające kolejne elementy do układanki jaką jest epigenetyczne znaczenia białka SATB1. Na krótko po publikacji pierwszego doniesienia o rokowniczej naturze SATB1 w agresywnym raku sutka, Zheng zasugerował, że aby wyjaśnić rolę SATB1 w rozwoju i przebiegu klinicznym nowotworów należy odpowiedzieć na dwa fundamentalne pytania: (1) „Jakie czynniki determinują ekspresję SATB1?” oraz (2) „Jakie inne czynniki mogą działać razem z SATB1?”. W swoich poprzednich pracach staraliśmy się odpowiedzieć na oba te pytania. Po pierwsze wykazaliśmy, że SATB1 jest

pozytywnym czynnikiem rokowniczym w chłoniakach skóry z komórek T i pokazaliśmy, że obniżenie ekspresji SATB1 powodowało oporność komórek Jurkat stymulowanych IL-2 na śmierć komórkową indukowaną przeciwciałem monoklonalnym (mAb, ang. monoclonal antibody) przeciwko CD3, albo mAb przeciwko CD95, albo octanem mirystynianu forbolu (PMA, ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) łącznie z jonomycyną – jonoforem transportującym jony (Oncol Rep. 2015, 33: 250-66). Po drugie, przedstawiliśmy funkcjonalne interakcje białka SATB1 z jądrową F-aktyną w reorganizacji chromatyny towarzyszącej procesom transkrypcyjnym podczas indukowanej doksorubicyną (DOX, ang. doxorubicin) aktywnej śmierci komórek CHO AA8 (Int J Mol Med. 2014, 33: 1441-50). Jednakże wciąż, istotne było określenie czy obserwowana kooperacja SATB1 i jądrowej F-aktyny w procesach śmierci indukowanej cytostatykami jest mechanizmem uniwersalnym i występuje w innych typach komórek, zwłaszcza nowotworowych.

Celem **publikacji nr 1** pt. „The alterations in SATB1 and nuclear F-actin expression affect apoptotic response of the MCF-7 cells to geldanamycin” (Folia Histochem Cytobiol. 2015, 53: 79-87) włączonej do pierwszego obszaru osiągnięcia naukowego było **określenie wpływu kontrolowanej ekspresji jądrowej puli F-aktyny oraz białka SATB1 na indukcję aktywnej śmierci komórek nieagresywnego raka sutka linii MCF7 traktowanych geldanamycyną** (GA, ang. geldanamycin) – benzochinonowym antybiotykiem ansamycynowym, który poprzez wiązanie się do białka opiekuńczego HSP90 hamuje jego aktywność. Wprawdzie komórki nieagresywnego raka sutka wykazują niezbyt wysoką ekspresję SATB1, to w świetle badań przeprowadzonych na skrawkach parafinowych chłoniaków skóry z komórek T, gdzie wykazaliśmy, że nawet średnia ekspresja SATB1 na poziomie białka ma istotne znaczenie rokownicze (Oncol Rep. 2015, 33: 250-66), wybór modelu eksperymentalnego był uzasadniony. Ekspresja białka SATB1 regulowana była techniką RNAi przy użyciu małego interferencyjnego RNA (siRNA, ang. small interfering RNA) lub poprzez wprowadzenie do komórek plazmidowego wektora ekspresyjnego z wklonowaną sekwencją cDNA ludzkiego SATB1. Natomiast zmiany w lokalizacji i ekspresji jądrowej F-aktyny osiągnięto poprzez analogiczną regulację poziomu kofiliny 1 (CFL1, ang. cofilin 1). Oceniono towarzyszącą apoptozie eksternalizację fosfatydyloseryny oraz rozkład cyklu komórkowego. Przeprowadzone badania wykazały, że GA indukuje apoptozę zarówno w komórkach MCF7 stransfekowanych kontrolnym siRNA, jak i wektorem plazmidowym bez wklonowanej

sekwencji cDNA SATB1 albo CFL1. Obniżenie ekspresji SATB1 istotnie statystycznie zmniejsza apoptozę komórek MCF7 w odpowiedzi na działanie GA. Natomiast nadekspresja SATB1 istotnie statystycznie wpłynęła na podwojenie liczby komórek apoptotycznych indukowanych GA. W przypadku wymuszonej lokalizacji jądrowej F-aktyny, a więc w komórkach ze wzbudzoną nadekspresją CFL1, w odpowiedzi na działanie GA również zaobserwowaliśmy ponad dwukrotny wzrost liczby komórek apoptotycznych. Nie wykazaliśmy natomiast istotnych statystycznie zmian w indukcji apoptozy w warunkach obniżonej ekspresji CFL1. Interesująca okazała się analiza rozkładu cyklu komórkowego wobec regulowanej ekspresji SATB1 i CFL1. W komórkach MCF7 stransfekowanych kontrolnym siRNA albo wektorem plazmidowym bez wklonowanej sekwencji cDNA SATB1 albo CFL1, pod wpływem działania GA obserwowaliśmy istotny statystycznie wzrost populacji komórek hipodiploidalnych oraz w fazie G1 cyklu komórkowego z towarzyszącym obniżeniem odsetka komórek w fazie S oraz brakiem istotnych statystycznie różnic w odsetku komórek w fazie G2 cyklu komórkowego. Ponadto, w komórkach stransfekowanych kontrolnym siRNA, GA istotnie statystycznie wpłynęła na obniżenie populacji komórek poliploidalnych, czego nie zaobserwowaliśmy w przypadku komórek stransfekowanych kontrolnym wektorem plazmidowym. W komórkach z obniżoną ekspresją SATB1 w odpowiedzi na działanie GA wykazaliśmy wzrost populacji komórek hipodiploidalnych i będących w fazie G1, a także obniżenie odsetka komórek w fazie S i populacji komórek poliploidalnych. Nie zaobserwowaliśmy natomiast indukowanych GA zmian w odsetku komórek w fazie G2. Podobnie, w komórkach ze wzbudzoną ekspresją SATB1, odnotowaliśmy wyraźny i zbliżony do siebie wzrost odsetka komórek hipodiploidalnych oraz będących w fazie G1 cyklu komórkowego, a także towarzyszące temu obniżenie populacji komórek w fazach S, G2 oraz odsetka komórek poliploidalnych. W przypadku komórek MCF7 z obniżoną ekspresją CFL1 eksponowanych na działanie GA, zaobserwowaliśmy podobny wzrost odsetka komórek hipodiploidalnych, będących w fazie G1 cyklu komórkowego oraz poliploidalnych z towarzyszącym obniżeniem populacji komórek w fazie S. Nie wykazaliśmy z kolei istotności statystycznej w odsetku komórek w fazie G2. Natomiast w komórkach ze wzbudzoną ekspresją SATB1, pomimo podobnego braku istotności statystycznych w odsetku komórek w fazie G2 cyklu komórkowego, GA indukowała wzrost populacji komórek hipodiploidalnych oraz będących w fazie G1, jak również obniżenie odsetka komórek w fazie S oraz wykazujących cechy poliploidalności. **Przedstawione powyżej wyniki badań sugerują, że zarówno**

ekspresja SATB1, jak i jądrowa lokalizacja F-aktyny potęgują odpowiedź komórek nieagresywnego raka sutka linii MCF7 na działanie GA. W związku z tym, że uzyskane wyniki potwierdziły nasze wcześniejsze doniesienia o zaangażowaniu jądrowej F-aktyny oraz SATB1 w inicjacji aktywnej śmierci komórek, postanowiliśmy ocenić stopień zaangażowania SATB1 i jądrowej F-aktyny w inicjację indukowanej GA śmierci komórek linii MCF7.

Celem **publikacji nr 2** pt. „The interactions between SATB1 and F-actin are important for mechanisms of active cell death” (Folia Histochem Cytobiol. 2015, 53: 152-61) włączonej do pierwszego obszaru osiągnięcia naukowego była **ocena jądrowej lokalizacji i interakcji pomiędzy F-aktyną a SATB1 podczas aktywnej śmierci komórek MCF7 w warunkach regulowanej ekspresji obu białek**. Kontynuując zagadnienie związane z udziałem jądrowej F-aktyny i białka SATB1 w procesie aktywnej śmierci komórek nieagresywnego raka sutka linii MCF7 indukowanej GA, w niniejszej pracy **określono interakcje pomiędzy jądrową F-aktyną a białkiem SATB1 korzystając z technik fluorescencyjnych, transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz metody separacji magnetycznej F-aktyny łącznie z białkami z nią związanymi**. Badania fluorescencyjne wykazały istotny statystycznie wzrost kolokalizacji F-aktyny oraz SATB1 głównie w obrębie jądra komórkowego pod wpływem działania GA zarówno w komórkach stransfekowanych kontrolnym siRNA, jak i wektorem plazmidowym bez wklonowanej sekwencji cDNA SATB1 albo CFL1. Podobny jądrowy wzrost kolokalizacji F-aktyny i SATB1 pod wpływem działania GA obserwowaliśmy w komórkach ze wzbudzoną ekspresją SATB1 albo CFL1. Nie odnotowaliśmy istotnych statystycznie różnic w kolokalizacji powyższych białek w komórkach MCF7 z obniżoną ekspresją SATB1 albo CFL1. Wyniki te zostały potwierdzone na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego przy wykorzystaniu autorskiej metody znakowania F-aktyny opartej na falloidynie i nanokryształach półprzewodnikowych. Wykazaliśmy znajdujące się blisko siebie zgrupowania nanocząstek złota (SATB1) oraz nanokryształów półprzewodnikowych (F-aktyna) na granicy elektronowo-gęstej i elektronowo-przezierniej chromatyny, a więc pomiędzy chromatyną skondensowaną i zdecondensowaną. Bliskie sąsiedztwo obu białek zostało również potwierdzone pomiarem transferu energii metodą FRET po fotowylaknięciu akceptora. Wykazaliśmy istotny statystycznie wzrost wydajności FRET pod wpływem działania GA zarówno w komórkach stransfekowanych kontrolnym wektorem plazmidowym, jak i tych ze wzbudzoną ekspresją SATB1 albo

CFL1. Jednakże uzyskane wartości wydajności FRET w przypadku komórek MCF7 ze wzbudzoną ekspresją SATB1 albo CFL1 były znacznie wyższe. Co więcej, metoda to potwierdziła, że dystans pomiędzy zastosowanymi znacznikami obu białek jest mniejszy niż 10 nm, co może sugerować o wzajemnej interakcji pomiędzy SATB1 a jądrową F-aktyną. W celu potwierdzenia występowania powyższych interakcji na poziomie molekularnym zastosowano kolejną autorską metodę, tym razem opartą o separację magnetyczną F-aktyny łącznie z białkami z nią związanymi. Badania potwierdziły wzrost ilości białka SATB1 wchodzącego w molekularne interakcje z F-aktyną po indukcji aktywnej śmierci komórek przy użyciu GA. **Podsumowując, zaprezentowane powyżej badania potwierdziły istotność interakcji SATB1/jądrowa F-aktyna w procesie aktywnej śmierci komórki, tym razem w komórkach nieinwazyjnego raka sutka linii MCF7. Ponadto, zaprezentowane wyniki wraz z poprzednimi pracami naszego zespołu mogą świadczyć o pewnej uniwersalności powyższych oddziaływań, które nie są zależne od rodzaju komórek.**

Innym zagadnieniem podjętym w trakcie realizacji powyższego obszaru moich zainteresowań badawczych jest udział lamin jądrowych w procesach śmierci komórkowej oraz ich rokowniczy charakter w nowotworach. Lamininy są jednymi z najistotniejszych białek determinujących architekturę i funkcję jądra komórkowego. Białka te należą do V grupy filamentów pośrednich i tworzą wewnętrzne rusztowanie nukleoszkieletu, które zbudowane jest głównie z lamin typu A oraz B. Obecnie, sieć filamentów laminowych, jako nadrzędny element nukleoszkieletu, postrzegana jest nie tylko jako struktura utrzymująca kształt i właściwości mechaniczne jądra komórkowego, ale również uważana jest za miejsce przyłączenia chromatyny oraz licznych białek zaangażowanych w jej organizację. Ponadto, mniejsze i bardziej dynamiczne filamety laminowe zidentyfikowano jako komponenty dużych kompleksów białkowych zaangażowanych w liczne procesy zachodzące na terenie jądra komórkowego, m.in. w transkrypcję, replikację, naprawę DNA czy regulacje epigenetyczne. Podobnie jak w przypadku opisywanego wcześniej białka macierzy jądrowej – SATB1, zidentyfikowano powiązanie pomiędzy aktyną jądrową i białkiem 4.1 a laminami A/C oraz emeryną, co wskazuje na udział jądrowej aktyny w organizacji nukleoszkieletu. Wykazano także, że lamininy poprzez białka blaszki jądrowej posiadające domeny SUN oraz KASH wchodzą w interakcje z cytoszkieletem, a tym samym pośredniczą w mechanotransdukcji z udziałem systemów połączeń

międzykomórkowych oraz adhezji komórek do matrix zewnątrzkomórkowego (ECM, ang. extracellular matrix).

Komórki nowotworowe charakteryzują się często odmienną morfologią i towarzyszącą atypią jądra komórkowego. Powiązanie funkcjonalne wpływu ECM na progresję nowotworową, polaryzację oraz migrację komórek, a także zmiany w strukturze i aktywności procesów na terenie jądra komórkowego było wystarczającym inicjatorem do badań nad udziałem lamin w transformacji nowotworowej. Zaburzenia w ekspresji lamin wykazano w wielu typach nowotworów. Obniżony poziom lamin typu A odnotowano m.in. w białaczkach, chłoniakach, raku sutka oraz żołądka, natomiast podwyższony w nowotworach skóry. Z kolei obniżoną ekspresję lamin typu B zaobserwowano w raku sutka, a podwyższoną np. raku prostaty i wątroby. Jednakże rola lamin w chorobach nowotworowych wciąż nie jest do końca poznana. Wynika to przede wszystkim z ich zmiennej ekspresji zarówno pomiędzy odmiennymi typami nowotworów, jak i różnymi stadiami tej samej choroby, jak np. w raku jelita grubego.

Celem **publikacji nr 3** pt. „Overexpression of lamin B1 induces mitotic catastrophe in colon cancer LoVo cells and is associated with worse clinical outcomes” (Int J Oncol. 2018, 52: 89-102) włączonej do pierwszego obszaru osiągnięcia naukowego była **ocena wpływu ekspresji laminy B1 (LMNB1, ang. lamin B1) na indukowaną 5-fluorouracylem (5-FU, ang. 5-fluorouracil) śmierć komórek linii LoVo**, pierwotnie wyizolowanych z przerzutu gruczolaka okrężnicy do nadobojczykowych węzłów chłonnych. Oceniono rodzaj indukowanej 5-FU śmierci komórek, ich migrację, a także zależność pomiędzy ekspresją LMNB1 a β -kateniny oraz wpływ nadekspresji LMNB1 na organizację mikrofilamentów, mikrotubul i lamin A/C. Ekspresja LMNB1 indukowana była poprzez wprowadzenie do komórek plazmidowego wektora ekspresyjnego z wklonowaną sekwencją cDNA ludzkiej LMNB1. Przeprowadzone badania wykazały, że nadekspresja LMNB1 wzmaga odpowiedź komórek LoVo na działanie 5-FU. Obserwowaliśmy zarówno istotny statystycznie wzrost eksternalizacji fosfatydyloseryny pod wpływem działania 0.1 oraz 5 mM 5-FU w komórkach ze wzbudzoną ekspresją LMNB1, jak również obniżenie indukowanej nekrozy w odpowiedzi na działanie 5 mM 5-FU. Co więcej, analiza rozkładu cyklu komórkowego wykazała zależną od ekspresji LMNB1 blokadę cyklu komórkowego w fazie G1, wraz z towarzyszącym obniżeniem odsetka komórek w fazie S pod wpływem działania 0.1, 1 i 5 mM 5-FU. Natomiast zależny od ekspresji LMNB1 i istotny statystycznie wzrost populacji komórek poliploidalnych i hipodiploidalnych

zaobserwowano pod wpływem działania 1 i 5 mM 5-FU. Cytofotometryczna analiza rodzaju indukowanej śmierci komórek została uzupełniona o ocenę organizacji cytoszkieletu, która wykazała, że 5-FU, zwłaszcza w stężeniu 5 mM, promuje śmierć na drodze katastrofy mitotycznej w komórkach z podwyższoną ekspresją LMNB1. Dodatkowo, komórki te charakteryzowały odmienną organizacją mikrotubul i mikrofilamentów, wzrostem jądrowej lokalizacji F-aktyny oraz akumulacją laminy A/C na obrzeżach jądra komórkowego. Jednocześnie, w komórkach nieulegających katastrofie mitotycznej, indukowana 5-FU zmiana organizacji cytoszkieletu promowała kontakt międzykomórkowy. Zaobserwowaliśmy m.in. korelację pomiędzy ekspresją LMNB1 a istotnym statystycznie wzrostem poziomu β -kateniny zaangażowanej w formowanie połączeń międzykomórkowych pod wpływem działania 0.1 i 1 mM 5-FU oraz kolokalizację β -kateniny z F-aktyną w warstwie korowej cytoplazmy. Odzwierciedleniem wzmożonego kontaktu międzykomórkowego były również wyniki testu „gojenia się rany” (ang. wound healing assay). Zaobserwowaliśmy zależne od LMNB1 zahamowanie migracji horyzontalnej komórek pod wpływem działania 5-FU. Badania uzupełniono także o analizę *in silico* przeżyciowych danych onkologicznych względem poziomu ekspresji mRNA LMNB1 z projektu Atlas Genomu Raka (TCGA, ang. The Cancer Genome Atlas). Co ciekawe, nie zaobserwowaliśmy istotnych statystycznie zmian pomiędzy przeżyciem pacjentów z gruczolakorakiem jelita grubego względem wysokiej i niskiej ekspresji LMNB1 w długiej perspektywie czasowej. Jednakże zależne od wysokiej ekspresji LMNB1 i istotne statystycznie obniżenie przeżycia wykazaliśmy w pierwszych 30 miesiącach od diagnozy.

Zaprezentowane powyżej badania z jednej strony pokazują, że wzbudzenie nadekspresji LMNB1 wzmaga kontakt międzykomórkowy, prowadząc do ograniczania potencjału migracyjnego komórek w odpowiedzi na działanie 5-FU. Z drugiej strony, potęguje indukowaną 5-FU śmierć komórek, zwłaszcza na drodze katastrofy mitotycznej. Ponadto, kliniczną istotność ekspresji LMNB1 na poziomie transkryptu wykazaliśmy u pacjentów z gruczolakorakiem jelita grubego, u których zaobserwowaliśmy odwrotną korelację pomiędzy ogólnym czasem przeżycia a ekspresją LMNB1. Katastrofa mitotyczna zgodnie z definicją przedstawioną w 2012 roku przez Międzynarodowy Komitet ds. Nazewnictwa Śmierci Komórki (NCCD, ang. Nomenclature Committee on Cell Death) jest wewnętrznym mechanizmem onkosupresyjnym, który wykrywa nieprawidłową mitozę i kieruje komórki do nieodwracalnego stanu antyproliferacyjnego, ostatecznie prowadząc do

śmierci lub starzenia się komórek. Jednakże, jak zostało przedstawione w raporcie NCCD za rok 2018, ucieczka komórek ze stanu katastrofy mitotycznej jest kluczowa podczas transformacji i progresji nowotworowej, pozwalając tym samym na tworzenie się lub przeżycie komórek poliploidalnych i aneuploidalnych. Ponadto nowotworzone aneuploidalne mikrokomórki, zwane komórkami Raju, powstają z olbrzymich komórek wielojądrzastych w procesie neozy. Klony komórek Raju natychmiast dzielą się mitotycznie, mogąc przekazywać aneuploidię i przejawiać przejściowe właściwości komórek macierzystych, które są odporne na dalszą terapię genotoksyczną. Inna z koncepcji zakłada z kolei, że komórki ulegające katastrofie mitotycznej charakteryzują się opornością na cytostatyki i zdolne są do powrotu do cyklu komórkowego. **Biorąc pod uwagę powyższe oraz fakt obserwowanego zachowania strukturalnego blaszki jądrowej, stan katastrofy mitotycznej może być odpowiedzialny za szybką progresję raka jelita grubego, stanowiąc „rezerwuar” opornych na cytostatyki komórek, które zdolne są do naprawy uszkodzonego DNA i powrotu do prawidłowego cyklu komórkowego.**

4.3.2. ZAANGAŻOWANIE F-AKTYNY W ORGANIZACJĘ POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

Zdolności komórek do wzajemnego przylegania do siebie oraz komunikacji z innymi komórkami lub środowiskiem zewnątrzkomórkowym są kluczowe dla prawidłowej morfogenezy i zapewnienia integralności tkankowej. Komórki mogą przylegać do siebie bezpośrednio za pośrednictwem połączeń międzykomórkowych lub do składników otaczającej je ECM poprzez adhezję komórka-ECM. Destabilizacja połączeń międzykomórkowych oraz zaburzenia ich funkcji odgrywają kluczową rolę w wielu stanach patologicznych, również o podłożu zapalnym, m.in. w chorobach sercowo-naczyniowych, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (COPD, ang. chronic obstructive pulmonary disease), czy w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition).

EMT jest procesem fizjologicznym, podczas którego komórki nabłonkowe nabywają właściwości komórek mezenchymalnych i charakteryzują się zwiększoną migracją oraz obniżonym kontaktem międzykomórkowym. Wprawdzie EMT, a także jego odwrotność – przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET, ang. mesenchymal-epithelial transition) są integralnymi i ściśle koordynowanymi procesami związanymi z formowaniem się wielu tkanek i narządów, to mogą być one również aktywowane w

odpowiedzi na nieprawidłowe bodźce i zmiany w mikrośrodowisku tkankowym, przyczyniając się do wystąpienia wielu stanów patologicznych. Liczne dane literaturowe wskazują na kluczową rolę aktywacji EMT podczas progresji guza i transformacji nowotworowej, co prowadzi do nabycia przez pierwotne komórki nowotworowe właściwości inwazyjnych i przerzutowych.

Celem **publikacji nr 4** pt. „The role of actin dynamics and actin-binding proteins expression in epithelial-to-mesenchymal transition and its association with cancer progression and evaluation of possible therapeutic targets” (Biomed Res Int. 2018, 2018: 4578373) włączonej do drugiego z obszarów badawczych osiągnięcia naukowego było **przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat procesu EMT w kontekście zaangażowania aktyny i ABPs w nabywaniu przez komórki nabłonkowe fenotypu metastatycznego oraz w ich ponownej epitelializacji**. W powyższej pracy poglądowej zwróciliśmy uwagę środowiska naukowego przede wszystkim na fakt, że kluczową rolę w zmianie fenotypu komórek towarzyszącej procesowi EMT odgrywa F-aktyna, a ściślej mówiąc zmiany jej organizacji prowadzące do ukierunkowanej migracji komórek. Podkreśliliśmy również, że inwazyjność komórek nowotworowych jest ściśle związana z dezorganizacją połączeń międzykomórkowych, w których tworzenie, dojrzewanie oraz utrzymanie zaangażowany jest cytoszkielet aktynowy. **Podsumowując, zaprezentowana powyżej publikacja poglądowa wskazuje, że regulacja ekspresji kluczowych komponentów EMT lub MET, w tym odpowiedzialnych za regulację organizacji F-aktyny oraz zaangażowanych w utrzymanie struktury połączeń międzykomórkowych, może być potencjalnym celem dla związków zapobiegających przerzutom nowotworu i powinno stanowić istotne uzupełnienie konwencjonalnej terapii guzów pierwotnych.**

Jak już zostało wspomniane, F-aktyna zaangażowana jest w wiele aspektów fizjologii komórek i stanowi istotny element strukturalny połączeń międzykomórkowych. Te z kolei, oprócz zapewnienia integralności tkankowej, spełnią również szereg innych funkcji. Jedną z nich jest zdolność do tworzenia nieprzepuszczalnej lub selektywnie przepuszczalnej bariery. Barierna funkcja nabłonków jest utrzymywana przede wszystkim poprzez dwa główne systemy połączeń międzykomórkowych: połączenia zwierające (AJs, ang. adherens junctions) i połączenia zamykające (TJs, ang. tight junctions). Nabłonek dróg oddechowych stanowi jeden z głównych elementów bariery krew-powietrze, a jego integralność i funkcja barierowa są ściśle regulowane w celu ochrony przed uszkodzeniem

śródmiaższu płuc. Ponieważ nieprawidłowa naprawa i utrata integralności nabłonka oddechowego pełnią kluczową rolę w patogenezie COPD, zasadne jest poszukiwanie nowych strategii leczenia w celu spowolnienia lub całkowitego zahamowania utraty funkcji płuc.

Celem **publikacji nr 5** pt. „Tropomyosin-1 protects transformed alveolar epithelial cells against cigaret smoke extract through the stabilization of F-actin-dependent cell-cell junctions” (Acta Histochem. 2016, 118: 225-35) włączonej do drugiego z obszarów badawczych osiągnięcia naukowego była **ocena wpływu stabilizacji F-aktyny poprzez tropomiozynę-1 (TPM1, ang. tropomyosin-1) w modelu komórkowym COPD**. Model *in vitro* COPD utworzono w oparciu o stransformowane komórki nabłonka oddechowego linii H1299 poddane działaniu stresu oksydacyjnego indukowanego ekstraktem dymu papierosowego (CSE, ang. cigaret smoke extract). CSE przygotowano z komercyjnie dostępnych papierosów marki Marlboro Gold i ustandaryzowano poprzez pomiar zawartości nikotyny przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Natomiast ekspresję TPM1 indukowano poprzez wprowadzenie do komórek plazmidowego wektora ekspresyjnego z wklonowaną sekwencją cDNA ludzkiej TPM1. Oceniono rodzaj indukowanej CSE śmierci komórek, również z uwzględnieniem zmian w ich wielkości i liczbie. Ponadto, określono rozmiar komórek adherentnych, a także lokalizację, organizację oraz poziom fluorescencji F-aktyny i białka Zonula Occludens (ZO)-1. Przeprowadzone badania wykazały, że nadekspresja TPM1 istotnie statystycznie wpłynęła na wzrost liczby komórek zarówno w kontroli, jak i poddanych działaniu CSE w odniesieniu do komórek H1299 stransfekowanych wektorem plazmidowym bez wklonowanej sekwencji cDNA TPM1. Ponadto, w komórkach ze wzbudzoną nadekspresją TPM1 nie obserwowaliśmy zmian w rozmiarze komórek poddanych działaniu CSE. Uzyskane rezultaty zostały potwierdzone analizą indukowanej CSE śmierci komórek. Dowiedliśmy, że nadekspresja TPM1 w sposób istotny statystycznie hamuje apoptozę i nekrozę komórek H1299 poddanych działaniu CSE. Efekt ten został powiązany z zależnym od TPM1 wzrostem ekspresji białka ZO-1 oraz organizacją F-aktyny promującą formowanie stabilnych i ciągłych połączeń międzykomórkowych. **Podsumowując, zaprezentowane powyżej badania wykazały, że stabilizacja F-aktyny poprzez nadekspresję TPM1 hamuje odpowiedź komórek H1299 na działanie CSE. Udowodniliśmy ponadto, że utrzymanie stabilności strukturalnej krótkich polimerów aktyny, zwłaszcza w korowej części cytoplazmy, nie tylko**

wzmaga interakcje międzykomórkowe oraz zabezpiecza je przed rozerwaniem, ale również chroni komórki przed wejściem na drogę śmierci indukowaną wysokim stresem oksydacyjnym. Co więcej, wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że odpowiedni stan organizacyjny korowej F-aktyny odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek nabłonkowych i powinien być rozważony przy projektowaniu strategii leczenia COPD.

Wyniki zaprezentowane w **publikacji nr 5** potwierdziły nasze wcześniejsze doniesienia o zaangażowaniu F-aktyny w regulację stabilności połączeń międzykomórkowych. W ramach realizacji grantu NCN pt. „Ocena wpływu nadekspresji tropomiozyny na stabilizację międzykomórkowych i adhezyjnych połączeń komórek ludzkiego śródbłonka naczyń w warunkach sprzyjających rozwojowi procesów miażdżycowych”, który stanowił również podstawowe źródło finansowania mojej rozprawy doktorskiej, wykazaliśmy, że **wzbudzenie nadekspresji TPM1 chroni modelowe komórki śródbłonka ludzkiego linii EA.hy926 przed działaniem stresu oksydacyjnego indukowanego CSE** (Acta Histochem. 2014, 116: 606-18) **albo L-homocysteiną** (Int J Mol Med. 2013, 32: 115-29). Ponadto, badania te wykazały, że **stabilizacja F-aktyny poprzez wzbudzenie nadekspresji TPM1 utrzymuje połączenia pomiędzy komórkami śródbłonka zarówno w warunkach depolimeryzacji** (Acta Histochem. 2014, 116: 606-18), **jak i nadmiernej polimeryzacji F-aktyny zlokalizowanej w warstwie korowej cytoplazmy** (Int J Mol Med. 2013, 32: 115-29). Biorąc pod uwagę powyższe, wykazaliśmy możliwość zależnej od F-aktyny regulacji organizacji i stabilności połączeń międzykomórkowych. **Stąd, w celu dalszej aplikacji uzyskanych wyników postanowiliśmy określić mechanizm uszkodzenia śródbłonka ludzkich tętnic wieńcowych w warunkach zapalnych.** Rozpoczęcie niezwykle ważnego z klinicznego punktu widzenia tematu oraz mojego dalszego rozwoju naukowego było możliwe dzięki pozyskaniu grantu NCN pt. „Wykorzystanie możliwości systemu CRISPR/dCas9 oraz peptydów penetrujących komórkę w celu zapobiegania restenozie i zakrzepicy tętnic wieńcowych - badania in vitro”, którego jestem kierownikiem.

Miażdżycza tętnic jest procesem patologicznym, który zachodzi w naczyniach tętniczych i obejmuje interakcje wielu typów komórek. Następstwem tych oddziaływań jest przewlekły proces zapalny, który wpływa na dalszą progresję choroby. Śródbłonek naczyń stanowi barierę dla niekontrolowanego wnikania składników krwi do ściany naczynia krwionośnego, odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu jego homeostazy

poprzez regulację struktury czy napięcia ściany w celu utrzymania płynności przepływu krwi. Za kluczowy element w patogenezie rozwoju zmian miażdżycowych przyjmuje się uszkodzenie funkcji śródbłonka, które pojawia się m.in. w następstwie zwiększonych sił ścinających w nadciśnieniu tętniczym, wolnych rodników, niedotlenienia lub w wyniku mechanicznych uszkodzeń. Dysfunkcja śródbłonka (ED, ang. endothelial dysfunction) w ujęciu medycznym definiowana jest jako zmiana właściwości komórek endotelialnych w kierunku fenotypu charakteryzującego się nieprawidłową wazodylatacją naczyń krwionośnych i statusem promującym stan zapalny lub zakrzepowy. ED została funkcjonalnie scharakteryzowana poprzez zaburzenie balansu pomiędzy obniżoną biodostępnością śródbłonkowych czynników rozluźniających napięcie ściany naczyń, np. tlenku azotu (NO, ang. nitric oxide), a towarzyszącym wzrostem czynników wazokonstrykcyjnych, np. endoteliny-1. Jednakże w ujęciu biologicznym proces ten zaczyna się dużo wcześniej i związany jest m.in. z aktywacją zapalną komórek śródbłonka oraz uszkodzeniem barierowej funkcji endotelium. Liczne badania wykazały, że zarówno aktywacja komórek śródbłonka, jak i ich dysfunkcja są wczesnymi zmianami towarzyszącymi inicjacji i rozwojowi miażdżycy, a możliwość regulacji obu tych procesów może stanowić obiecującą strategię leczenia chorób sercowo-naczyniowych.

Celem **publikacji nr 6** pt. „Letter by Gagat and Grzanka regarding article, "Neutrophil activation of endothelial cell-expressed TRPM2 mediates transendothelial neutrophil migration and vascular injury"” (Circ Res. 2017, 121: e86) włączonej do drugiego z obszarów badawczych osiągnięcia naukowego było **podkreślenie niezwykle ważnej roli F-aktyny w regulacji barierowej funkcji śródbłonka**. Wskazaliśmy kluczowe kwestie związane z uszkodzeniem śródbłonkowych połączeń międzykomórkowych w zakresie zmian dynamiki F-aktyny indukowanej jonami Ca^{2+} oraz stresem oksydacyjnym, jej udział w uszkodzeniu AJs oraz w zrywaniu TJs po utracie ciągłości AJs. Ponadto zwróciliśmy uwagę środowiska naukowego, że zespół Malik pokazał zależne od formowania się włókien stresowych F-aktyny „nieciągle” lub „punktowe” AJs, które charakteryzowały się wysoką ekspresją VE-kadheryny. Biorąc pod uwagę powyższe, sugeruje to raczej silną interakcję międzykomórkową, a wraz z charakterystycznym ułożeniem włókien stresowych F-aktyny utratę skoordynowanej migracji komórek śródbłonka, która jest niezbędna w celu utrzymania bariery endotelialnej. Na poparcie naszych spostrzeżeń, w powyższej publikacji przedstawiliśmy również niepublikowane dotąd wyniki badań własnych dotyczących

odpowiedzi zapalnej ludzkich pierwotnych komórek śródbłónka naczyń tętniczych. Wskazaliśmy, że rekombinowany ludzki (rh, ang. recombinant human) czynnik martwicy nowotworu typu α (TNF α), produkowany w komórkach HEK 293, indukuje formowanie się włókien stresowych F-aktyny. Powyższa zmiana organizacji F-aktyny wpływa z kolei na szereg właściwości komórek śródbłónka. Wśród nich wskazaliśmy przede wszystkim na zmianę kształtu komórek oraz „nieciągly” charakter wiązań międzykomórkowych o wysokiej zawartości białek charakterystycznych dla AJs, niższym poziomie białek TJs oraz wysokiej ekspresji niemięśniowej miozyny IIa. Co więcej, zmianom tym towarzyszyła zwiększona ekspresja taliny w obrębie ognisk przylegania zlokalizowanych wzdłuż cytoplazmatycznych włókien stresowych F-aktyny. Kolokalizacji F-aktyna/talina nie obserwowaliśmy natomiast w obrębie komponentów AJs oraz TJs. Zmianom w organizacji F-aktyny towarzyszyła również utrata koordynacji migracyjnej komórek, co pośrednio związane było z ograniczeniem możliwości formowania się ciągłego kontaktu międzykomórkowego w następstwie szybszego fałdowania się błon komórkowych. Badania przyżyciowe wykazały także, że punktowe interakcje pomiędzy komórkami stymulowanymi rh TNF α były na tyle silne, że migrujące komórki pozostawiały miejsce wiązania międzykomórkowego po pęknięciu włókna kurczliwego F-aktyny. **Na podstawie przedstawionych powyżej wyników można więc wnioskować, że uszkodzenie bariery endotelialnej przez biochemiczne rozkładanie kompleksów połączeniowych jest promowane i poprzedzone mechanicznym rozerwaniem AJs poprzez nadmierne formowanie się włókien stresowych F-aktyny wraz z towarzyszącym wzrostem adhezji komórka-ECM.**

Dodatkowo, wyniki dotąd niepublikowanych prac, a przedstawionych m.in. na International Cardiovascular Research Meeting w Bydgoszczy oraz na 23rd World Congress on Advances in Oncology and 21st International Symposium on Molecular Medicine w Atenach, z jednej strony potwierdzają, że aktywacja zapalna śródbłónka tętnic wieńcowych wiąże się z mechanicznym rozerwaniem wiązań międzykomórkowych. Z drugiej strony jednak wskazują, że stymulacja zapalna śródbłónka prowadzi do angiogenezy. Co więcej, **mechaniczne pozostawienie fragmentu komórek w miejscu występowania silnego punktowego kontaktu międzykomórkowego lub kontaktu komórka-ECM prowadzi do wzajemnej sygnalizacji komórkowej poprzez struktury przypominające migrasomy.** Badania przeprowadzone na ludzkich pierwotnych komórkach śródbłónka wyizolowanych z

tętnic wieńcowych wykazały również, że stabilizacja F-aktyny poprzez aktywację ekspresji TPM1 systemem CRISPR (zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne, ang. clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)/dCas9 znacznie ogranicza odpowiedź zapalną śródbłonna, hamując tym samym formowanie się struktur przypominających migrasomy oraz tubul na podłożu typu matrigel. Efekt widoczny był również w strukturze połączeń międzykomórkowych. Obserwowaliśmy zależne od ekspresji TPM1 zachowanie ciągłości połączeń typu komórka-komórka w komórkach poddanych działaniu rh TNF α . Przeciwnie, nokaut genu *TPM1* za pośrednictwem systemu CRISPR/Cas9 prowadził do aktywacji zapalnej komórek śródbłonna, przyspieszając tym samym indukowane przez rh TNF α formowanie się naczyń *in vitro* oraz promując nieciągły charakter połączeń międzykomórkowych w następstwie zmian w organizacji F-aktyny. Obserwacje te pokazują, że **stabilizacja F-aktyny poprzez TPM1 skutecznie ogranicza odpowiedź zapalną komórek ludzkiego śródbłonna tętnic wieńcowych i może stanowić atrakcyjny cel terapeutyczny w chorobach układu sercowo-naczyniowego o podłożu zapalnym**. Świadczy to również o możliwościach aplikacyjnych systemu CRISPR aktywującego ekspresję TPM1 np. w kardiologii inwazyjnej. Stąd dalsze nasze prace skierowane są w stronę opracowania skutecznej metody wprowadzania systemu CRISPR do komórek śródbłonna. Z tego punktu widzenia niezwykle ważne wydają się być peptydy penetrujące komórkę (CPPs, ang. cell-penetrating peptides).

Obecność barier komórkowych i tkankowych, wraz z ograniczoną zdolnością do przechodzenia różnych cząsteczek o charakterze terapeutycznym przez błony komórkowe, często utrudnia systemową i ukierunkowaną dystrybucję oraz biodostępność leków. Wprawdzie CPPs wykazują zróżnicowaną strukturę i właściwości fizyko-chemiczne, to wszystkie z nich charakteryzują się co najmniej dwiema podstawowymi cechami: są krótkimi peptydami, które liczą od 5-30 aminokwasów, oraz posiadają zdolność wnikania do wnętrza komórki bez zaangażowania specyficznych receptorów błonowych. Większość zidentyfikowanych do tej pory lub nowo zaprojektowanych CPPs nie posiada właściwości cytotoksycznych i immunogennych. Ponadto liczne badania podstawowe i przedkliniczne potwierdziły ich skuteczność w dostarczaniu do wnętrza komórek różnego rodzaju cząsteczek, które z jednej strony mogą stanowić potencjalne leki, a z drugiej wykazują ograniczoną przenikliwość przez błony komórkowe. Wśród nich

niezwykle istotne wydają się peptydy, białka, kwasy nukleinowe czy kompletne systemy edycji genomowej.

Celem **publikacji nr 7** pt. „Cell-penetrating peptides and their utility in genome function modifications (Review)” (Int J Mol Med. 2017, 40: 1615-1623) włączonej do drugiego z obszarów badawczych osiągnięcia naukowego było **przedstawienie aktualnego stanu wiedzy w zakresie CPPs ze szczególnym uwzględnieniem możliwości ich aplikacji klinicznej**. W powyższej pracy poglądowej, oprócz klasyfikacji, mechanizmów wnikania do komórek, toksyczności oraz metod tworzenia kompleksów CPP-koniugat, pokazaliśmy wyniki badań własnych prezentujące zdolność do wprowadzania plazmidów ekspresyjnych w kompleksach elektrostatycznych z cząsteczkami peptydu HIV TAT (47-57) do ludzkich pierwotnych komórek śródbłonna naczyń tętnicznych. Podkreśliliśmy również przydatność CPPs w transporcie przez błonę komórkową systemów edycji genomu, tj. nukleaz z motywem palca cynkowego (ZFNs, ang. zinc-finger nucleases), nukleaz efektorowych podobnych do aktywatora transkrypcji (TALENs, ang. transcription activator-like effector nucleases), czy systemów CRISPR. **Podsumowując, zaprezentowana powyżej publikacja poglądowa wskazuje, że w wyniku braku idealnych narzędzi do wprowadzania różnych biologicznie aktywnych molekuł do wnętrza komórek, niewirusowe systemy z zastosowaniem CPPs są bezpieczne i stanowią obiecującą alternatywę dla obecnie stosowanych metod.**

W związku z obiecującymi wynikami badań podstawowych, zwłaszcza w zakresie poznania mechanizmu indukowanej przez TNF α utraty barierowej funkcji endotelium oraz możliwości regulacji odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna naczyń tętnicznych poprzez system CRISPR aktywujący ekspresję TPM1, **zasadne było opracowanie koncepcji nowego stentu wewnątrznacyniowego o właściwościach przyspieszających gojenie się miejsca implantacji oraz ograniczających wystąpienie zakrzepicy**, która została przedstawiona jako **publikacja nr 8** i włączona do drugiego z obszarów badawczych osiągnięcia naukowego. Wynalazek został zgłoszony do ochrony w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej, który udzielił patentu na „Stent wewnątrznacyniowy, zwłaszcza naczyń wieńcowych” (numer prawa wyłącznego: PAT.230281) w mniej niż rok od daty zgłoszenia i stanowił podstawę do międzynarodowego zgłoszenia patentowego w procedurze PCT (numer zgłoszenia: PCT/PL2018/050035). Celem opracowania nowej konstrukcji stentu według wynalazku było **zwiększenie**

skuteczności zabiegów poszerzenia naczyń krwionośnych, zwłaszcza tętnic wieńcowych, metodą angioplastyki balonowej z implantacją stentu, a tym samym znaczne ograniczenie odległych w czasie powikłań pozabiegowych. Oprócz cech pożądaných dla stentów wewnątrznacyniowych, a więc dużej wytrzymałości na siły zewnętrzne przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniej giętkości w celu przeprowadzenia stentu przez zakręty oraz zwężenia naczyń, odpowiednim dopasowaniu do ściany naczynia na całej długości oraz optymalnej powierzchni wycięć dla procesu reendotelializacji miejsca poszerzonego naczynia, konstrukcja nowego stentu posiada unikalne płytkowate elementy mające za zadanie przede wszystkim zwiększyć powierzchnię działania wewnętrznych powłok funkcyjnych, ale również pełnić dodatkową funkcję w postaci bariery oddzielającej zewnętrzne pokrycie stentu od powierzchni wewnętrznej ściany naczynia krwionośnego. Ponadto konstrukcja stentu jest uniwersalna w zakresie wyboru materiału do jego wykonania i umożliwia bezpośrednio umieszczenie w płytkowatych elementach znaczników o ograniczonej przezierności dla promieni RTG. Ma to za zadanie poprawiać jakość procedury implantacji i monitoring ułożenia stentu względem ściany naczynia oraz jego odpowiedniego wpasowania w miejsce zwężenia. Jednakże główną przewagą technologiczną zaproponowanego przez nas rozwiązania jest jego ukierunkowane działanie na poszczególne warstwy komórkowe ściany naczynia. Wypukła struktura powłoki zewnętrznej nowego stentu według wynalazku wbijając się w ścianę naczynia krwionośnego podczas implantacji zapewnia jej pożądaną penetrację do stopniowego i precyzyjnego uwalniania leków hamujących proliferację komórkową. Natomiast wewnętrzna powłoka obejmuje przeciwciała monoklonalne przeciwko VE-kadherynie i stopniowo uwalniany system komórkowego wzbudzania ekspresji TPM1 oparty o kompleksy CPPs z technologią CRISPR albo ustabilizowanymi cząsteczkami mRNA albo plazmidowymi wektorami ekspresyjnymi. Zasadniczą zaletą takiego rozwiązania jest jednoczesna zdolność do interakcji powłoki z późnymi śródbłonkowymi komórkami progenitorowymi z krwiobiegu oraz ukierunkowanie komórek śródbłonka do endotelializacji wewnętrznej powierzchni konstrukcji stentu, a także miejsca jego implantacji. **Podsumowując, obecne na rynku rozwiązania nie działają w sposób kompleksowy i ukierunkowany. Stąd istnieje ogromne zapotrzebowanie na stworzenie efektywnego, wybiegającego w przyszłość, rozwiązania, które ograniczy możliwość wystąpienia restenozy i zakrzepicy, a także przyspieszy ponowną**

endotelializację miejsca implantacji stentu oraz jego wewnętrznej powierzchni. Proponowane przez nas rozwiązanie ma za zadanie w sposób ukierunkowany działać na poszczególne warstwy ściany naczynia krwionośnego, prowadząc do zahamowania migracji komórek mięśni gładkich, ograniczenia formowania się neointymy oraz przyspieszenia procesów gojenia się śródbłonna. Opracowana przez nas technologia obejmuje zarówno specyficzną konstrukcję, jak i unikalne powłoki funkcyjne, które z jednej strony precyzyjnie hamują proliferację i migrację komórek budujących ścianę naczynia, a z drugiej przyspieszają gojenie się miejsca implantacji stentu poprzez odtworzenie bariery endotelialnej.

4.3.3. POSZUKIWANIE NIEKANONICZNYCH FUNKCJI BIAŁEK CYKLU KOMÓRKOWEGO

Zaangażowanie cyklin, jak również ich katalitycznych partnerów, kinaz zależnych od cyklin (CDKs, ang. cyclin-dependent kinases), w przejściu cyklu komórkowego jest dobrze udokumentowane. Liczne badania nad czterema głównymi klasami cyklin, A, B, D i E, pozwoliły na opracowanie klasycznego modelu cyklu komórkowego, który stanowi o tym, że specyficzne heterodimerskie kompleksy cyklina/CDK fosforylują szereg białek, promując tym samym wejście komórek w fazę G1 cyklu komórkowego, syntezę DNA podczas fazy S oraz segregację nowo zduplikowanych chromosomów do komórek potomnych podczas fazy M cyklu komórkowego. Co więcej, model ten zakłada, że cykliny oraz ich zmienna ekspresja podczas cyklu komórkowego zapewniają uporządkowaną progresję komórek przez cykl. Jednakże wzrasta również liczba prac pokazujących bezpośrednie zaangażowanie cyklin oraz CDKs w inne ważne procesy komórkowe, tj. transkrypcja, naprawa DNA, kontrola śmierci komórkowej, różnicowanie, odpowiedź immunologiczna czy nawet regulacja dynamiki F-aktyny. Niektóre z powyższych niekanonicznych funkcji cyklin oraz CDKs są niezależne od ich partnerów w cyklu komórkowym. Badania naszego zespołu wykazały m.in. odmienną regulację ekspresji cykliny B1 w śmierci i starzeniu się komórek gruczolaka płuc linii A549 indukowanych doksorubicyną (Folia Histochem Cytobiol. 2012, 50: 58-67), degradację cytoplazmatycznej puli cykliny D1 w indukowanej trójtlenkiem arsenu śmierci komórek Jurkat (Acta Histochem. 2014, 116: 1350-8) oraz udział funkcjonalnej cykliny D1 w indukowanej sulforafanem nekrozie komórek gruczolaka płuc linii A549 (Int J Oncol. 2016, 48: 2521-33).

Stosunkowo niedawno, bo w 1994 roku, dwa niezależne zespoły, Elledge oraz Frischauf, zidentyfikowały nową ssaczą cyklinę, która zgodnie z alfabetyczną nomenklaturą została nazwana cykliną F (CCNF, ang. cyclin F). Na przełomie ostatniej dekady pokazano, że CCNF posiada kilka znanych substratów, które powiązane są m.in. z organizacją mikrotubul, a także metabolizmem i naprawą DNA. Wykazano również, że cyklina ta zawiera trzy moduły: „pseudokatalityczny”, rekrutujący substrat oraz regulatorowy. Moduł „pseudokatalityczny” obejmuje domenę F-box, która nie posiada wprawdzie wewnętrznej aktywności katalitycznej, to pośredniczy w interakcji z innymi składnikami kompleksu SCF (SKP1-kullina-F-box) biorącego udział w ubikwitynacji różnych celów molekularnych. Moduł rekrutujący substrat zawiera domenę cyklinową, która wiąże się do motywu CY (RxL) substratu w sposób analogiczny, jak inne cykliny do CDKs. Wprawdzie domena cyklinowa CCNF wykazuje homologię do tej obserwowanej w obrębie innych cyklin, to CCNF używa jednak domeny F-box do promowania ubikwitynacji substratów, zamiast znanego z innych cyklin mechanizmu fosforylacji poprzez podjednostkę katalityczną CDK. Moduł regulatorowy kontroluje przede wszystkim jądrową lokalizację CCNF w fazie S i G2, w obrębie centrosomów w fazie G2, a także jej ilość podczas całego cyklu komórkowego oraz stresu genotoksycznego. Moduł ten obejmuje przede wszystkim dwie sekwencje: lokalizacji jądrowej (NLS, ang. nuclear localization sequence) i PEST, która odpowiedzialna jest m.in. za sygnalizację do proteolizy w fazie G1 cyklu komórkowego oraz po uszkodzeniu DNA.

Niezwykle interesującym celem kompleksu SCF^{CCNF} , z punktu widzenia prognostyki oraz leczenia wielu typów nowotworów, jest reduktaza rybonukleotydowa M2 (RRM2, ang. ribonucleotide reductase M2). RRM2 katalizuje konwersję rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów (dNTPs, ang. deoxynucleotides), które są niezbędne do replikacji i naprawy DNA. Wykazano, że zależna od CCNF degradacja RRM2 utrzymuje właściwy balans dNTPs, który zapobiega nieprawidłowemu włączaniu rybonukleotydów w procesie naprawy DNA indukowanej stresem genotoksycznym.

Nadekspresję RRM2 powiązano z gorszym rokowaniem pacjentów z rakiem jajnika, jelita grubego, wątroby czy sutka. Poza tym, wykazano, że obniżenie ekspresji RRM2 hamuje proliferację komórek czerniaka. W świetle powyższego, oś CCNF-RRM2 może mieć istotne znaczenie w prognozowaniu, odpowiedzi na czynniki genotoksyczne oraz przy projektowaniu nowych strategii leczenia pacjentów z

czerniakiem skóry. Rozpoczęcie nowego, niezwykle istotnego pod względem klinicznym, obszaru badań było możliwe dzięki mojemu zaangażowaniu w realizację grantu NCN pt. „Znaczenie osi cyklina F-RRM2 w lekooporności komórek czerniaka o zróżnicowanym stopniu agresywności - badania *in vitro*”.

Celem **publikacji nr 9** pt. „Potential role of cyclin F mRNA expression in the survival of skin melanoma patients: Comprehensive analysis of the pathways altered due to cyclin F upregulation” (Oncol Rep. 2018, 40: 123-144) włączonej do trzeciego obszaru osiągnięcia naukowego była **ocena mechanizmu działania osi CCNF-RRM2 u pacjentów z czerniakiem skóry**. W analizie *in silico* niezależnych i ogólnodostępnych danych uzyskanych w ramach projektu TCGA oceniono wpływ poziomu ekspresji mRNA CCNF oraz RRM2 na całkowite przeżycie (OS, ang. overall survival) oraz przeżycie wolne od objawów choroby (DFS, ang. disease-free survival). Ponadto określono wpływ podwyższonej i obniżonej ekspresji CCNF i RRM2 na poziomie transkryptu na ekspresję 208 białek oraz ich ufosforylowanych form, które zaangażowane są w kluczowe szlaki sygnalizacyjne komórek. Korelacja pomiędzy poziomami mRNA CCNF albo RMM2 a ekspresją powyższych białek została następnie wykorzystana do analizy ich wzajemnych relacji, zaangażowania w procesy biologiczne oraz funkcjonalne szlaki molekularne. Na podstawie uzyskanych wyników wykazaliśmy, że podwyższona ekspresja CCNF na poziomie transkryptu jest powiązana z gorszym rokowaniem u pacjentów z czerniakiem skóry. Co więcej, wykazaliśmy istotne statystycznie różnice w przeżyciu pacjentów z obniżoną albo podwyższoną ekspresją mRNA CCNF. Podobnie, istotne statystycznie różnice zaobserwowaliśmy pomiędzy pacjentami z podwyższoną i obniżoną ekspresją mRNA RRM2. Nie wykazaliśmy natomiast istotności statystycznych w DFS. Ponadto wykazaliśmy, że białka, których ekspresja negatywnie koreluje z poziomem CCNF na poziomie transkryptu zaangażowane są przede wszystkim w regulację takich procesów jak: apoptoza, wewnątrzkomórkowa sygnalizacja, metabolizm oraz fosforylacja białek, komunikacja komórkowa, proliferacja czy adhezja komórkowa. Natomiast białka pozytywnie korelujące z ekspresją mRNA CCNF związane są z regulacją cyklu komórkowego, naprawą DNA czy regulacją ekspresji genów. Podobne zaangażowanie w procesy biologiczne zidentyfikowano dla ekspresji białek korelujących z poziomem ekspresji mRNA RRM2. W przypadku białek negatywnie korelujących z ekspresją RRM2 na poziomie transkryptu wykazaliśmy ich zaangażowanie w regulację m.in. proliferacji komórkowej, apoptozy, przekazywania

sygnałów, fosforylacji białek czy klasycznej sygnalizacji Wnt. Podczas gdy białka pozytywnie korelujące z ekspresją mRNA RRM2 zaangażowane są w regulację cyklu komórkowego, wzrostu i proliferację komórek, czy też przekazywanie sygnałów w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. **Podsumowując, zaprezentowane powyżej wyniki analiz *in silico* były pierwszą w literaturze światowej próbą wyjaśnienia zaangażowania CCNF oraz osi CCNF-RRM2 w status kliniczny pacjentów z czerniakiem skóry. Wykazaliśmy, że podwyższona ekspresja mRNA CCNF związana jest z aktywacją szlaków molekularnych odpowiedzialnych za proliferację, potencjał przerzutowy i przeżycie komórek czerniaka.** Wprawdzie praca posiada wiele ograniczeń, które związane są m.in. z dostępnością danych ekspresyjnych i klinicznych oraz z faktem zestawienia poziomów ekspresji CCNF albo RRM2 na poziomie transkryptu z ekspresją białek zaangażowanych w kluczowe procesy biologiczne, to stanowi ona niezwykle istotne podłoże dla dalszych prac w zakresie wyjaśnienia wzajemnej relacji pomiędzy CCNF i RRM2. Pokazaliśmy, że zarówno CCNF, jak i RRM2 oraz ich wzajemne relacje, stanowią atrakcyjny kierunek badań w dziedzinie dermatologii onkologicznej i ze względu na funkcje obu białek precyzyjne wyjaśnienie mechanizmu działania osi CCNF-RRM2 może przynieść szereg danych prowadzących do lepszej diagnozy, rokowania i wyboru optymalnej terapii pacjentów z czerniakiem skóry.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłem współautorem **30** publikacji naukowych o sumarycznym IF = **24.843** i **351** punktach wg MNiSW, **1** obrazu okładki czasopisma naukowego oraz **59** doniesień zjazdowych.

Swoją pracę naukową rozpocząłem od 2008 roku będąc jeszcze studentem Uzupełniających Studiów Magisterskich. Efektem działalności w Studenckim Kole Naukowym Biologii Komórki i Ultrastruktury oraz realizacji pracy magisterskiej było opublikowanie 2 prac naukowych (Postepy Hig Med Dosw. 2009, 63: 1-7; Med Biol Sci. 2010; 24/1: 25-32).

Pod koniec 2008 roku, będąc nadal studentem ostatniego roku Uzupełniających Studiów Magisterskich, zostałem zatrudniony na stanowisku Starszego technika w

Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Aliny Grzanki oraz we współpracy z dr hab. Dariuszem Grzanką nabyłem umiejętności technicznych z zakresu badań nad szkieletem komórkowym, doświadczenia w analizie i interpretacji obrazów mikroskopowych, również na poziomie ultrastruktury, a także kwalifikacji w zakresie pozyskiwania i realizacji projektów badawczych sfinansowanych ze źródeł zewnętrznych. W związku z dużym zaangażowaniem w badania naukowe, a także predyspozycjami do prowadzenia zajęć dydaktycznych od 2 października 2010 roku zostałem zatrudniony na stanowisku Asystenta w powyższej jednostce. Był to niezwykle istotny ze względu na mój dalszy rozwój naukowy etap kariery i dotyczył prac związanych z udziałem cytoszkieletu w fizjologicznych i patologicznych procesach komórkowych oraz wpływem związków cytotoksycznych, pochodzenia naturalnego i czynników fizycznych na zmiany jego organizacji. Efektem mojego zaangażowania w wymienione obszary badawcze było powstanie 10 publikacji naukowych (Folia Histochem Cytobiol. 2010, 48:377-86; Med Biol Sci. 2011, 25/1: 17-23; Oncol Rep. 2012, 28: 2138-48; Acta Histochem. 2013, 115: 487-95; Acta Histochem. 2013, 115: 775-82; Med Biol Sci. 2013, 27/2: 19-25; Med Biol Sci. 2014, 28/2: 11-17; Med Biol Sci. 2014, 28/2: 25-32; Cent Eur J Biol. 2014, 9: 727-738; Postepy Hig Med Dosw. 2014, 68: 1492-500) oraz rozdziału w książce pt. "Nauka i praktyka: doświadczenia pracowników naukowych z realizacji staży w przedsiębiorstwach w ramach projektu Program Transferu Wiedzy NiP - Nauka i Praktyka".

Równie ważnym aspektem badawczym podjętym w tym okresie były prace związane z wpływem ekspresji białka SATB1 oraz eksportyny-6 na indukcję procesów śmierci komórkowej (Pol J Pathol. 2012; 63: 101-5; Folia Histochem Cytobiol. 2014; 52: 195-205; Int J Mol Med. 2014; 33: 1441-50), a także z udziałem cykliny B1 oraz cykliny D1 w indukowanej śmierci komórek gruczołakoraka płuc linii A549 i białaczki T-komórkowej linii Jurkat (Folia Histochem Cytobiol. 2012; 50: 58-67; Acta Histochem. 2014, 116: 1350-8).

Równocześnie zacząłem interesować się zaangażowaniem F-aktyny w organizację połączeń międzykomórkowych oraz możliwością zależnej od F-aktyny regulacji adhezji międzykomórkowej. Zagadnienia te stanowiły w głównej mierze podstawę mojej rozprawy doktorskiej pt. „Udział filamentów aktynowych w adhezji międzykomórkowej ludzkiego śródbłona naczyń w warunkach sprzyjających

rozwojowi procesów miażdżycowych” i zostały opublikowane w formie 3 publikacji naukowych (Folia Histochem Cytobiol. 2013, 51: 179-92; Int J Mol Med. 2013, 32: 115-29; Acta Histochem. 2014, 116: 606-18). Poza tym, opublikowane wyniki badań zostały uhonorowane w postaci obrazu na okładce czasopisma Acta Histochemica na rok 2014. Rozprawę doktorską obroniłem z wyróżnieniem, a stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskałem uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 25 marca 2015 roku.

Udział w pozostałych pracach badawczych związany był ze współpracą z innymi ośrodkami naukowymi, a moja rola opierała się przede wszystkim na zdobytym wcześniej doświadczeniu w zakresie technik mikroskopowych oraz analizy i interpretacji obrazu mikroskopowego. Tematyka prac kooperacyjnych związana była z inżynierią tkankową i medycyną regeneracyjną (Cent European J Urol. 2012, 65: 7-10; Curr Signal Transduct Ther. 2012, 7: 220-227; Int J Urol. 2013, 20: 537-42; Aesthet Surg J. 2014, 34: 1261-9; Hum Cell. 2014, 27: 85-93 oraz 2 rozdziały w opracowaniach zbiorowych: „Lecture Notes of the ICB Seminar. Micro- and nanosystems in biochemical diagnosis. Principles and applications.” i „Nowoczesne metody analizy surowców rolniczych”) we współpracy z interdyscyplinarnym zespołem prof. dr hab. n. med. Tomasza Drewy oraz przemysłem drzewno-papierniczym (Ann WULS - Forestry and Wood Technol. 2012, 78: 130-133; Ann WULS - Forestry and Wood Technol. 2014, 85: 118-122).

5.2. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłem współautorem **24** publikacji naukowych o sumarycznym IF = **59.081** i **480** punktach wg MNiSW, 1 polskiego patentu na wynalazek (**30** punktów wg MNiSW), 1 międzynarodowego zgłoszenia patentowego oraz **39** doniesień zjazdowych. Poza osiągnięciem naukowym byłem współautorem **16** publikacji naukowych o sumarycznym IF = **28.714** i **295** punktach wg MNiSW.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, posiadany dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny umożliwił mi od 1 lipca 2015 roku objęcie stanowiska Adiunkta w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja

Kopernika w Toruniu i dalszy rozwój naukowy, który był zarazem kontynuacją i poszerzeniem zakresu badań podjętych w okresie poprzedzającym uzyskanie stopnia doktora.

Poza aktywnością ujętą w osiągnięciu naukowym, kontynuowałem swoje zaangażowanie w prace związane z udziałem cytoszkieletu oraz białek regulujących jego organizację w procesach fizjologicznych i patologicznych komórek indukowanych m.in. związkami pochodzenia naturalnego, metabolitem nikotyny oraz czynnikami fizycznymi (Int J Physiother. 2015, 2: 939-46; Postepy Hig Med Dosw. 2015, 69: 1478-84; Tissue Cell. 2015, 47: 105-14; Acta Histochem. 2017, 119: 99-112; Adv Clin Exp Med. 2018, 27: 367-378). Zaangażowałem się również w pracę pokazującą synergistyczne działanie fizetyny i paklitakselu w indukcji autofagii oraz stanu katastrofy mitotycznej w komórkach gruczolakoraka płuc linii A549.

Kontynuowałem również niezwykle istotny dla mnie obszar badawczy związany z transportem aktyny pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym, wykazując protekcyjne działanie importyny-9 przed apoptozą komórek raka sutka linii MCF-7 indukowaną kombinacją alliny z paklitakselem (Oncol Rep. 2016, 35: 3084-93).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych zaangażowałem się także w prace dotyczące udziału cykliny D1 w indukowanej sulforafanem śmierci komórek (Int J Oncol. 2016, 48: 2521-33) oraz badania pokazujące możliwości aplikacyjnego wykorzystania ekspresji białka SATB1 w prognozowaniu pacjentów z chłoniakami skóry z komórek T (Oncol Rep. 2015, 33: 250-66).

Udział w pozostałych pracach badawczych w tym okresie kariery zawodowej związany był ze współpracą z innymi ośrodkami naukowymi, a moja rola opierała się głównie na wykorzystaniu doświadczenia w zakresie technik mikroskopowych oraz analizy i interpretacji obrazu mikroskopowego, również na poziomie ultrastrukturalnym. Prace kooperacyjne dotyczyły inżynierii tkankowej oraz medycyny regeneracyjnej (Ann Transplant. 2015, 20: 132-40; Arch Immunol Ther Exp. 2015, 63: 377-84; Biol Proced Online. 2016, 18: 17; Biomed Res Int. 2016, 2016: 2505601; Cell Transplant. 2017, 26: 1780-1791) we współpracy z interdyscyplinarnym zespołem prof. dr hab. n. med. Tomasza Drewy i dr hab. n. med. Marty Pokrywczyńskiej, okulistyki (Exp Ther Med. 2017; 13: 1057-1063) we współpracy z zespołem prof. dr hab. n. med. Grażyny Malukiewicz oraz ortopedii (Folia Morphol. 2017; 77: 371-377) w ramach współpracy z interdyscyplinarnym zespołem dr hab. n. med. Dariusza Grzanki.

W najbliższym czasie zamierzam skupić swoją uwagę głównie na aspektach aplikacyjnych prowadzonych przeze mnie badań podstawowych i zaangażować się w realizację interdyscyplinarnych projektów translacyjnych zgodnych ze ścieżką „od stołu laboratoryjnego do łóżka chorego” (ang. from bench to bedside).

6. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

	Ilość	IF	MNiSW
Publikacje naukowe przed osiągnięciem stopnia doktora	30	24.843	351
Publikacje naukowe i patenty po osiągnięciu stopnia doktora	25	59.081	510
Σ	55	83.924	861

	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Liczba cytowań*	218	214	304
Indeks H*	8	8	10
Indeks i10*	6	6	10

* na dzień 24.10.2018 r.