

AUTOREFERAT

dr n. med. Dariusz Grzanka

**Katedra Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową
i Immunodermatologii**

Wydział Lekarski

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Dane kontaktowe:

dr n. med. Dariusz Grzanka
Katedra Dermatologii, Chorób Przenoszonych
Drogą Płciową i Immunodermatologii
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. M. Curie Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz
tel.: (52) 585-38-67
fax: (52) 585-38-67
tel. kom.: 606-83-30-21
e-mail: d_gr@me.com

Bydgoszcz, 2015

SPIS TREŚCI

1.	IMIĘ I NAZWISKO.....	3
2.	WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW, STOPNI NAUKOWYCH/ ARTYSTYCZNYCH – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	3
3.	INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH...	3
4.	WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ.595 ZE ZM.)	4
4.1.	TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.2.	WYKAZ PUBLIKACJ WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3.	OPIS MERYTORYCZNY OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO DO OCENY	5
4.3.1.	ISTNIEJĄCY STAN WIEDZY W ZAKRESIE TEMATU BADAŃ.....	5
4.3.2.	PUBLIKACJA NR. 1: DOXORUBICIN-INDUCED F-ACTIN REORGANIZATION IN COFILIN-1 (NONMUSCLE) DOWN-REGULATED CHO AA8 CELLS. GRZANKA D., MARSZAŁEK A., GAGAT M., IZDEBSKA M., LIDIA GACKOWSKA, ALINA GRZANKA. FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2010; 48, 377-386.....	9
4.3.3.	PUBLIKACJA NR. 2: ACTIN IS REQUIRED FOR CELLULAR DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115, 775-782.	10
4.3.4.	PUBLIKACJA NR. 3: EXPRESSION OF SPECIAL AT-RICH SEQUENCE-BINDING PROTEIN 1 (SATB1) IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMAS. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M., MARSZAŁEK A.: ONCOL. REP. 2015; 33, 250-266.....	11
4.3.5.	PUBLIKACJA NR. 4: INVOLVEMENT OF THE SATB1/F-ACTIN COMPLEX IN CHROMATIN REORGANIZATION DURING ACTIVE CELL DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: INT. J. MOL. MED. 2014; 33, 1441-1450.	13
4.3.6.	PUBLIKACJA NR. 5: THE ALTERATIONS IN SATB1 AND NUCLEAR F-ACTIN EXPRESSION AFFECT APOPTOTIC RESPONSE OF THE MCF-7 CELLS TO GELDANAMYCIN. GRZANKA D., IZDEBSKA M., KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA A., GAGAT M.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2015, 53, 78-87.....	15
4.3.7.	PUBLIKACJA NR. 6: THE INTERACTIONS BETWEEN SATB1 AND F-ACTIN ARE IMPORTANT FOR MECHANISMS OF ACTIVE CELL DEATH. GRZANKA D., KOWALCZYK A.E., IZDEBSKA M., KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA A., GAGAT M.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2015; 53, 152-161.....	16
4.3.8.	PODSUMOWANIE	17
5.	OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	19
5.1.	OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA	19
5.2.	OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	20
6.	PLANY BADAWCZE NA PRZYSZŁOŚĆ	22
7.	PIŚMIENNICTWO	23
8.	PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO.....	26

1. IMIĘ I NAZWISKO

Dariusz Grzanka

2. WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW, STOPNI NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

27.04.2010	dypłom specjalisty w zakresie patomorfologii, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi
9.11.2005	stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu tytuł rozprawy doktorskiej: „ <i>Reorganizacja aktywności w fibroblastach chomika linii CHO AA8 po indukcji apoptozy doksorubicyną i wybranymi czynnikami fizycznymi</i> ” promotor: prof. dr hab. Jan Domaniewski
11.07.2001	dypłom lekarza, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

2013 – obecnie	p.o. kierownika Pracowni Biologii Molekularnej Skóry, Immunodermatologii i Dermatopatologii; Katedra Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; adiunkt
2010 – 2013	Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; adiunkt
2002 – 2010	Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; asystent

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ.595 ZE ZM.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

„Strukturalno-funkcjonalne powiązanie jądrowej aktyny i białka SATB1 w procesie indukowanej śmierci komórek” na podstawie cyklu 6 wybranych publikacji (IF = 9.779; MNiSW = 98)

4.2. WYKAZ PUBLIKACJ WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. **Grzanka D., Marszałek A., Gagat M., Izdebska M., Gackowska L., Grzanka A.: Doxorubicin-induced F-actin reorganization in cofilin-1 (nonmuscle) down-regulated CHO AA8 cells. Folia Histochem. Cytobiol. 2010; 48, 377-386. IF = 0.902; MNiSW = 13.000**
2. **Grzanka D., Gagat M., Izdebska M.: Actin is required for cellular death. Acta Histochem. 2013; 115, 775-782. IF = 1.760; MNiSW = 15.000**
3. **Grzanka D., Gagat M., Izdebska M., Marszałek A.: Expression of special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1) is an independent prognostic factor in cutaneous T-cell lymphomas. Oncol. Rep. 2015; 33, 250-266. IF = 2.301; MNiSW = 20.000**
4. **Grzanka D., Gagat M., Izdebska M.: Involvement of the SATB1/F-actin complex in chromatin reorganization during active cell death. Int. J. Mol. Med. 2014; 33, 1441-1450. IF = 2.088; MNiSW = 20.000**
5. **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 = 1.364; MNiSW = 15.000**
6. **Grzanka D., Kowalczyk A.E., Izdebska M., Klimaszewska-Wiśniewska A., Gagat M.: The interactions between SATB1 and F-actin are important for mechanisms of active cell death. Folia Histochem. Cytobiol. 2015; 53, 152-161. IF = 1.364; MNiSW = 15.000**

4.3. OPIS MERYTORYCZNY OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO DO OCENY

4.3.1. ISTNIEJĄCY STAN WIEDZY W ZAKRESIE TEMATU BADAŃ

Śmierć komórki jest jednym z fundamentalnych procesów biologicznych pełniących kluczową rolę zarówno w stanie zdrowia, jak i choroby (Lockshin i Zakeri, 2007). Nie powinno więc dziwić, że od wielu lat jest ona wiodącym tematem zajmującym naukowców na całym świecie. Obecnie stosunkowo dobrze scharakteryzowana wydaje się fizjologiczna rola śmierci komórki, zarówno w prawidłowym rozwoju tkanek, jak i utrzymaniu homeostazy organizmu, jednak to zaburzenia tego procesu, będące przyczyną chorób nowotworowych, autoimmunologicznych czy neurodegeneracyjnych, budzą największe zainteresowanie. W świetle znaczącego postępu jaki dokonał się w naszym rozumieniu mechanizmów przebiegu oraz regulacji śmierci komórki, jej zaburzenia stały się podstawą dla manipulacji tym procesem, w kontekście rozwoju metod terapeutycznych. Stało się również jasne, że ze względu na mnogość form śmierci oraz funkcji jakie mogą one pełnić w komórce, w zależności m.in. od ich tła genetycznego czy rodzaju, czasu działania i nasilenia czynnika indukującego, istnieje konieczność usystematyzowania nazewnictwa, już nie tylko w oparciu o morfologiczne, ale przede wszystkim mierzalne, biochemiczne i molekularne wyznaczniki. W związku z tym najnowsze wytyczne Komitetu ds. Nazewnictwa Śmierci Komórek odnoszą się do funkcjonalnej klasyfikacji śmierci, która obejmuje zewnątrzpochodną apoptozę, wewnątrzpochodną apoptozę zależną lub niezależną od kaspaz, regulowaną nekrozę, autofagię oraz katastrofę mitotyczną (Galluzzi i wsp., 2012). Dane z piśmiennictwa wskazują ponadto, że w odniesieniu do terapii nowotworowej, do mechanizmów śmierci można zaliczyć również starzenie (Chang i wsp., 1999; Eom i wsp., 2005; Litwiniec i Grzanka, 2009). Równocześnie podkreśla się, że interwencje genetyczne pozwalające na utratę lub nabycie funkcji genu oraz farmakologiczne inhibitory czy aktywatory istotnych składników maszynerii śmierci, powinny stanowić podstawowe narzędzia przy określeniu funkcjonalnego statusu śmierci, jak również przy próbie identyfikacji jej nowych „graczy” (Kroamer i wsp., 2009; Galluzzi i wsp., 2015). Dysponując usystematyzowanym nazewnictwem oraz szeregiem morfologicznych, biochemicznych i molekularnych biomarkerów, a także specyficznych metod ich detekcji i modulowania, ostatnie lata badań nad śmiercią zmierzają w kierunku dalszego poznawania białek i komórkowych struktur

zaangażowanych w jej realizację oraz regulację i będących potencjalnym celem w terapii, w tym przeciwnowotworowej. Jedną z takich białkowych struktur wydaje się być cytoszkielet aktynowy (Giganti i Friederich, 2003).

Aktyna jako jedno z podstawowych białek cytoszkieletu występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych w dwóch formach: globularnej (G-aktyna) oraz fibrylarnej (F-aktyna) (Hightower i Meagher, 1986). Obie te postacie warunkują dynamiczną naturę cytoszkieletu aktynowego, która jest kluczowa dla takich procesów jak: przekazywanie sygnałów w obrębie komórki, ruch i przyleganie do podłoża, endocytoza, śmierć komórki i transformacja nowotworowa (Rao i Li, 2004; Carlier i Pantaloni, 2007). W odniesieniu do jej cytoplazmatycznej puli większość z tych funkcji aktyny została już stosunkowo dobrze poznana. Z kolei występowanie i rola aktyny jądrowej są zdecydowanie gorzej scharakteryzowane, choć doniesienia o jej istnieniu, początkowo kwestionowane, pojawiły się już około 40 lat temu (Clark i Merriam, 1977). Interakcje pomiędzy cytoplazmą i jądrem zapewniają właściwą reakcję komórki na zmieniające się warunki wewnętrzne i środowiskowe, umożliwiając tym samym zachowanie homeostazy. Aktyna, będąc integralnym składnikiem obu tych przedziałów komórkowych, podlega także tym wpływom. Relacje pomiędzy dwiema jej pulami: jądrową i cytoplazmatyczną wydają się mieć z kolei krytyczne znaczenie w inicjowaniu i kontroli wielu procesów zachodzących w warunkach fizjologicznych i patologicznych (Percipalle i wsp., 2002). Szczególnie istotne wydaje się zagadnienie udziału cytoszkieletu aktynowego w aktywnej śmierci komórki co, jak już wspomniano, wiąże się z potencjalnymi możliwościami terapeutycznymi. Dotychczasowe doniesienia przedstawiały istotną rolę aktyny w powstawaniu nie tylko zmian morfologicznych podczas apoptozy (np. powstawanie pęcherzyków apoptotycznych), ale także sugerowały jej udział w zmianach zachodzących na terenie jądra komórkowego (Croft i wsp., 2005).

Innym ważnym elementem macierzy jądrowej jest białko SATB1 (Special AT-rich sequence-binding protein 1), po raz pierwszy opisane przez zespół Terumi Kohwi-Shigematsu (Dickinson i wsp., 1992). SATB1 wiąże się z bogatymi w adeninę i tyminę, wyspecjalizowanymi regionami dwuniciowego DNA, które nazywano regionami niesparowanych zasad (BURs) i tworzy trójwymiarową strukturę („klatkę”) w obrębie jądra komórkowego, kotwicząc do niej chromosomy poprzez wiązanie się do regionów BURs wybranych genów, a także fałduje i remodeluje chromatynę

przyciągając do siebie nawzajem nawet odległe części genomu. Nowo zaobserwowana forma organizacji chromatyny umożliwia wspólną i skoordynowaną regulację ekspresji wielu genów równocześnie. Innym mechanizmem działania powyższego białka jest rekrutacja enzymów modyfikujących histony w różne miejsca chromatyny, umożliwiającą regulację transkrypcji wybranych genów (Dickinson i wsp., 1992; Yasui i wsp., 2002). Ekspresja SATB1 na terenie jądra, opisywana wcześniej między innymi w procesie dojrzewania tymocytów i różnicowania komórek macierzystych (Alvarez i wsp., 2000), nabrała nowego, istotnego klinicznie znaczenia po serii doniesień naukowych wskazujących białko SATB1 jako niezależny czynnik rokowniczy w niektórych chorobach nowotworowych. Wysoki poziom ekspresji tego białka oznaczany w wycinkach nowotworu pobranych od pacjentek z rakiem sutka wyraźnie korelował z wystąpieniem przerzutów (niezależnie od stanu węzłów chłonnych w momencie oznaczenia) i krótszym czasem przeżycia. Równocześnie przeprowadzone oznaczenia profili ekspresji genów na liniach komórkowych raków sutka z zastosowaniem technik RNAi, w celu zahamowania ekspresji SATB1, wykazały zmiany w ekspresji ponad 1000 genów, w tym wielu wiązanych z występowaniem przerzutów i kojarzonych z agresywnym przebiegiem choroby, a także genów supresorowych i onkogenów. Stwierdzono, że ekspresja wielu genów odpowiedzialnych za promowanie powstawania przerzutów czy progresji komórek raka piersi uległa nasileniu pod wpływem SATB1, który równocześnie hamował ekspresję genów supresorowych przerzutowania. Obserwacje te pokrywały się ze zmianami w morfologii prowadzonych hodowli komórkowych *in vitro* (zahamowanie ekspresji SATB1 w bardzo agresywnej linii komórek raka piersi przywracało im morfologię prawidłowych komórek nabłonkowych sutka) oraz z oznaczonym *in vivo* potencjałem przerzutowym wszczepionych komórek nowotworowych u myszy. Wyniki te zależne były od kontrolowanej ekspresji SATB1 i pozwoliły wyciągnąć wnioski, że ekspresja tego białka niezbędna jest dla ujawnienia się agresywnego, przerzutowego fenotypu badanych komórek raka sutka (Han i wsp., 2008). Obserwacje te zostały potwierdzone przez inny zespół badawczy (Patani i wsp., 2009), a podobną zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *SATB1* a występowaniem przerzutów i niekorzystną prognozą wykazano także dla niedrobnokomórkowego raka płuc (Zhou i wsp., 2009), raka płaskonabłonkowego krtani (Zhao i wsp., 2010), pęcherza moczowego (Liu i wsp., 2010) oraz raka odbytnicy (Meng i wsp., 2012). Wyniki naszych badań przeprowadzonych na

chłoniaku skóry z komórek T (Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) sugerują również, że ekspresja SATB1 może być potencjalnym czynnikiem rokowniczym, potwierdzającym zróżnicowanie przebiegu klinicznego CTCL (Grzanka i wsp., 2012). Odmienne wyniki zostały zaprezentowane przez Iorns i wsp. (2010) w badaniach przeprowadzonych zarówno na liniach komórkowych raka sutka oraz na modelu mysim analogicznym do badań Kohwi-Shigematsu. Wykazali oni brak wpływu zmian ekspresji SATB1 na zgodną z wcześniejszymi doniesieniami zmianę morfologii hodowli komórkowej, formowanie guzów oraz powstawanie przerzutów u myszy bezgranicznych z ksenoprzeszczepem ludzkich komórek raka piersi. Co więcej, wykorzystując technikę mikromacierzy pokazano, że nadekspresja SATB1 w ludzkich komórkach raka piersi nie wpływa na poziom molekularnych markerów przerzutowania, w sposób korespondujący z promowaniem zmiany fenotypu komórek na agresywny. Ponadto, cytowani naukowcy przeanalizowali dostępne w piśmiennictwie dane z 6 niezależnych badań mikromacierzowych pod kątem określenia zależności między ekspresją SATB1 a ogólnym czasem przeżycia pacjentów z rakiem piersi. Stwierdzony przez nich brak występowania opisanej zależności poddał w wątpliwość rolę SATB1 jako niezależnego czynnikiem prognostycznym w raku piersi (Iorns i wsp., 2010).

W ostatnich latach, w wyniku doskonalenia przyżyciowych metod wizualizacyjnych, znacznym zmianom uległy poglądy na temat budowy interfazowego jądra komórkowego. Obecnie postrzegane jest ono jako miejsce dynamicznych interakcji pomiędzy chromatyną i białkami macierzy jądrowej, co bezpośrednio wpływa na jej organizację przestrzenną, a przez to na aktywność transkrypcyjną i skuteczność mechanizmów naprawczych DNA. Opierając się na funkcjonalnej kompartmentalizacji przestrzeni jądrowej, zaproponowano dwa zbliżone modele budowy jądra, w których architektura wewnątrzjądrowa charakteryzuje się określonym sposobem organizacji, a jej poszczególne elementy stanowią strukturalną i funkcjonalną całość. Według tej koncepcji każdy chromosom zajmuje wyodrębniony fizycznie obszar – strukturę dynamiczną, zmieniającą się wraz z aktywnością genomu, tzw. terytorium chromosomowe (CT). Przestrzeń międzyterytorialna (IC/ICD) znajdująca się pomiędzy terytoriami chromosomowymi lub wnikająca na ich teren (według jednego z modeli) umożliwia kontakt między sąsiednimi terytoriami chromosomów oraz interakcje z wypełniającymi ją białkami

macierzy wewnątrzjądrowej (Cremer i Cremer, 2001). Tak rozumianej architekturze wewnątrzjądrowej przypisuje się funkcję nadrzędnego elementu regulującego mechanizmy epigenetyczne, które warunkują ustalanie specyficznych dla danych typów komórek wzorców ekspresji genów (Cremer i wsp., 2004; Zegała i wsp., 2006). Jednak nasza wiedza dotycząca mechanizmów regulujących funkcjonowanie genomu na poziomie jądra komórkowego jest nadal bardzo ograniczona (van Driel i wsp., 2003).

W związku z toczącą się debatą na temat obecności i funkcji filamentów aktynowych na terenie jądra oraz rokowniczym znaczeniu zmian ekspresji białka macierzy jądrowej – SATB1 w różnych typach nowotworów, a także sugerowanym przez innych autorów udziałem SATB1 oraz jądrowej aktyny w procesach reorganizacji chromatyny, postanowiono zbadać strukturalno-funkcjonalne powiązanie jądrowej aktyny i białka SATB1 w procesie aktywnej śmierci komórek. Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe oparte jest na badaniach omówionych w cyklu ośmiu tematycznie wybranych publikacji, które są efektem kontynuacji moich wcześniejszych rozważań i pozostają w nurcie aktualnych, światowych poszukiwań powiązania aktyny z ważnymi procesami zachodzącymi na terenie jądra komórkowego.

4.3.2. PUBLIKACJA NR. 1: DOXORUBICIN-INDUCED F-ACTIN REORGANIZATION IN COFILIN-1 (NONMUSCLE) DOWN-REGULATED CHO AA8 CELLS. GRZANKA D., MARSZAŁEK A., GAGAT M., IZDEBSKA M., LIDIA GACKOWSKA, ALINA GRZANKA. FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2010; 48, 377-386.

W związku z wcześniejszą fluorescencyjną obserwacją F-aktyny znakowanej falloidyną oraz kofiliny-1 na terenie jąder komórek umierających na drodze apoptozy i katastrofy mitotycznej (Grzanka i wsp., 2010; 2011), postanowiono określić funkcjonalny wpływ jądrowej lokalizacji aktyny na rodzaj śmierci komórek indukowanej doksorubicyną. W pracy zastosowano technikę RNAi w celu obniżenia potranslacyjnej ekspresji kofiliny-1, co pozwoliło na upośledzenie mechanizmu transportu F-aktyny na drodze cytoplazma-jądro komórkowe. Badania, których celem obejmował określenie relacji ekspresji kofiliny i organizacji aktyny w kontekście jej potencjalnego zaangażowania w procesy śmierci komórek indukowanej doksorubicyną, przeprowadzono na dobrze zbadanym nam modelu CHO AA8. W celu indukcji śmierci komórek na drodze apoptozy i katastrofy mitotycznej

wykorzystano zastosowane w poprzednich pracach (Grzanka i wsp., 2010; 2011) stężenia doksorubicyny. Badania immunofluorescencyjne oraz cytometryczne wykazały zależną od dawki indukcję katastrofy mitotycznej (niskie i wysokie stężenia doksorubicyny) oraz apoptozy (głównie wysokie stężenia doksorubicyny). Jednakże, po zablokowaniu transportu aktyny z cytoplazmy do jądra komórkowego, poprzez obniżenie ekspresji kofiliny-1 za pomocą siRNA, nie obserwowano apoptozy, nawet pod wpływem działania najwyższych dawek doksorubicyny.

Wyniki te sugerują, że ekspresja kofiliny-1, a tym samym sprawny mechanizm transportu aktyny na drodze cytoplazma-jądro komórkowe, niezbędne są do aktywacji apoptozy indukowanej doksorubicyną. Jednocześnie, badania pokazy brak wpływu jądrowej lokalizacji F-aktyny na indukowaną doksorubicyną katastrofę mitotyczną, co wskazuje z kolei na odmienne mechanizmy reorganizacji chromatyny w obu procesach oraz na fakt, że apoptoza i katastrofa mitotyczna są niezależnymi od siebie procesami.

4.3.3. PUBLIKACJA NR. 2: ACTIN IS REQUIRED FOR CELLULAR DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115, 775-782.

Celem niniejszej pracy było usystematyzowanie wiedzy pochodzącej z ostatnich lat na temat udziału F-aktyny w procesach zachodzących na terenie jądra komórkowego, zwłaszcza podczas śmierci komórek. Do tej pory obecność F-aktyny na terenie jądra komórkowego była niezwykle kontrowersyjna, co związane było przede wszystkim z ograniczonymi metodami znakowania krótkich polimerów jądrowej aktyny. Dlatego też w pracy tej przedstawiono również opracowaną przez nasz zespół metodę ultrastrukturalnego znakowania F-aktyny za pomocą biotynylowanej falloidyny i nanokryształów półprzewodnikowych oraz niepublikowane wcześniej wyniki własnych badań uzyskanych w oparciu o opisywaną metodę. Pozwoliła nam ona nie tylko na czułą detekcję krótkich polimerów jądrowej aktyny, ale również na wykazanie udziału wyżej zorganizowanych struktur jądrowej F-aktyny w procesach reorganizacji chromatyny towarzyszącej aktywnej śmierci komórek.

Wykazanie obecności wyżej zorganizowanych struktur jądrowej aktyny na granicy hetero- i euchromatyny pozwoliło na nadanie dalszego kierunku naszym badaniom, który obejmował analizę interakcji pomiędzy jądrową F-aktyną a białkiem macierzy jądrowej – SATB1.

4.3.4. PUBLIKACJA NR. 3: EXPRESSION OF SPECIAL AT-RICH SEQUENCE-BINDING PROTEIN 1 (SATB1) IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMAS. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M., MARSZAŁEK A.: ONCOL. REP. 2015; 33, 250-266.

Inspiracją do przeprowadzenia tych badań były, prowadzone głównie na ustalonych liniach komórkowych CTCL, prace rzucające nowe światło na molekularne podstawy procesu nowotworzenia, wskazujące na zaburzenie procesu apoptozy, głównie w mechanizmie AICD (*ang. activation induced cell death*) jako przyczynę rozwoju CTCL. Jednak postępy poczynione w identyfikacji procesów odpowiedzialnych za nowotworzenie nie znalazły dotychczas szerszego przełożenia na postępowanie kliniczne. Co więcej, istniejące publikacje wskazujące potencjalne markery rokownicze nie odnosiły się do aktualnej wiedzy na temat zaburzeń apoptozy w CTCL. Nie było również innych doniesień naukowych wiążących zaburzenia na różnych etapach AICD z rokowaniem w tych jednostkach chorobowych, które potencjalnie pozwalałyby przewidzieć przebieg kliniczny i wybór adekwatnego, dostosowanego do rokowania postępowania leczniczego. Praca koncentruje się na roli białka SATB1 w patogenezie CTCL i na powiązaniu jego ekspresji z przebiegiem klinicznym tej grupy chorób. SATB1 bierze udział w procesie dojrzewania tymocytów oraz zgodnie z moimi obserwacjami i doniesieniami literaturowymi odgrywa kluczową rolę w sygnalizacji AICD. Ponadto, obserwowane zmiany ekspresji SATB1 mogą być nie tylko jedną z przyczyn powstania CTCL, ale także mogą wpływać na jego przebieg kliniczny (Grzanka i wsp., 2012).

W badaniach wykorzystano wycinki skóry z naciekiem nowotworowym, pobrane na różnych etapach procesu diagnostycznego i leczenia, które zachowane zostały w bloczkach parafinowych oraz w ciekłym azocie. Do badań zakwalifikowano 60 pacjentów (42 mężczyzn i 18 kobiet). Mediana wieku w chwili rozpoznania wynosiła 51 lat (w zakresie 28-75 lat), w tym pacjenci poniżej 40 roku życia – 21,67%, w wieku 40-50 lat – 26,67%, w wieku 51-60 lat – 28,33% i pacjenci w wieku powyżej 60 lat – 23,33%. Dane kliniczne uzyskano na podstawie analizy dokumentacji medycznej prowadzonej przez Poradnię Chłoniaków Skóry oraz na podstawie rejestru pacjentów prowadzonego przez Sekcję Chłoniaków Skóry Polskiej Grupy Badawczej Chłoniaków (SChS PGBCh). Pacjentów włączono do badania z uwzględnieniem kryteriów zawartych w klasyfikacji pierwotnych chłoniaków skórnych wg WHO (2008) oraz rekomendacji klinicznych odnoszących się do diagnostyki,

leczenia i obserwacji chłoniaków skóry opracowanych przez European Society of Medical Oncology (ESMO) w 2009 roku. Badania dodatkowo zostały uzupełnione o pełen panel badań immunohistochemicznych, a także o oznaczenie rearanżacji genów receptora TCR. W oparciu o powyższe kryteria większość włączonych do badania pacjentów prezentowała klasyczną postać ziarniniaka grzybiastego (MF; 56 pacjentów, 93,33%), 1 pacjent wariant folikulotropowy MF (1,67%) oraz 1 pacjentka o typie histiocytarnym (typ A) Lymphomatoid Papulosis (LyP; 1,67%). Zespół Sezary'ego (SS) rozpoznano u 2 pacjentów (3,33%). Opierając się na danych zawartych w dokumentacji medycznej dokonano reklasyfikacji cechy T według wytycznych ISCL/EORTC. W ocenie przeprowadzonej reakcji immunohistochemicznej na skrawkach tkankowych przyjęto kryteria cytomorfologiczne oparte na wytycznych literaturowych (tj. wielkość komórki, kształt jądra, epidermotropizm) wsparte cyfrową analizą obrazu z wykorzystaniem programu ImageJ. Przyjęto 10-stopniową skalę oceny intensywności reakcji immunohistochemicznej opierając się na ilości komórek wykazujących dodatnią reakcję z przeciwciałem SATB1. Za SATB1-ujemne uznano wycinki nie wykazujące reakcji lub reakcję w pojedynczych komórkach (0-2), za SATB1-dodatnie uznano wycinki ze średnio nasiloną (3-4) i silną reakcją (5-10).

Analiza przebiegu klinicznego choroby wykazała wyraźnie korzystniejszy przebieg choroby u pacjentów z ekspresją SATB1 wyrażony dłuższym czasem przeżycia, wyraźnie dłuższym czasem progresji do bardziej zaawansowanych stadiów choroby (dłuższe okresy trwania poszczególnych faz choroby) oraz istotnie lepszą reakcją na terapię (wyższy odsetek remisji całkowitych i częściowych). Analiza ryzyka progresji choroby wykazała najniższe ryzyko u pacjentów zdiagnozowanych w wieku 40-50 lat, podczas gdy najwyższą w wieku 51-60 lat. Ponadto, wyższe ryzyko progresji wykazywały kobiety. W odniesieniu do klasyfikacji T, pacjenci zdiagnozowani w T2 charakteryzowali się najwyższym 20-letnim ryzykiem progresji, podczas gdy najniższym pacjenci w T1. Ryzyko progresji analizowano w odniesieniu do ekspresji SATB1. Badania wykazały istotnie statystyczny wzrost ryzyka progresji u pacjentów wykazujących ekspresję SATB1. Ponadto, analiza porównawcza wykazała statystycznie istotne zmiany prawdopodobieństwa progresji choroby pomiędzy pacjentami niewykazującymi ekspresji SATB1 a wykazującymi jego umiarkowaną ekspresję (HR=3,22; P=0,0051). Zaobserwowano również istotne

statystycznie różnice pomiędzy pacjentami z niską a umiarkowaną ekspresją SATB1 (HR=4,14; P=0,0165 lub HR=5,23; P=0,0064), jak również pomiędzy pacjentami z niską a wysoką ekspresją (HR=4,86; P=0,0255 lub HR=5,72; P=0,0110). Jednakże, warty podkreślenia jest fakt, że pacjenci SATB1-dodatni pozostawali dłużej w każdej fazie T (8,64 lat w T1, 8,36 lat w T2, 3,5 lat w T3 oraz 7,25 w T4) w odniesieniu do pacjentów uznanych za SATB1-negatywnych (4,58 lat w T1, 5,67 lat w T2, 2,08 lat w T3 i 7.25 w T4). Ponadto, powyższe wydłużenie czasu każdej z faz klasyfikacji T korelowało z lepszą przeżywalnością pacjentów wykazujących ekspresję SATB1.

Wpływ ekspresji SATB1 na indukcję apoptozy w warunkach kontrolowanej ekspresji tego białka obserwowano w badaniach na modelu komórkowym Jurkat. Obniżenie ekspresji SATB1 uzyskano stosując metodę siRNA. Apoptozę indukowano monoklonalnym przeciwciałem przeciwko CD3 oraz CD95L/FAS-L (ligand receptora FAS), jak również PMA łącznie z jonomycyną, po uprzedniej 3-dniowej stymulacji komórek IL-2. Analizy ilościowe przeprowadzono na cytofotometrze obrazowym w oparciu o podwójne znakowanie komórek aneksyną V i jodkiem propidyny. Badania wykazały, że obniżenie ekspresji SATB1 przy użyciu techniki RNAi powodowało statystycznie istotną oporność komórek na AICD indukowaną monoklonalnym przeciwciałem przeciwko CD3 oraz CD95, jak również PMA w połączeniu z jonomycyną (obniżenie z 49,22 do 25,07%; P=0,0294; z 45,27 do 25,28%; P=0,0159 oraz z 38,03 do 11,67%; P=0,0357, odpowiednio).

Uzyskane wyniki potwierdzają istotną rolę białka SATB1 w przebiegu AICD, co może tłumaczyć niekorzystny przebieg kliniczny przypadków CTCL nie wykazujących ekspresji SATB1. A zatem badania te pozwalają sugerować, że SATB1 może mieć znaczenie rokownicze i może być uznany za niezależny czynnik rokowniczy w chłoniakach T-komórkowych skóry.

4.3.5. PUBLIKACJA NR. 4: INVOLVEMENT OF THE SATB1/F-ACTIN COMPLEX IN CHROMATIN REORGANIZATION DURING ACTIVE CELL DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: INT. J. MOL. MED. 2014; 33, 1441-1450.

Celem pracy było wykazanie i określenie znaczenia interakcji zachodzących pomiędzy pulą jądrowej F-aktyny i białkiem SATB1 w powiązaniu z procesami apoptozy i katastrofy mitotycznej w warunkach kontrolowanej ekspresji obu tych białek na terenie jądra komórkowego. Na podstawie naszych wstępnych obserwacji,

ukazujących kolokalizację F-aktyny i SATB1 na obszarze jądra komórkowego założyliśmy, że interakcje pomiędzy tymi białkami mogą mieć charakter funkcjonalny. Aby zweryfikować powyższą hipotezę wykorzystaliśmy dobrze znany nam materiał badawczy – linię komórkową CHO AA8, która stanowi podstawowy model wykorzystywany w naszych badaniach nad cytoszkieletem. Zgodnie z naszymi wcześniejszymi publikacjami, w odpowiedzi na doksorubicynę obserwowaliśmy komórki o cechach apoptozy i katastrofy mitotycznej. Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły dowodów nie tylko na obecność polimerów aktyny na terenie jąder komórek traktowanych cytostatykiem, ale również na ich udział w remodelingu chromatyny i/lub procesach transkrypcyjnych.

Ponadto, badania wykazały obecność funkcjonalnego kompleksu SATB1/F-aktyna na terenie jąder komórek umierających na drodze aktywnej śmierci. Obserwowano kolokalizację zarówno SATB1, jak i F-aktyny w aktywnych transkrypcyjnie miejscach chromatyny wyznakowanych 5-FUrd (5'-Fluorourydą). Powyższe wyniki z jednej strony wzmacniają wiedzę na temat udziału białka SATB1 w równoczesnej transkrypcji wielu genów podczas aktywnej śmierci komórki. Z drugiej zaś wskazują, że do tworzenia opisywanego kompleksu niezbędne jest uorganizowanie F-aktyny w struktury wyższego rzędu. Ocena występowania kompleksu SATB1/F-aktyna z wykorzystaniem opracowanej przez nasz zespół metody znakowania F-aktyny kropkami kwantowymi na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazała, iż kompleks ten zlokalizowany jest na granicy skondensowanej i zdecondensowanej chromatyny. Odkrycie to znacznie umocniło dowody na kooperację SATB1 i F-aktyny w procesach transkrypcyjnych towarzyszących aktywnej śmierci komórek i w zestawieniu z danymi uzyskanymi metodami molekularnymi sugeruje, iż kompleks SATB1/F-aktyna ma charakter funkcjonalny.

Badania kolokalizacyjne zostały uzupełnione o analizę interakcji SATB1 i F-aktyny metodą FRET oraz o autorską technikę precypitacji kompleksów F-aktyna/białko opartą na separacji magnetycznej. Analiza transferu energii wykazała, że kompleks SATB1/F-aktyna nie jest obecny w komórkach kontrolnych (wydajność FRET=0.29%), natomiast pojawia się dopiero po indukcji aktywnej śmierci w komórkach traktowanych doksorubicyną (wydajność FRET 8.81%). Zatem wyniki tych analiz również sugerowały funkcjonalne znaczenie powstającego kompleksu

białkowego. Powyższa zależność została potwierdzona również biochemicznie. Zastosowanie opartej na separacji magnetycznej metody precypitacji kompleksu F-aktyna/SATB1 pokazało ponadto, że SATB1 wchodzi w interakcje nie tylko z krótkimi polimerami aktyny obecnymi we frakcji supernatantu, ale także z aktywnymi strukturami wyższego rzędu oraz filamentami związanymi z błonami, które znajdowały się we frakcji osadu (pelletu).

Powyższe wyniki potwierdziły nasze wcześniejsze sugestie o udziale F-aktyny i SATB1 w procesach rearanżacji chromatyny i/lub równoczesnej transkrypcji wielu genów podczas aktywnej śmierci komórki. W niniejszych badaniach kolokalizacja F-aktyny z SATB1 w aktywnych transkrypcyjnie regionach chromatyny została zaobserwowana na poziomie mikroskopu konfokalnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a dodatkowe analizy z wykorzystaniem techniki FRET potwierdziły ich wzajemne interakcje. Natomiast zastosowana metoda separacji magnetycznej kompleksów białkowych z F-aktyną wskazała na występowanie białka SATB1 w molekularnej interakcji z F-aktyną, zwłaszcza w komórkach ulegających aktywnej śmierci.

4.3.6. PUBLIKACJA NR. 5: THE ALTERATIONS IN SATB1 AND NUCLEAR F-ACTIN EXPRESSION AFFECT APOPTOTIC RESPONSE OF THE MCF-7 CELLS TO GELDANAMYCIN. GRZANKA D., IZDEBSKA M., KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA A., GAGAT M.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2015, 53, 78-87.

W związku z wykazaniem wcześniej funkcjonalnym powiązaniem SATB1 i F-aktyny z aktywną śmiercią komórek CHO AA8 i Jurkat, a także rokowniczym potencjale białka SATB1 w chłoniakach skóry z komórek T, w cyklu 2 kolejnych prac (opublikowanych w Folia Histochem. Cytobiol. 2015, 53) postanowiono określić na ile jądrowa ekspresja białka SATB1 i jego interakcje z jądrową F-aktyną są uniwersalna i występują w innych typach nowotworów, w odpowiedzi na działanie cytostatyków. W niniejszej pracy określono wpływ geldanamycyny na indukowaną śmierć komórek oraz zmiany w cyklu komórek nieagresywnego raka sutka linii MCF-7, w warunkach zmiennej ekspresji białka SATB1 i jądrowej F-aktyny. Ekspresję białka SATB1 regulowano przy użyciu siRNA przeciwko SATB1 lub wektora ekspresyjnego z wklonowaną sekwencją cDNA ludzkiego SATB1, natomiast zmienną lokalizację i ekspresję jądrowej F-aktyny osiągnięto poprzez wyciszenie lub wzbudzenie nadekspresji kofiliny-1. Badania wykazały, że obniżenie ekspresji SATB1 osłabiało

apoptotyczną odpowiedź komórek MCF-7 na działanie geldanamycyny, podczas gdy po wzbudzeniu nadekspresji SATB1 zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek aneksyno-pozytywnych. Podobnie, wzbudzenie nadekspresji kofiliny-1, a więc wymuszenie jądrowej lokalizacji F-aktyny, skutkowało wzrostem apoptozy indukowanej geldamycyną. Ponadto, analiza zmian cyklu komórkowego w komórkach MCF-7 ze wzbudzoną nadekspresją SATB1 lub kofiliny-1 wykazała zależny od geldanamycyny wzrost populacji komórek hipodiploidanych wraz z obniżeniem odsetka komórek poliploidalnych oraz blokadą cyklu w fazie G1.

Wyniki te sugerują, że zarówno wzmożona ekspresja SATB1, jak i jądrowa lokalizacja F-aktyny potęgują odpowiedź komórek linii MCF-7 na działanie geldanamycyny. Jednocześnie, uzyskane w pracy rezultaty potwierdzają poprzednio publikowane prace i wskazują, że jądrowa ekspresja obu białek niezbędna jest w indukcji aktywnej śmierci komórek.

4.3.7. PUBLIKACJA NR. 6: THE INTERACTIONS BETWEEN SATB1 AND F-ACTIN ARE IMPORTANT FOR MECHANISMS OF ACTIVE CELL DEATH. GRZANKA D., KOWALCZYK A.E., IZDEBSKA M., KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA A., GAGAT M.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2015; 53, 152-161.

Kontynuując rozważania podjęte w pierwszej publikacji cyklu (Folia Histochem. Cytobiol. 2015, 53: 78-87), w niniejszej pracy oceniono stopień interakcji białka SATB1 z F-aktyną w komórkach MCF-7 umierających na drodze aktywnej śmierci indukowanej geldanamycyną, w warunkach zmiennej ekspresji SATB1 i jądrowej F-aktyny. W tym celu określono kolokalizację obu białek zarówno na poziomie mikroskopu konfokalnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a interakcje tych białek zbadano metodą FRET oraz za pomocą autorskiej metody separacji magnetycznej F-aktyny i białek z nią oddziałujących. Badania fluorescencyjne wykazały wzmożoną, głównie jądrową, kolokalizację białka SATB1 i F-aktyny pod wpływem działania geldamycyny w komórkach MCF-7 ze wzbudzoną nadekspresją SATB1 lub kofiliny-1. Ponadto, wyniki te zostały potwierdzone na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego, gdzie kompleksy SATB1/F-aktyna obserwowano na granicy elektronowo-gęstej (skondensowanej) i elektronowo-przezierniej (zdekondensowanej) chromatyny, co umożliwiło również powiązanie funkcjonalne powyższych białek. Dodatkowo, biochemiczne metody oceny interakcji białkowych wykazały zależny od geldanamycyny wzrost oddziaływań

SATB1/jądrowa F-aktyna zarówno po wzbudzeniu nadekspresji SATB1, jak i kofiliny-1.

Podsumowując, zaprezentowane powyżej badania po raz kolejny potwierdziły istotność interakcji SATB1/jądrowa F-aktyna w procesie aktywnej śmierci komórki, a wraz z poprzednimi pracami sugerują o uniwersalności zaangażowania powyższych oddziaływań w procesy aktywnej śmierci komórek.

4.3.8. PODSUMOWANIE

Przedstawione do recenzji osiągnięcie naukowe dotyczy „strukturalno-funkcjonalnego powiązania jądrowej aktyny i białka SATB1 w procesie indukowanej śmierci komórek” i składa się z 6 wybranych publikacji naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 9.779 i 98 punktów MNiSW. Początkowe badania nie ujęte w niniejszym osiągnięciu naukowym wykazały, że w zależności od dawki doksorubicyna indukuje śmierć komórek na drodze apoptozy i katastrofy mitotycznej, którym towarzyszą zmiany organizacyjne oraz lokalizacyjne cytoszkieletu aktynowego (Grzanka i wsp., 2010; 2011). Obserwacje te dały podstawę do kolejnych badań związanych z udziałem jądrowych filamentów aktynowych w powyższych rodzajach śmierci komórek. Wykazano, że zaburzenie transportu aktyny z cytoplazmy do jądra komórkowego, poprzez obniżenie ekspresji kofiliny-1 (niemięśniowej), hamowało apoptotyczną odpowiedź komórek na działanie doksorubicyny, promując tym samym ich śmierć na drodze katastrofy mitotycznej. Udział jądrowych filamentów aktynowych w procesach śmierci komórek został podsumowany pracą poglądową, w której uwzględniono również niepublikowane do tej pory badania własne na temat roli wyżej zorganizowanych struktur jądrowej F-aktyny w komórkach umierających śmiercią aktywną. W pracy tej zwrócono również uwagę na problemy metodologiczne związane z detekcją krótkich polimerów jądrowej aktyny na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego, a w szczególności elektronowego, a także przedstawiono opracowaną autorską metodę ultrastrukturalnej lokalizacji F-aktyny z zastosowaniem falloidyny i nanocząsteczek półprzewodnikowych. Metoda ta umożliwiła nam czułą detekcję krótkich polimerów jądrowej aktyny oraz analizę jądrowych kompleksów białkowych z F-aktyną. Równocześnie, w związku z toczącą się dyskusją na temat znaczenia rokowniczego ekspresji białka SATB1 w różnych typach nowotworów, postanowiono ocenić czy to

zdolne do remodelowania przestrzennej struktury chromatyny białko może mieć również właściwości prognostyczne w chłoniakach skóry z komórek T. Badania przeprowadzone na archiwalnym materiale tkankowym pochodzącym od pacjentów z długotrwałym przebiegiem choroby, wykazały, że już nawet umiarkowana ekspresja białka SATB1 związana jest z wydłużeniem czasu przeżycia pacjentów chorych na ten rodzaj nowotworu i stwierdzono, że białko SATB1 można uznać za niezależny czynnik rokowniczy w chłoniakach skóry z komórek T. Ponadto, wykorzystanie jako modelu badawczego komórek Jurkat, w których ekspresja SATB1 została obniżona przy użyciu siRNA, pozwoliło na wskazanie oporności na AICD jako potencjalnego mechanizmu przyczyniającego się do gorszych rokowań pacjentów z obniżoną lub brakiem ekspresji SATB1. W związku z wykazaniem zaangażowaniem zarówno białka SATB1, jak i F-aktyny w procesy reorganizacji chromatyny oraz śmierć komórek na drodze apoptozy, postanowiono określić możliwość ich wzajemnej, funkcjonalnej interakcji w komórkach umierających na drodze aktywnej. Badania wykazały obecność funkcjonalnego kompleksu SATB1/jądrowa F-aktyna w miejscach aktywnych transkrypcyjnie, na granicy hetero- i euchromatyny, co sugeruje jego zaangażowanie w przebudowę chromatyny towarzyszącą procesowi transkrypcji podczas aktywnej śmierci komórek. Aby wyjaśnić czy obecność i funkcja opisywanego kompleksu zależna jest od typu komórek, wydano cykl 2 prac poświęconych wpływowi wymuszonych zmian ekspresji SATB1 oraz rozmieszczenia F-aktyny na procesy śmierci komórek raka sutka linii MCF-7. W pracach tych wykazaliśmy, że zarówno jądrowa lokalizacja oraz ekspresja SATB1 są istotne w procesach śmierci komórek na drodze apoptozy. Potwierdziliśmy również, że obecność funkcjonalnych interakcji pomiędzy SATB1 i jądrową F-aktyną na granicy skondensowanej i zdecondensowanej chromatyny niezbędna jest w procesie apoptozy. Ponadto, zestawiając wyniki własnych badań przeprowadzonych na różnych liniach komórkowych można sugerować o uniwersalności zaangażowania interakcji jądrowej F-aktyny oraz SATB1 w procesy aktywnej śmierci komórek.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłem współautorem 6 publikacji naukowych (o całkowitym IF = 5.871 i 47 punktach MNiSW) oraz autorem lub współautorem 11 doniesień zjazdowych.

W latach 1997-2001, jeszcze jako student medycyny, brałem udział w badaniach prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej w Bydgoszczy. Moje pierwsze badania, w których uczestniczyłem dotyczyły markerów nowotworowych: onkoproteiny c-erbB-2 i antygenu PCNA, a ich efektem były dwie publikacje naukowe, w których wykazano rozmieszczenie obu tych markerów w pojedynczych komórkach raka płaskonabłonkowego krtani na poziomie mikroskopu elektronowego (Acta Histochem. 2000, 102: 403-411; Neoplasma 2000, 47: 288-293). Wynikiem kontynuowanych badań w tym zakresie była również publikacja dotycząca oceny PCNA w mikroskopie świetlnym i elektronowym w komórkach linii białaczek ludzkich HL-60 i K-562. Badania te miały cel poznawczy, a lokalizacja tego białka na poziomie ultrastrukturalnym pozwoliła również pośrednio wyciągnąć wnioski co do proliferacji tych komórek.

Kolejnym i zasadniczym etapem mojej pracy eksperymentalnej było zainteresowanie się białkami cytoszkieletu, które do chwili obecnej pozostają jednym z podstawowych kierunków moich badań. Ówczesnie skupiłem się głównie na aktynie, białku wchodzącym w skład cytoszkieletu oraz jej reorganizacji pod wpływem różnych czynników stresowych. Badania te realizowane były dzięki dalszej współpracy z zespołem Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej w Bydgoszczy. Przedmiotem moich eksperymentów była ocena organizacji F-aktyny w komórkach białaczkowych linii K-562 w mikroskopie fluorescencyjnym. Za badania te w 2001 roku, jeszcze jako student, otrzymałem nagrodę I stopnia za plakat na Ogólnopolskim Przeglądzie Prac Naukowych Studentów Medycyny i Lekarzy Stażystów.

Po studiach podjąłem pracę w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej na stanowisku asystenta i dalej kontynuowałem swoje doświadczenia w zakresie cytoszkieletu. Efektem tych badań były publikacje w polskich (Pol. J. Pathol. 2002,

53: 43-50; Med. Sci. Monitor 2003, 9: BR66-BR69) i zagranicznych czasopismach (Biochem. Pharmacol. 2003, 66: 1611-1617; Oncol. Rep. 2004, 11: 765-770) oraz doniesienia na międzynarodowych i krajowych konferencjach. W tym czasie współpracowałem także z zespołem urologów. Przedmiotem naszych eksperymentów był wpływ doksazosyny na lokalizację endoteliny-1 w obrębie gruczołu krokowego u pacjentów z łagodnym przerostem prostaty. Wyniki tych badań zostały przedstawione na konferencjach i w Urologii Polskiej (2004, 57: 2a). Innym tematem, którym zajmowaliśmy się w ramach powyższej współpracy była porównawcza, komputerowa analiza obrazu mikroskopowej struktury prawidłowego połączenia miedniczkowo-moczowodowego oraz jego pierwotnego zwężenia. Wyniki tych badań zostały przedstawione na konferencji krajowej (XXXIV Naukowy Kongres PTU. Kraków, 24-26 VI 2004) i międzynarodowej [27th Congress of the Societe Internationale d'Urologie (SIU). Honolulu, Hawaii, 3-7 X 2004]. Jednak od początku mojej pracy naukowej szczególnie zainteresowany byłem badaniami nad białkami cytoszkieletu i ich udziału w śmierci komórek. Badania, które prowadziłem na komórkach linii CHO AA8 w zakresie cytoszkieletu stanowiły podstawę do napisania pracy doktorskiej pt. „Reorganizacja aktyny w fibroblastach chomika linii CHO AA8 po indukcji apoptozy doksorubicyną i wybranymi czynnikami fizycznymi”. Praca ta była punktem wyjścia dla ustanowienia komórek CHO AA8 naszym modelem do badań cytoszkieletu oraz opracowania metod wykorzystanych i rozwijanych w dalszych i trwających do chwili obecnej badaniach.

5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłem autorem lub współautorem 32 publikacji naukowych, w tym jednej poglądowej oraz jednego punktowanego referatu zjazdowego (o całkowitym IF = 39.640 oraz 418 punktach MNiSW, poza publikacjami stanowiącymi podstawę osiągnięcia habilitacyjnego). W okresie tym byłem również autorem lub współautorem 57 doniesień zjazdowych i trzech obrazów okładki.

W 2005 roku obroniłem pracę doktorską pt. „Reorganizacja aktyny w fibroblastach chomika linii CHO AA8 po indukcji apoptozy doksorubicyną i wybranymi czynnikami fizycznymi”, której promotorem był prof. dr hab. Jan Domaniewski.

Uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy dnia 9 listopada 2005 roku uzyskałem stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny. Z wyników ujętych w pracy doktorskiej powstały dwie publikacje naukowe wydane w czasopiśmie *Neoplasma* (2005, 52: 46-5; 2006, 53: 328-332). Po otrzymaniu stopnia doktora nauk medycznych, moje główne zainteresowania i tematyka badawcza w dalszym ciągu dotyczyła białek cytoszkieletu. Wynikiem tych badań były kolejne publikacje z tego zakresu (*Folia Histochem. Cytobiol.*, 2007, 45: 191-197 i 2009, 47: 453-459; *Neoplasma* 2008, 55: 409-415; *Central Eur. J. Biol.* 2009, 4: 351-361) oraz doniesienia na konferencjach krajowych i międzynarodowych. W ostatnich latach szczególnie zainteresowała mnie funkcja aktyny na terenie jądra komórkowego, zwłaszcza w powiązaniu z innymi białkami macierzy jądrowej. Swoje badania skoncentrowałem na białku SATB1, któremu przypisuje się znaczenie rokownicze w różnych typach nowotworów. Publikacje dotyczące powiązania funkcjonalno-strukturalnego obu tych białek znalazły się w osiągnięciu naukowym (pt.: „Strukturalno-funkcjonalne powiązanie jądrowej aktyny i białka SATB1 w procesie indukowanej śmierci komórek”).

Warto wspomnieć w tym miejscu o współpracy z Katedrą Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii, gdzie obecnie pracuję, gdyż rozwinięcie początkowej współpracy w zakresie diagnostyki histopatologicznej chłoniaków skóry w dużej mierze wpłynęło na wykorzystanie uzyskanego w ten sposób materiału i doświadczenia w moim głównym nurcie badawczym. Opierając się na tkankowym materiale archiwalnym zgromadzonym w procesie diagnostycznym pacjentów z chłoniakiem T-komórkowym skóry (Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) zaproponowałem oznaczenie ekspresji białka macierzy jądrowej SATB1 i jej korelację z przebiegiem klinicznym choroby. Wstępne wyniki tej pracy sugerujące, że ekspresja SATB1 może być potencjalnym czynnikiem rokowniczym potwierdzającym zróżnicowanie przebiegu klinicznego CTCL stały się podstawą opracowania projektu badawczego (N N401 596040) oraz publikacji pt. „Correlation of SATB1 expression with clinical course of cutaneous T-cell lymphomas” opublikowanej w *Pol. J. Pathol.* (2012, 63: 101-105). Poza 6 publikacjami włączonymi do osiągnięcia naukowego powstało wiele innych, których tematyka dotyczyła cytoszkieletu (*Acta Histochem.* 2010, 112: 62-71; *Med. Biol.Sci.* 2010, 25: 17-23; *Cell Biol. Int.* 2010, 34: 197-211; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010, 136: 717-736; *Oncol. Rep.* 2010, 23: 655-663;

Ultrastruct. Pathol. 2011, 35: 130-138; Oncol. Rep. 2012, 28: 2138-2148; Acta Histochem. 2013, 115: 487-495; Int. J. Mol. Med. 2013, 32: 115-129; Folia Histochem. Cytochem. 2013, 51: 179-192; Acta Histochem. 2013, 115: 8-15; Acta Histochem. 2014, 116: 606-618).

Odrębne badania, które stanowią część mojego dorobku prowadzone były również we współpracy z innymi jednostkami Collegium Medicum. W wyniku tej współpracy powstały publikacje i doniesienia prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych. We współpracy z Katedrą i Kliniką Chorób Oczu powstały dwie prace dotyczące rozwoju wewnątrzwardówkowych naczyń drenujących po niepenetrującej głębokiej sklerektomii (NPDS) z implantacją implantów wchłaniających i nienasiąkliwych oraz bez implantacji materiału. (Ophthal. Nachrichten 2005: 18-19.; Med. Sci. Monitor 2012; 18: BR402-BR408). Z Katedrą Pediatrii, Hematologii i Onkologii powstała publikacja dotycząca kryteriów ilościowych oceny histopatologicznej biopsji skóry w diagnostyce GvHD (choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, *ang. graft versus host disease*) u pacjentów po transplantacji allogenicznych komórek hematopoetycznych (Med. Wieku Rozw. 2008, 12: 1105-1111). Natomiast w ramach współpracy z Katedrą Medycyny Regeneracyjnej powstała praca dotycząca badań nad nowym systemem dostarczania leków antynowotworowych, z wykorzystaniem nanorurek połączonych z przeciwciałami anti-CD133 (Oncotarget 2015, 6: 22776-22798).

6. PLANY BADAWCZE NA PRZYSZŁOŚĆ

W związku ze zmianą miejsca zatrudnienia i uzyskaniem stanowiska p.o. kierownika Pracowni Biologii Molekularnej Skóry, Immunodermatologii i Dermatopatologii, możliwe było pogłębienie mojej współpracy diagnostyczno-badawczej w zakresie chorób nowotworowych i zapalnych skóry, dzięki której znacznie zwiększyła się baza tkankowego materiału archiwalnego, zgromadzonego w trakcie prowadzonej przeze mnie diagnostyki histopatologicznej. Umożliwiło mi to pogłębienie badań nad grupą chorób CTCL oraz ich rozszerzenie na inne nowotwory skóry oraz choroby nienowotworowe. Zaplecze sprzętowe pracowni pozwoliło mi również na rozszerzenie badań o techniki biologii molekularnej w obecnie realizowanych projektach, co zamierzam wykorzystać do poszukiwania nowych markerów rokowniczych i diagnostycznych.

Wśród badanych przeze mnie potencjalnych markerów diagnostycznych wczesnych postaci ziarniniaka grzybiastego najbardziej obiecujące jest białko regulujące dojrzewanie limfocytów T - TOX (Thymocyte selection-associated high mobility group box protein) oraz PDCD1 (Programmed cell death 1) - białko kontrolujące dojrzewanie i apoptozę limfocytów. Interesuje mnie także aspekt zaburzeń ekspresji PDCD1 w łuszczycy. Równocześnie zamierzam kontynuować badania nad udziałem białka SATB1 w aktywnej śmierci komórki i jego znaczeniu w różnych jednostkach chorobowych, ze szczególnym uwzględnieniem CTCL.

Nowo podjętym przeze mnie kierunkiem badań jest ocena znaczenia białek szoku cieplnego (HSP70 i HSP90) w chorobach nowotworowych i zapalnych skóry. Wstępnym efektem tych badań są powstające obecnie pod moją opieką prace magisterskie i praca doktorska oparta na korelacji ekspresji HSP90 z przebiegiem klinicznym łuszczycy, której jestem opiekunem pomocniczym.

Innym kierunkiem badań kontynuowanym przeze mnie we współpracy z Zakładem Endoskopii Katedry Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii jest analiza wpływu infekcji *Helicobacter Pylori* na powstawanie uszkodzeń DNA i powiązanie ich z późniejszym rozwojem raka żołądka.

7. PIŚMIENNICTWO

Alvarez J.D., Yasui D.H., Niida H., Joh T., Loh D.Y., Kohwi-Shigematsu T.: The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev.* 2000; 14, 521-535.

Carlier M.F., Pantaloni D.: Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* 2007; 282, 23005-23009.

Chang B.D., Broude E.V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Xuan Y., Kandel E.S., Lausch E., Christov K., Roninson I.B.: A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 1999; 59, 3761-3767.

Clark T.G., Merriam R.W.: Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell.* 1977; 12, 883-891.

Cremer T., Cremer C.: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2: 292-301.

- Cremer T., Küpper K., Dietzel S., Fakan S.: Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol. Cell.* 2004; 96: 555-567.
- Croft D.R., Coleman M.L., Li S., Robertson D., Sullivan T., Stewart C.L., Olson M.F.: Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J. Cell Biol.* 2005; 168, 245-255.
- Dickinson L.A., Joh T., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T.: A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell.* 1992; 70, 631-645.
- Eom Y.W., Kim M.A., Park S.S., Goo M.J., Kwon H.J., Sohn S., Kim W.H., Yoon G., Choi K.S.: Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene.* 2005; 24, 4765-4777.
- Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Alnemri E.S., Altucci L., Andrews D., Annicchiarico-Petruzzelli M., Baehrecke E.H., Bazan N.G., Bertrand M.J., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Bredesen D.E., Brenner C., Campanella M., Candi E., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., Di Daniele N., Dixit V.M., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Fimia G.M., Flavell R.A., Fulda S., Garrido C., Gougeon M.L., Green D.R., Gronemeyer H., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Hengartner M.O., Ichijo H., Joseph B., Jost P.J., Kaufmann T., Kepp O., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lugli E., Madeo F., Malorni W., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Meier P., Melino S., Mizushima N., Moll U., Muñoz-Pinedo C., Nuñez G., Oberst A., Panaretakis T., Penninger J.M., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Ravichandran K.S., Rizzuto R., Rodrigues C.M., Rubinsztein D.C., Rudel T., Shi Y., Simon H.U., Stockwell B.R., Szabadkai G., Tait S.W., Tang H.L., Tavernarakis N., Tsujimoto Y., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Villunger A., Wagner E.F., Walczak H., White E., Wood W.G., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G.: Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015; 22, 58-73.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G.: Molecular definitions of cell death subroutines:

- recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012; 19, 107-120.
- Giganti A., Friederich E.: The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Prog Cell Cycle Res.* 2003; 5, 511-525.
- Grzanka D., Grzanka A., Izdebska M., Gackowska L., Stępień A., Marszałek A.: Actin reorganization in CHO AA8 cells undergoing mitotic catastrophe and apoptosis induced by doxorubicin. *Oncol. Rep.* 2010; 23, 655-663.
- Grzanka D., Marszałek A., Izdebska M., Gackowska L., Szczepański M.A., Grzanka A.: Actin cytoskeleton reorganization correlates with cofilin nuclear expression and ultrastructural changes in CHO AA8 cell line after apoptosis and mitotic catastrophe induction by doxorubicin. *Ultrastruct. Pathol.* 2011; 35, 130-138.
- Grzanka A., Grzanka D., Gagat M., Tadrowski T., Sokołowska-Wojdyło M., Marszałek A., Placek W.: Correlation of SATB1 expression with clinical course of cutaneous T-cell lymphomas. *Pol. J. Pathol.* 2012; 63, 101-105.
- Han H.J., Russo J., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T.: SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature.* 2008; 452, 187-193.
- Hightower RC, Meagher RB: The molecular evolution of actin. *Genetics.* 1986; 114, 315-332.
- Iorns E., Hnatyszyn H.J., Seo P., Clarke J., Ward T., Lippman M.: The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010; 102: 1284-1296.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G.; Nomenclature Committee on Cell Death 2009: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16, 3-11.
- Litwiniec A., Grzanka A.: Znaczenie starzenia na poziomie komórki w walce z chorobą nowotworową. *Nowotwory Journal of Oncology.* 2009; 59, 104-113.
- Liu C.X., Wen Y., Xu K., Zheng S.B., Xu Y.W., Chen B.S.: Expression of special AT-rich sequence-binding protein in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010; 30, 1389-1391.
- Lockshin R.A., Zakeri Z.: Cell death in health and disease. *J. Cell Mol. Med.* 2007; 11, 1214-1224.

- Patani N., Jiang W., Mansel R., Newbold R., Mokbel K.: The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2009; 9, 18.
- Percipalle P., Jonsson A., Nashchekin D., Karlsson C., Bergman T., Guialis A., Daneholt B.: Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30, 1725-1734.
- Rao J., Li N.: Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2004; 4, 345-354.
- van Driel R., Fransz P.F., Verschure P.J.: The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 4067-4075.
- Yasui D., Miyano M., Cai S., Varga-Weisz P., Kohwi-Shigematsu T.: SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature.* 2002; 419: 641-645.
- Zegała M., Wiland E., Kurpisz M.: Topology of chromosomes in somatic cells. Part 1. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* 2006; 60, 331-342.
- Zhao X.D., Ji W.Y., Zhang W., He L.X., Yang J., Liang H.J., Wang L.L.: Overexpression of SATB1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 2010; 72, 1-5.
- Zhou L.Y., Liu F., Tong J., Chen Q.Q., Zhang F.W.: Expression of special AT-rich sequence-binding protein mRNA and its clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2009; 29, 534-537.

8. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

	Ilość	IF	MNiSW
Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych	6	5.871	47
Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych	38	49.419	516
Łącznie	44	55.290	563

	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Całkowita liczba cytowań	255	287	360
Indeks H	8	9	10

