

AUTOREFERAT

dr n. med. Magdalena Izdebska

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. Magdalena Izdebska
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Karłowicza 24
85-092 Bydgoszcz
tel.: (52) 585-37-33
fax: (52) 585-37-34
tel. kom.: 509-766-223
e-mail: mizdebska@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 2018

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/ARTYSTYCZNYCH3	
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1331)	4
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA	5
4.3.1. ISTNIEJĄCY STAN WIEDZY W ZAKRESIE TEMATU BADAŃ	5
4.3.2. PUBLIKACJA NR 1: ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF F-ACTIN USING PHALLOIDIN AND QUANTUM DOTS IN HL-60 PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE AFTER CELL DEATH INDUCTION BY ARSENIC TRIOXIDE. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA D., GRZANKA A.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115(5), 487-495.	11
4.3.3. PUBLIKACJA NR 2: ACTIN IS REQUIRED FOR CELLULAR DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115(8), 775-782.	12
4.3.4. PUBLIKACJA NR 3: 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(6), 1441-1450.	13
4.3.5. PUBLIKACJA NR 4: THE ROLE OF EXPORTIN 6 IN CYTOSKELETAL-MEDIATED CELL DEATH AND CELL ADHESION IN HUMAN NON-SMALL-CELL LUNG CARCINOMA CELLS FOLLOWING DOXORUBICIN TREATMENT. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA D., HAŁAS M., GRZANKA A.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2014; 52(3), 195-205.	14
4.3.6. PUBLIKACJA NR 5: DOWNREGULATION OF IMPORTIN-9 PROTECTS MCF-7 CELLS AGAINST APOPTOSIS INDUCED BY THE COMBINATION OF GARLIC-DERIVED ALLIIN AND PACLITAXEL. IZDEBSKA M., GRZANKA D., GAGAT M., HAŁAS-WIŚNIEWSKA M., GRZANKA A.: ONCOL. REP. 2016; 35(5), 3084-3093. ...	15
4.3.7. PUBLIKACJA NR 6: OVEREXPRESSION OF LAMIN B1 INDUCES MITOTIC CATASTROPHE IN COLON CANCER LOVO CELLS AND IS ASSOCIATED WITH WORSE CLINICAL OUTCOMES. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA A.: INT. J. ONCOL. 2018; 52(1), 89-102.	16
4.3.8. PODSUMOWANIE	17
4.3.9. PIŚMIENNICTWO	18
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	21
5.1. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA	21
5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA.....	24
5.3. PLANY BADAWCZE NA PRZYSZŁOŚĆ	27
5.4. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO	28

1. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Izdebska

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

2011	<p>Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu</p> <p>Tytuł rozprawy doktorskiej: „<i>Wpływ filgrastimu i trójtlenku arsenu na jądrową i cytoplazmatyczną organizację szkieletu aktywnego w liniach białaczek ludzkich HL-60 i K-562</i>”</p> <p>Promotor: prof. dr hab. Alina Grzanka</p>
2004	<p>Dyplom magistra biologii Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu</p> <p>Tytuł pracy magisterskiej: „Subkomórkowa lokalizacja Ca²⁺ w niezapylnym słupku <i>Haemanthus albiflos</i> L.”</p> <p>Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz</p>
2004	<p>Dyplom uzyskania kwalifikacji pedagogicznych Dyplom ukończenia dwuletniego Studium Pedagogicznego Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu</p>

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

2012 – obecnie	Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; adiunkt
2004 – 2012	Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; asystent

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1331)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

„Wykazanie zależności pomiędzy jądrową lokalizacją F-aktyny a procesem śmierci komórek nowotworowych” na podstawie cyklu 6 wybranych publikacji (IF = 12.713; MNiSW = 110)

4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wartość IF wg JCR i punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, z wyjątkiem artykułów wydanych w roku 2017 i 2018, dla których przyjęto IF i punktację MNiSW, jak w roku 2016.

1. **Izdebska M.**, Gagat M., Grzanka D., Grzanka A.: Ultrastructural localization of F-actin using phalloidin and quantum dots in HL-60 promyelocytic leukemia cell line after cell death induction by arsenic trioxide. Acta Histochem. 2013; 115(5), 487-495.

IF = 1.760; MNiSW = 15.000

2. Grzanka D., Gagat M., **Izdebska M.**: Actin is required for cellular death. Acta Histochem. 2013; 115(8), 775-782.

IF = 1.760; MNiSW = 15.000

3. 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(6), 1441-1450.

IF = 2.088; MNiSW = 20.000.

4. **Izdebska M.**, Gagat M., Grzanka D., Hałas M., Grzanka A.: The role of exportin 6 in cytoskeletal-mediated cell death and cell adhesion in human non-small-cell lung carcinoma cells following doxorubicin treatment. Folia Histochem. Cytobiol. 2014; 52(3), 195-205.

IF = 1.364; MNiSW = 15.000

5. **Izdebska M.**, Grzanka D., Gagat M., Hałas-Wiśniewska M., Grzanka A.: Downregulation of importin-9 protects MCF-7 cells against apoptosis induced by the combination of Garlic-derived alliin and paclitaxel. *Oncol. Rep.* 2016; 35(5), 3084-3093.

IF = 2.662; MNiSW = 20.000

6. **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(1), 89-102.

IF = 3.079; MNiSW = 25.000

Sumaryczny IF osiągnięcia = 12.713

Liczba punktów MNiSW = 110

- *określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie wyżej wymienionych prac znajduje się w Załączniku nr 3*
- *oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w Załączniku nr 4*
- *kopie powyższych prac znajdują się z Załączniku nr 5*

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

4.3.1. ISTNIEJĄCY STAN WIEDZY W ZAKRESIE TEMATU BADAŃ

Aktyna, jedno z głównych białek tworzących strukturę cytoszkieletu, została wyizolowana z komórek mięśniowych już w 1887 roku przez W.D. Halliburtona (Perry, 2003). Od lat 70-tych XX wieku wiadomo jednak, że występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych w dwóch formach: globularnej (monomerycznej), jako G-aktyna oraz fibrylarnej tworzącej strukturę F-aktyny, określanej również mianem mikrofilamentów (Hightower i Meagher, 1986). Ciągła polimeryzacja i depolimeryzacja warunkują dynamiczną naturę cytoszkieletu aktynowego, który jest kluczowy dla wielu procesów zachodzących na terenie komórki. Szkielet aktynowy bierze udział m.in. w ruchu komórek oraz reguluje ich kurczliwość i przyleganie do

podłoża. Uczestniczy również w cytokinezie, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz w przekazywaniu sygnałów wewnątrz komórki. Ponadto wiele doniesień naukowych wskazuje na udział aktyny w różnicowaniu, śmierci, transformacji nowotworowej, a także w regulacji transkrypcji i ekspresji genów (Chhabra i Higgs, 2007; Carlier i Pantaloni, 2007; Xu i wsp., 2010). Rozmieszczenie filamentów aktynowych w komórce jest zależne od jej typu oraz stanu fizjologicznego. Mikrofilamenty mogą tworzyć zorganizowane, równoległe wiązki, zwane włóknami napięciowymi lub stresowymi występującymi głównie w komórkach adherentnych, a także krótkie włókna F-aktyny zlokalizowane w części korowej komórki. Luźne pęczki filamentów aktynowych budują również mikrokosmki oraz lamellipodia i filopodia (Kabsch i Vandekerckhove, 1992; Grzanka i wsp., 2003).

Mikrofilamenty uznawane są za struktury cytoplazmatyczne, a ich występowanie na terenie jądra komórkowego wciąż budzi liczne kontrowersje (Migocka-Patrzalek i Malicka-Błaszkiwicz, 2009). Po raz pierwszy aktynę jądrową opisali Clark i Merriam w 1978 roku w wyizolowanych jądrach komórkowych oocytów *Xenopus laevis*. Wyniki tej pracy były często kwestionowane, ponieważ zarzucano naukowcom zanieczyszczenie frakcji jądrowej przez pulę aktyny cytoplazmatycznej (Clark i Merriam, 1978). Niektóre grupy naukowe przyjęły obecność aktyny na terenie jądra po ukazaniu się prac przedstawiających pomiar tego białka metodą spektrofotometryczną (Jockusch i wsp., 2006; McDonald i wsp., 2006). Inni natomiast wskazywali na zbyt duże rozmiary mikrofilamentów (3-5 μm), aby mogły zmieścić się w jądrze komórkowym. Sygnalizowali także negatywny wynik znakowania F-aktyny falloidyną (Bettinger i wsp., 2004; Pederson i Aebi, 2002). Niewykluczone jednak, że jądrowa F-aktyna występuje w formie krótszych polimerów, a miejsca wiązania z falloidyną mogą być „maskowane” przez białka wiążące aktynę (ABP, *ang. actin bindings proteins*), np. kofilinę, która tworzy jądrowy kompleks z aktyną. Mimo powyższych argumentów, jądrowa lokalizacja F-aktyny z użyciem falloidyny skoniugowanej z Alexa Fluor 488 okazała się możliwa. W pracach Izdebska i wsp. oraz Grzanka i wsp. zaprezentowano zmiany w intensywności fluorescencji F-aktyny w wyizolowanych jądrach komórek linii nowotworowych (HL-60 i K-562) oraz

fibroblastach chomika chińskiego (CHO AA8) pod wpływem działania czynników indukujących apoptozę oraz katastrofę mitotyczną (Izdebska i wsp., 2009a,b; Grzanka i wsp., 2010a,b; 2011). Po indukcji śmierci, F-aktyna lokalizowana była w miejscach słabo zabarwionych DAPI (barwnik fluorescencyjny interkalujący pomiędzy zasady DNA), prawdopodobnie w obszarach aktywnych transkrypcyjnie (Izdebska i wsp., 2009a,b; Grzanka i wsp., 2010a,b; 2011). Przyniesione powyżej wyniki badań zostały potwierdzone i uzupełnione o nowe informacje, dzięki opracowanej przez nasz zespół metodzie umożliwiającej znakowanie filamentów aktynowych na poziomie ultrastrukturalnym. Lokalizowana z udziałem nanocząsteczek F-aktyna obserwowana była w pobliżu elektronowo gęstej heterochromatyny, co może świadczyć o jej udziale w kompleksie remodelującym tą strukturę (Izdebska i wsp., 2013).

Źródłem jądrowej aktyny jest cytoplazmatyczna G-aktyna, która dyfunduje przez pory jądrowe. Sama aktyna nie zawiera sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS, *ang. nuclear localization sequence*), więc aby przemieszczać się w obrębie tych dwóch przedziałów komórkowych musi stworzyć kompleks z białkiem, które tą sekwencję posiada. Jednym z nich jest wspomniana kofilina, która będąc przede wszystkim regulatorem dynamiki filamentów aktynowych posiada również zdolność importowania kompleksu ADP-aktyna do jądra komórkowego w odpowiedzi na czynniki stresowe (Pendleton i wsp., 2003). W 2012 roku Dopie i wsp. wskazali nowy czynnik importujący aktynę, którym okazała się importyna 9 (IPO9). Co więcej, wspomniani naukowcy dowiedli, że utrzymanie odpowiedniego poziomu aktyny jądrowej dzięki IPO9 jest niezbędne do zachowania wysokiej aktywności transkrypcyjnej komórek (Dopie i wsp., 2012). Wydaje się, że aktyna wykorzystuje również aktywny mechanizm transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy za pomocą co najmniej dwóch różnych ścieżek. Pierwszą z nich, dzięki posiadanym przez aktynę dwóm klasycznym, bogatym w leucynę sekwencjom sygnału eksportu jądrowego (NES, *ang. nuclear export sequence*), jest translokacja opisywanego białka poprzez receptor eksportyny 1 (Crm1). Drugi szlak związany jest z eksportyną

6 (Exp6), jednakże w tym przypadku wymagane jest stworzenie aktywnego kompleksu profilina-aktyna (Stüven i wsp., 2003).

Kontrolowana obecność aktyny na terenie jądra komórkowego sugeruje, że przynajmniej niektóre jej funkcje są związane z organizacją genomu. Oprócz strukturalnej roli aktyny w macierzy jądrowej, uważa się ją za ważny czynnik w wielu procesach zachodzących na terenie jądra komórkowego, zaczynając od przebudowy chromatyny aż po splicing RNA. Stanowi ona również istotny element kompleksu remodelującego chromatynę. Wiąże się m.in. z czynnikami transkrypcji i nowo zsyntetyzowanymi rybonukleoproteinami (Visa i Percipalle, 2010). Dodatkowo wskazuje się na istotną rolę aktyny w regulacji wszystkich trzech eukariotycznych polimeraz RNA (Obrdlík i Percipalle, 2011).

Ważnym elementem macierzy jądrowej jest również białko SATB1 (*ang. Special AT-rich sequence-binding protein 1*), które wiąże się z bogatymi w adeninę i tyminę regionami dwuniciowego DNA i tworzy trójwymiarową strukturę („klatkę”), kotwicząc do niej chromatynę. Ponadto jest białkiem rekrutującym enzymy modyfikujące histony, regulując tym samym transkrypcję wybranych genów. Dodatkowo SATB1 ma wpływ na fałdowanie i remodeling chromatyny oraz stanowi funkcjonalny kompleks z jądrową F-aktyną (Dickinson i wsp., 1992; Yasui i wsp., 2002; Grzanka i wsp., 2014).

Zależności pomiędzy elementami strukturalnymi jądra i cytoplazmy umożliwiają właściwą reakcję komórki na zmienne warunki, zarówno te wewnętrzne jak i zewnętrzne. Z kolei utrzymanie równowagi pomiędzy pulą jądrowej i cytoplazmatycznej aktyny wydaje się być niezmiernie istotne w regulacji wielu procesów na poziomie komórki zachodzących zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych (Percipalle i Visa, 2006). Szczególnie ważny, z medycznego punktu widzenia, wydaje się być udział cytoszkieletu aktynowego w indukcji śmierci komórek nowotworowych (Giganti i Friederich, 2003).

Od wielu lat proces śmierci na poziomie komórkowym jest wiodącym tematem badawczym licznych ośrodków naukowych. Stąd też prezentowane są doniesienia wskazujące na istnienie wielu typów śmierci komórki. W warunkach fizjologicznych

programowana śmierć komórek zwana apoptozą umożliwia prawidłowy rozwój w okresie embrionalnym oraz utrzymanie homeostazy organizmu w dalszych etapach życia. Zaburzenia we wspomnianej równowadze są przyczyną wielu chorób m.in. neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych oraz nowotworowych. Stąd poznawanie mechanizmów leżących u podstaw tego procesu umożliwia manipulację jego przebiegiem w celach terapeutycznych. Z każdym rokiem naukowcy zajmujący się zjawiskiem śmierci na poziomie komórkowym wskazują na jej nowe typy, które wyznaczone są już nie tylko na podstawie rodzaju komórki, indukującego je czynnika czy zmian morfologicznych, ale również w oparciu o zaawansowane wyznaczniki biochemiczne i molekularne (Galluzzi i wsp., 2012, 2015; Kroemer i wsp., 2009).

W 2012 roku zgodnie z zaleceniami Komitetu ds. Nazewnictwa Śmierci Komórek (NCCD) dokonana została funkcjonalna klasyfikacja śmierci, która obejmuje: anoikis, autofagię, ścieżkę zewnętrzną i wewnętrzną apoptozy (zależna i niezależna od kaspaz), entozę, katastrofę mitotyczną, rogowacenie, nekroptozę, netozę, *parthanatos* i pyroptozę (Galluzzi i wsp., 2012). W 2015 roku klasyfikacja przedstawiona przez NCCD została rozszerzona. Ze względu na fakt nieuchronnej i natychmiastowej śmierci komórek wystawionych na ekstremalne bodźce fizykochemiczne lub mechaniczne opisany został typ śmierci określany jako „Przypadkowa śmierć komórki” (ACD). Z drugiej jednak strony, w większości przypadków, śmierć komórkowa jest inicjowana przez genetycznie zakodowany system, którego przebieg może być farmakologicznie zmieniony. Stąd „Regulowana śmierć komórki” (RCD) może występować jako część programów fizjologicznych (programowana śmierć komórki) lub jest aktywowana po niepowodzeniach adaptacyjnych. Biorąc pod uwagę morfologiczne aspekty śmierci wyróżnia się trzy główne typy: apoptozę, autofagię i nekrozę, które zaliczane są zarówno do ACD, jak i RCD. Usystematyzowanie nazewnictwa dotyczącego śmierci komórek oraz zakwalifikowanie ich pod względem morfologicznym, biochemicznym i molekularnym do różnych jej typów jest niezmiernie istotne, ponieważ poznanie mechanizmów ich działania umożliwia skuteczną regulację w celach terapeutycznych (Kroemer i wsp., 2009; Galluzzi i wsp., 2015). Ważne jest również zaangażowanie

organelli w przebieg śmierci komórek. Jak wynika z badań, jedną z takich struktur jest cytoszkielet aktynowy, który nie tylko bierze udział w tworzeniu pączków apoptotycznych, ale również uczestniczy w procesach zachodzących na terenie jądra komórkowego (Giganti i Friederich, 2003; Croft i wsp., 2005; Grzanka i wsp., 2003).

W związku z wciąż toczącą się, aktualną dyskusją na temat funkcji aktyny jądrowej, przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe opiera się na badaniach określających nie tylko jądrową lokalizację F-aktyny w wybranych komórkach nowotworowych, ale również uwzględnia jej funkcje w tym przedziale komórkowym. Osiągnięcie to stanowi cykl 6 publikacji naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, które uwzględniają:

- 1) Wykazanie obecności jądrowej F-aktyny zlokalizowanej w pobliżu heterochromatyny i w okolicach otoczki jądrowej.
- 2) Wskazanie istotności jądrowej lokalizacji aktyny w procesach śmierci komórkowej oraz dalszych kierunków badań, uwzględniających funkcjonalną ocenę interakcji F-aktyny z białkami macierzy jądrowej oraz skutków wynikających z manipulacji ekspresją jądrowej F-aktyny poprzez białka ją transportujące.
- 3) Zaobserwowanie obecności funkcjonalnego kompleksu F-aktyna/SATB1 w komórkach umierających na drodze aktywnej śmierci.
- 4) Pokazanie wpływu obniżonej ekspresji eksportyny 6 na indukowany rodzaj śmierci komórek.
- 5) Wykazanie wpływu obniżonej ekspresji importyny 9 na indukcję śmierci komórek oraz wskazanie, że bez importyny 9, kofilina-1 nie jest zdolna do efektywnego transportu aktyny do jądra komórkowego.
- 6) Wykazanie, że podwyższona ekspresja laminy B1 prowadzi do indukcji śmierci na drodze katastrofy mitotycznej, która może być związana z opornością na leczenie i związana jest gorszym rokowaniem dla pacjentów.

4.3.2. PUBLIKACJA NR 1: ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF F-ACTIN USING PHALLOIDIN AND QUANTUM DOTS IN HL-60 PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE AFTER CELL DEATH INDUCTION BY ARSENIC TRIOXIDE. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA D., GRZANKA A.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115(5), 487-495.

Celem niniejszej pracy było wykazanie wpływu trójtlenku arsenu na komórki białaczki ludzkiej linii HL-60 oraz określenie organizacji filamentów aktynowych podczas indukowanej śmierci na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wcześniejsze badania naszego zespołu prezentowały obecność jądrowej F-aktyny z użyciem znakowanej fluorochromem falloidyny na poziomie mikroskopu konfokalnego, a także wykazały zmiany intensywności fluorescencji filamentów aktynowych w wyizolowanych jądrach komórek z indukowaną śmiercią (Grzanka i wsp., 2003, 2004; Izdebska i wsp., 2009a,b). Jednakże rozdzielczość mikroskopów świetlnych nie pozwalała na dokładną ocenę umiejscowienia jądrowej F-aktyny oraz na wskazanie ewentualnego powiązania jej funkcji z lokalizacją. W prezentowanej pracy, stanowiącej również metodyczne ujęcie problemu, opisana została, opracowana przez nasz zespół, technika lokalizacji filamentów aktynowych z udziałem falloidyny i nanokryształów półprzewodnikowych (QDs, *ang. quantum dots*) na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Metoda ta opiera się na połączeniu technik przed i po zatopieniu. Przed zatopieniem materiału w żywicy akrylowej LR-White komórki inkubowano z biotynylowaną falloidyną, natomiast po zatopieniu i pocięciu na ultracienkie skrawki falloidynę związaną z F-aktyną znakowano kropkami kwantowymi uprzednio skoniugowanymi ze streptawidyną. Badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały indukowaną trójtlenkiem arsenu (ATO, *ang. arsenic trioxide*) apoptozę komórek linii HL-60 oraz znaczne różnice w rozmieszczeniu filamentów aktynowych na poziomie ultrastrukturalnym. Po 24-godzinnej inkubacji komórek z trójtlenkiem arsenu (0,6 i 1,2 $\mu\text{g/ml}$) obserwowano liczne, elektronowo gęste QD w postaci agregatów zlokalizowanych w pobliżu heterochromatyny i w okolicach otoczki jądrowej. Stąd, rozmieszczenie znakowanej

kropkami kwantowymi jądrowej F-aktyny z jednej strony sugeruje o jej zaangażowaniu w organizację chromatyny, z drugiej zaś świadczy o jej imporcie przez otoczkę jądrową. Ponadto niniejsze badania pozwoliły na porównanie dwóch technik znakowania F-aktyny z użyciem TEM. Pierwszą z nich była stosowana dotychczas metoda polegająca na użyciu streptawidyny skoniugowanej ze złotem koloidalnym (AU), natomiast druga to opisana w pracy technika z nanocząsteczkami.

Podsumowując, w powyższej pracy zaprezentowaliśmy nie tylko wysokorozdzielczą technikę detekcji F-aktyny, ale również zasugerowaliśmy jej potencjalną rolę w procesach jądrowych, m.in. jej zaangażowanie w reorganizację chromatyny podczas apoptozy. Dodatkowo przedstawiono ograniczenia w detekcji znakowanej falloidyną F-aktyny przy użyciu złota koloidalnego.

4.3.3. PUBLIKACJA NR 2: ACTIN IS REQUIRED FOR CELLULAR DEATH. GRZANKA D., GAGAT M., IZDEBSKA M.: ACTA HISTOCHEM. 2013; 115(8), 775-782.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie dotychczasowego stanu wiedzy na temat udziału filamentów aktynowych w procesach zachodzących na terenie komórki ze szczególnym uwzględnieniem śmierci. Pracę oparto również na badaniach naszego zespołu, konfrontując je z doniesieniami innych grup badawczych. W przedstawionej publikacji uwzględniono podstawowe informacje na temat aktyny oraz krytykowanej przez wiele lat jej jądrowej formy. Zaprezentowano również rolę opisywanego białka w aktywnej śmierci komórkowej. Jednakże zasadniczą część pracy stanowiły informacje na temat zaangażowania F-aktyny w procesy zachodzące na terenie jądra komórkowego, ze względu na zaobserwowaną wcześniej jej lokalizację w pobliżu heterochromatyny. Przedstawiono również dalszy kierunek prac naszego zespołu uwzględniający funkcjonalną ocenę interakcji filamentów aktynowych z białkami macierzy jądrowej oraz skutków wynikających z manipulacji obecnością aktyny na terenie jądra komórkowego za pomocą białek transportujących aktynę.

4.3.4. PUBLIKACJA NR 3: 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(6), 1441-1450.

Opierając się na udowodnionej uprzednio obecności spolimeryzowanej formy aktyny na terenie jądra komórkowego podczas indukcji śmierci, celem tej pracy było wykazanie i określenie wspólnej roli jądrowej F-aktyny i SATB1 w powiązaniu z procesami aktywnej śmierci. Prezentowane badania opierają się na wcześniejszej obserwacji kolokalizacji obu białek. Po inkubacji komórek CHO AA8 z cytotastykiem potwierdziliśmy obecność F-aktyny na terenie jądra komórkowego, co i w tym przypadku mogło świadczyć o jej udziale w remodelingu chromatyny i procesie transkrypcji. Ponadto obserwowaliśmy kolokalizację białka SATB1 i polimerów aktyny w miejscach wyznakowanych 5-FUrd (5'-Fluorourydą), czyli aktywnych transkrypcyjnie rejonach chromatyny. Dodatkowo opisana w publikacji nr 1 metoda znakowania jądrowej F-aktyny na poziomie ultrastrukturalnym umożliwiła uwidocznienie kolokalizacji SATB1/F-aktyna na granicy skondensowanej i zdekondensowanej chromatyny. Uzyskane na tym etapie doświadczeń wyniki potwierdziły, nie tylko prezentowany wcześniej, udział białka SATB1 w równoczesnej transkrypcji wielu genów, ale również wskazywały na możliwość istnienia funkcjonalnego kompleksu SATB1/F-aktyna w obszarze jąder umierających komórek. Za pomocą techniki FRET po wyświeceniu akceptora zaobserwowaliśmy wzrost wydajności transferu energii z 0.29% w komórkach kontrolnych do 8.81% po traktowaniu doksorubicyną, co świadczyło o konieczności powstania opisywanego kompleksu podczas śmierci komórkowej. Obecność tej struktury potwierdzono również opracowaną przez nasz zespół techniką precypitacji kompleksów F-aktyna/białko opartą o separację magnetyczną.

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej wyniki pracy potwierdziliśmy nasze wcześniejsze sugestie dotyczące funkcjonalnego udziału jądrowej F-aktyny i białka SATB1 w reorganizacji chromatyny i transkrypcji genów podczas aktywnej śmierci komórek.

4.3.5. PUBLIKACJA NR 4: THE ROLE OF EXPORTIN 6 IN CYTOSKELETAL-MEDIATED CELL DEATH AND CELL ADHESION IN HUMAN NON-SMALL-CELL LUNG CARCINOMA CELLS FOLLOWING DOXORUBICIN TREATMENT. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA D., HAŁAS M., GRZANKA A.: FOLIA HISTOCHEM. CYTOBIOL. 2014; 52(3), 195-205.

Wcześniejsze badania naszego zespołu wskazywały, że obniżenie ekspresji kofiliny-1 na poziomie białkowym znacznie zmieniło dynamikę aktyny, a co więcej wpłynęło również na typ śmierci jaki wywoływał cytostatyk (Grzanka i wsp., 2010b; 2011). Skłoniło nas to do dalszych poszukiwań zaangażowania filamentów aktynowych w procesy indukowanej śmierci komórek. Obserwowaliśmy już, że brak aktyny na terenie jądra komórkowego uniemożliwia indukcję apoptozy. Stąd, zakładając, że obniżenie poziomu białka, które zaangażowane jest w eksport aktyny z obszaru jądra komórkowego do cytoplazmy powinno prowadzić do wzrostu odsetka komórek ulegających śmierci, postanowiliśmy ocenić wpływ obniżenia poziomu eksportyny 6 na wrażliwość komórek nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuca linii H1299 traktowanych doksorubicyną. Wykazaliśmy, że wyciszenie ekspresji eksportyny 6 zmienia odpowiedź komórek linii H1299 na działanie cytostatyku i promuje zależną od zastosowanej dawki nekrozę. Ponadto fluorescencyjne znakowanie F-aktyny ujawniło zmiany w jej organizacji, co wiązało się również z zaburzeniami w adhezji komórek. W komórkach kontrolnych (transfekowanych kontrolnym siRNA), pomimo traktowania cytostatykiem, zachowany został kontakt między komórkami. Jednakże po obniżeniu ekspresji eksportyny 6, następowała depolimeryzacja F-aktyny, co wiązało się z utratą połączeń międzykomórkowych. Obserwowano również niższą aktywność transkrypcyjną komórek z obniżoną ekspresją eksportyny 6.

Podsumowując, wszystkie powyższe wyniki wskazują na zaangażowanie F-aktyny w wiele procesów komórkowych. Dowiedliśmy, że ograniczenie eksportu aktyny z jądra komórkowego, w tym przypadku nie indukowało spodziewanej apoptotycznej drogi śmierci, a nekrozę. Sugeruje to nieco bardziej złożony mechanizm i wskazuje na fakt, że odpowiednia proporcja pomiędzy jądrową

i cytoplazmatyczną pulą F-aktyny jest niezwykle istotna w zachowaniu homeostazy komórkowej.

4.3.6. PUBLIKACJA NR 5: DOWNREGULATION OF IMPORTIN-9 PROTECTS MCF-7 CELLS AGAINST APOPTOSIS INDUCED BY THE COMBINATION OF GARLIC-DERIVED ALLIIN AND PACLITAXEL. IZDEBSKA M., GRZANKA D., GAGAT M., HAŁAS-WIŚNIEWSKA M., GRZANKA A.: ONCOL. REP. 2016; 35(5), 3084-3093.

Opisywane powyżej wyniki badań pokazały i potwierdziły nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące wpływu zaburzonej równowagi pomiędzy pulą jądrową a cytoplazmatyczną aktyny na odpowiedź komórek nowotworowych na cytostatyki. Z drugiej jednak strony, rodzaj indukowanej doksorubicyną śmierci komórek był dla nas zaskakujący i świadczył o bardziej złożonym mechanizmie niż sugerowaliśmy pierwotnie. Stąd głównym celem kolejnej pracy było określenie wpływu importu aktyny do jądra komórkowego. Opierając się na wynikach uzyskanych podczas realizacji tej pracy chcieliśmy również określić uniwersalność mechanizmu indukcji, zależnej od lokalizacji F-aktyny, śmierci na poziomie komórkowym. Wskazać również możliwość zastosowania terapii skojarzonej polegającej na połączeniu związku pochodzenia naturalnego z cytostatykiem oraz odpowiedzieć na pytanie czy sama kofilina-1 (CFL1) może być odpowiedzialna za udział jądrowej F-aktyny w procesie apoptozy. Cel pracy zrealizowano poprzez obniżenie poziomu białka importującego aktynę - importyny 9 (IPO9) w komórkach nieagresywnego raka sutka linii MCF-7 z indukowaną śmiercią. W tym przypadku komórki traktowano alliiną i paklitakselem, a wyboru dokonano na podstawie obserwacji znacznego wzrostu odsetka komórek ulegających apoptozie po traktowaniu kombinacją powyższych związków. Zgodnie z naszymi wcześniejszymi doniesieniami zahamowanie importu aktyny do jądra komórkowego istotnie ograniczyło indukcję apoptozy w odpowiedzi na alliinę, paklitaksel oraz kombinację tych związków. Badania wykazały również znaczne obniżenie fluorescencji F-aktyny zarówno w części korowej komórek, jak i w jądrach komórkowych. Ponadto obniżeniu importyny 9 towarzyszyła zwiększona

potranslacyjna ekspresja kofiliny-1, co wraz z naszymi wcześniejszymi badaniami sugeruje, że białko to nie jest zdolne do samodzielnego przemieszczenia aktyny do jądra komórkowego.

Podsumowując, przedstawione w pracy wyniki pokazały, że allina i PTX działają synergistycznie indukując apoptozę w komórkach MCF-7. Dodatkowo związek pochodzenia naturalnego nasila cytotoksyczne działanie tradycyjnych leków cytostatycznych, umożliwiając obniżenie ich dawki przy uzyskaniu takich samych wyników terapeutycznych. Potwierdziliśmy również nasze poprzednie doniesienia, o udziale aktyny jądrowej w procesie indukcji apoptozy i wykazaliśmy, że transport aktyny do jądra komórkowego wymaga funkcjonalnej ekspresji importyny 9.

4.3.7. PUBLIKACJA NR 6: OVEREXPRESSION OF LAMIN B1 INDUCES MITOTIC CATASTROPHE IN COLON CANCER LOVO CELLS AND IS ASSOCIATED WITH WORSE CLINICAL OUTCOMES. IZDEBSKA M., GAGAT M., GRZANKA A.: INT. J. ONCOL. 2018; 52(1), 89-102.

Zaobserwowane w powyżej opisanych pracach zależności pomiędzy rodzajem indukowanej śmierci a lokalizacją F-aktyny, skłoniły nas do podjęcia dalszych badań uwzględniających białka nukleoszkieletu. Było to niezwykle istotne z punktu widzenia udowodnionych zdolności interakcyjnych pomiędzy laminami a aktyną oraz doniesieniami o zmniejszonej ekspresji laminy B1 (LMNB1) np. w raku jelita grubego (Sakthivel i Sehgal, 2016; Butin-Israelii wsp., 2012; Li i wsp., 2013). Tak więc, celem niniejszej publikacji było wyjaśnienie wpływu ekspresji laminy B1 na indukowaną 5-fluorouracylem (5-FU) śmierć komórek raka okrężnicy linii LoVo. Wykazaliśmy, że w komórkach ze wzbudzoną nadekspresją laminy B1, 5-FU indukował przede wszystkim katastrofę mitotyczną. Ponadto zaobserwowaliśmy, że podwyższenie poziomu laminy B1 prowadziło do obniżenia intensywności fluorescencji laminy A/C oraz zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego i mikrotubul. Badania ujęte w niniejszej pracy potwierdziły również zależne od nadekspresji laminy B1 ograniczenie migracji komórek oraz wzrost intensywności fluorescencji

połączeniowej β -kateniny, co może sugerować o utracie inwazyjnego fenotypu komórek. Jednakże, na podstawie analizy danych przeżyciowych z The Cancer Genome Atlas wykazaliśmy, iż pacjenci z nadekspresją LMNB1 charakteryzują się niższym wskaźnikiem przeżycia w ciągu pierwszych 30 miesięcy od rozpoznania choroby, co z kolei wskazuje na możliwy udział katastrofy mitotycznej w progresji nowotworu.

Podsumowując, 5-FU w komórkach raka okrężnicy z nadekspresją laminy B1 indukuje przede wszystkim śmierć na drodze katastrofy mitotycznej. Ponadto podwyższenie ekspresji LMNB1 prowadzi do zahamowania migracji komórek oraz wzmożonego kontaktu pomiędzy nimi. Jednakże na podstawie zestawienia powyższych wyników z danymi z TCGA to komórki z cechami katastrofy mitotycznej mogą być odpowiedzialne za szybką progresję nowotworu, stanowiąc „rezerwuar” opornych na cytostatyki komórek, które są zdolne do naprawy uszkodzonego DNA i powrotu do normalnego cyklu komórkowego.

4.3.8. PODSUMOWANIE

Przedstawione osiągnięcie naukowe pt. „Wykazanie zależności pomiędzy jądrową lokalizacją F-aktyny a procesem śmierci komórek nowotworowych” składa się z 6 wybranych publikacji naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 12.713 i 110 punktów MNiSW.

Badania ujęte w pierwszej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego przedstawiają opracowaną przez nasz zespół metodę detekcji F-aktyny na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Technika ta pozwoliła na wykazanie obecności jądrowej F-aktyny w pobliżu heterochromatyny i na sugestię o jej zaangażowaniu w reorganizację chromatyny podczas apoptotycznej śmierci komórek linii HL-60 indukowanej trójtlenkiem arsenu. Ponadto F-aktyna widoczna była po obu stronach otoczki jądrowej, co wskazuje na jej transport w kierunku jądra komórkowego. Kolejne prace potwierdzały nasze wcześniejsze sugestie dotyczące zaangażowania jądrowej F-aktyny w proces apoptozy oraz wskazały na istnienie funkcjonalnego kompleksu F-aktyna/SATB1 uczestniczącego w reorganizacji

chromatyny i transkrypcji genów podczas aktywnej śmierci komórek. Dalsze badania wykazały, że mimo zablokowania transportu aktyny z jądra komórkowego do cytoplazmy poprzez obniżenie ekspresji eksportyny 6, to nekroza była głównym szlakiem śmierci komórkowej indukowanej doksorubicyną. Z kolei po obniżeniu ekspresji importyny 9 znacznie zmalał odsetek komórek apoptotycznych w komórkach linii MCF-7, co potwierdziło nasze poprzednie doniesienia, o udziale aktyny jądrowej w indukcji tego rodzaju śmierci. Dodatkowo dowiedliśmy że transport aktyny do jądra komórkowego w komórkach z obniżoną ekspresją importyny 9 jest niemożliwy, a sama kofilina-1 nie jest w stanie samodzielnie przemieszczać aktynę do jądra komórkowego. Zaobserwowane w powyżej opisanych pracach zależności pomiędzy rodzajem indukowanej śmierci a lokalizacją F-aktyny oraz możliwości wynikające z manipulacji białkami transportującymi aktynę skłoniły nas do określenia zależności pomiędzy aktyną a białkami otoczki jądrowej w komórkach raka okrężnicy linii LoVo. W tym przypadku w komórkach z nadekspresją laminy B1, 5-fluorouracyl indukował przede wszystkim śmierć na drodze katastrofy mitotycznej oraz prowadził do zahamowania migracji komórek i ich wzmożonego kontaktu pomiędzy sobą. Jednakże analizy danych przeżyciowych pacjentów z rakiem okrężnicy wykazały niższy wskaźnik przeżycia w ciągu pierwszych 30 miesięcy od rozpoznania choroby u pacjentów ze wzmożoną ekspresją LMNB1. Biorąc od uwagę powyższe wyniki naszych badań wskazaliśmy że katastrofa mitotyczna może być sposobem przetrwania komórek raka okrężnicy i gorszego rokowania dla pacjentów.

4.3.9. PIŚMIENICTWO

Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 2004; 5: 410-415.

Butin-Israeli V, Adam SA, Goldman AE, Goldman RD. Nuclear lamin functions and disease. *Trends Genet.* 2012; 28: 464-471.

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

Chhabra ES, Higgs HN. The many face of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 1110-1121.

Clark TG, Merriam RW. Actin in *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 1978; 77: 427-438.

Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J. Cell Biol.* 2005; 168: 245-255.

Dickinson LA, 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.

Dopie J, Skarp KP, Rajakylä EK, Tanhuanpää K, Vartiainen MK. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2012; 109: E544-552.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Muñoz-Pinedo C, Nuñez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, 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 JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, 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 A, Grzanka D, Orlikowska M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66: 1611-1617.

Grzanka A, Grzanka D, Orlikowska M. Fluorescence and ultrastructural localization of actin distribution patterns in the nucleus of HL-60 and K-562 cell lines treated with cytostatic drugs. *Oncol. Rep.* 2004;11: 765-770.

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.

- Grzanka D, Grzanka A, Izdebska M, Gackowska L, Stepień A, Marszałek A. Actin reorganization in CHO AA8 cells undergoing mitotic catastrophe and apoptosis induced by doxorubicin. *Oncol. Rep.* 2010a; 23: 655-663.
- 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.* 2010b; 48: 377-386.
- Grzanka D, Marszałek A, Izdebska M, Gackowska L, Szczepanski MA, 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.
- Hightower RC, Meagher RB. The molecular evolution of actin. *Genetics.* 1986; 114: 315-332.
- Izdebska M, Gagat M, Grzanka D, Grzanka A. Ultrastructural localization of F-actin using phalloidin and quantum dots in HL-60 promyelocytic leukemia cell line after cell death induction by arsenic trioxide. *Acta Histochem.* 2013; 115: 487-495.
- Izdebska M, Grzanka A, Ostrowski M, Żuryń A, Grzanka D. Effect of arsenic trioxide (Trisenox) on actin organization in K-562 erythroleukemia cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009a; 47: 453-459.
- Izdebska M, Grzanka D, Gackowska L, Żuryń A, Grzanka A. The influence of Trisenox on actin organization in HL-60 cells. *CEJB* 2009b; 4: 351-361.
- Jockusch BM, Schoenenberger CA, Stetefeld J, Aebi U. Tracking down the different forms of nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 391-396.
- Kabsch W, Vandekerckhove J. Structure and function of actin. *Nature* 1992; 347: 95-99.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy 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.
- Li L, Du Y, Kong X, Li Z, Jia Z, Cui J, Gao J, Wang G, Xie K. Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 4651-4661.
- McDonald D, Carrero G, Andrin C, de Vries G, Hendzel MJ. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* 2006; 172: 541-552.
- Migocka-Patrzałek M, Malicka-Błaszkiwicz M: Aktyna w jądrze komórkowym. *Postepy Biochem.* 2009; 55: 232-238.
- Obrdlik A, Percipalle P. The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus* 2011; 2: 72-79.
- Pederson T, Aebi U. Actin in the nucleus: what form and what for? *J. Struct. Biol.* 2002; 140: 3-9.

Pendleton A, Pope B, Weeds A, Koffer A. Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol. Chem.* 2003; 278: 14394-4400.

Percipalle P, Visa N. Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J. Cell Biol.* 2006; 172: 967-971.

Perry SV. When was actin first extracted from muscle?. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2003; 24: 597-599.

Sakthivel KM, Sehgal P. A Novel role of lamins from genetic disease to cancer biomarkers. *Oncol. Rev.* 2016; 10: 309.

Stüven T, Hartmann E, Görlich D. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J* 2003; 22: 5928-5940.

Visa N, Percipalle P. Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: 1-3.

Xu YZ, Thuraisingam T, Morais DA, Rola-Pleszczynski M, Radzioch D. Nuclear translocation of β -actin is involved in transcriptional regulation during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21: 811-820.

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.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką 23 publikacji naukowych (o całkowitym IF = 6.612 i 194 punktach MNiSW) oraz 16 doniesień zjazdowych.

W 2004 roku ukończyłam studia biologiczne, o specjalności biologia molekularna, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu. Pracę magisterską pt. „Subkomórkowa lokalizacja Ca^{2+} w niezapyłonym słupku *Haemanthus albiflos* L” wykonałam w Zakładzie Biologii Komórki pod kierownictwem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz i obroniłam 8 czerwca 2004 roku.

W październiku tego samego roku zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii CM UMK jako asystent. Moje pierwsze badania w których uczestniczyłam dotyczyły udziału F-aktyny w powstawaniu pęcherzyków apoptotycznych w komórkach linii CHO AA8 traktowanych doksorubicyną (Med. Biol.

Sci. 2005, 19(1): 49-54). Dodatkowo w 2005 i 2006 roku byłam współautorką licznych prac poglądowych związanych z tematyką badawczą Katedry, czyli powiązaniem białek cytoszkieletu z procesami zachodzącymi na terenie komórki, skupiając się głównie na różnicowaniu i apoptozie (Kosmos 2005, 54(2-3): 213-220; Postępy Hig. Med. Dośw. 2005, 59: 224-228; Postępy Hig. Med. Dośw. 2005, 59: 334-339; Postępy Hig. Med. Dośw. 2006, 60: 64-70; Postępy Hig. Med. Dośw. 2006, 60: 439-446).

Od 2007 roku krąg moich zainteresowań mocno zawęził się do głównego białka cytoszkieletu, czyli aktyny, która do chwili obecnej pozostaje jednym z podstawowych kierunków moich badań. W tym okresie, uczestniczyłam w realizacji grantu UMK pt. „Wpływ czynników wzrostu G-CSF i GM-CSF na reorganizację aktyny w komórkach linii białaczek ludzkich HL-60 i K-562”, którego byłam wykonawcą. Uzyskane wyniki wskazywały na udział cytoszkieletu aktynowego nie tylko w procesie apoptozy, ale również podczas różnicowania indukowanego czynnikami wzrostu (Folia Histochem. Cytobiol. 2007, 45(3): 191-197). W 2007 roku rozpoczęła się również współpraca z Katedrą Weterynarii Rolniczej, Akademii Rolniczej, obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, która skupiała się głównie na określeniu wpływu stresu cieplnego na rozwój zarodków bydłowych. Dodatkowo zaprezentowaliśmy rolę aptamerów w diagnostyce encefalopatii gąbczastych i greliny w procesie reprodukcji u bydła (Med. Wet. 2007, 63(1): 23-28; Med. Wet. 2007, 63(4): 399-402; Med. Wet. 2007, 63(10): 1159-1162; J. Anim. Feed Sci. 2008, 17: 455-472).

Ważną częścią mojej aktywności naukowej była również współpraca z dr hab. Dariuszem Grzanką z Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej, który otrzymał grant MNiSW nr N N401 224534 pt.: „Ocena organizacji puli aktyny jądrowej i cytoplazmatycznej oraz zmiany ekspresji kofiliny w procesie apoptozy i katastrofy mitotycznej w wybranych liniach komórkowych”, a ja byłam jednym z wykonawców. W toku tych badań wykazano, że obniżenie ekspresji niemięśniowej kofiliny-1 zaburza transport aktyny z cytoplazmy do jądra komórkowego, hamując tym samym apoptotyczne działanie doksorubicyny w komórkach linii CHO AA8 (Folia Histochem. Cytobiol. 2010, 48(3): 377-386; Oncol. Rep. 2010, 23(3): 655-663; Ultrastruct. Pathol. 2011, 35(3): 130-138).

W latach 2007-2011 zajmowałam się również realizacją badań statutowych Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii, których wyniki zostały przedstawione w oryginalnych pracach naukowych opisujących wpływ trójtlenku arsenu na organizację mikrotubul oraz śmierć komórek linii CHO AA8 (Med. Biol. Sci. 2011, 25(1): 17-23), a także próbę wyprowadzenia linii komórek nabłonka pęcherza moczowego (Med. Biol. Sci. 2007, 21(1): 39-45).

Dodatkowo we wspomnianych latach byłam współautorem artykułów podglądowych, które jednak zawsze związane były ze śmiercią komórkową i czynnikami ją indukującymi oraz strukturą cytoszkieletu (Nowotwory 2007, 57(5): 579-585; Postępy Hig. Med. Dośw. 2007, 61: 420-428; Postępy Hig. Med. Dośw. 2008, 62: 463-467; Pol. Merkurusz Lek. 2009, 26(153): 245-247).

Przedstawione powyżej prace naukowe, ale przede wszystkim realizacja grantu MNiSW uświadomiła mi, że aktyna i jej reorganizacja są głównym punktem moich zainteresowań naukowych. Stąd otrzymany przeze mnie grant UMK pt. „Wpływ leków (Neupogen, Trisenox) na lokalizację białka rodziny Rho (Cdc42) zaangażowanego w tworzenie sieci mikrofilamentów w komórkach i wyizolowanych jądrach komórkowych linii białaczek ludzkich HL-60 i K-562” stanowił podstawę do napisania publikacji (Central Eur. J. Biol. 2009, 4(3): 351-36; Folia Histochem. Cytobiol. 2009, 47(3): 453-459) oraz rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ filgrastimu i trójtlenku arsenu na jądrową i cytoplazmatyczną organizację szkieletu aktynowego w liniach białaczek ludzkich HL-60 i K-562”.

Wspomniana rozprawa była bardzo ważnym punktem wyjścia do mojej dalszej pracy naukowej, ponieważ nie tylko pojawiły się nowe pytania odnośnie F-aktyny, ale wskazała ona również braki metodyczne dzięki którym opracowaliśmy nowe techniki badawcze.

W tym miejscu warto również podkreślić, że wyniki prac naukowych, których byłam autorem lub współautorem prezentowane były podczas wielu konferencji krajowych i zagranicznych (dokładny wykaz zawarty jest w Załączniku nr 3).

W 2007 roku, ze względu na piastowanie funkcji sekretarza Bydgosko-Toruńskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików byłam

również współautorem rozdziału w publikacji prezentującej historię towarzystw lekarskich regionu kujawsko-pomorskiego (Bydgoskie Towarzystwo Naukowe 2007, 45-49).

5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką 25 publikacji naukowych, w tym dwóch poglądowych (o całkowitym IF = 22.443 oraz 303 punktach MNiSW, poza publikacjami stanowiącymi podstawę osiągnięcia naukowego). W okresie tym byłam również współautorką 60 doniesień zjazdowych i jednego obrazu okładki.

W 2011 roku obroniłam pracę doktorską pt. „Wpływ filgrastimu i trójtlenku arsenu na jądrową i cytoplazmatyczną organizację szkieletu aktynowego w liniach białaczek ludzkich HL-60 i K-562”, której promotorem była prof. dr hab. Alina Grzanka. Uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy dnia 16 listopada 2011 roku uzyskałam stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, otrzymując również wyróżnienie za szczególne wartości naukowe rozprawy. Z wyników zaprezentowanych w pracy doktorskiej powstała jeszcze jedna publikacja naukowa wydana w czasopiśmie *Oncology Reports* i dotyczyła wpływu czynnika wzrostu G-CSF na organizację filamentów aktynowych w komórkach linii białaczek ludzkich HL-60 i K-562 (*Oncol. Rep.* 2012, 28: 2138-2148). Bardzo ważnym dla mnie osiągnięciem w dziedzinie naukowej, było otrzymanie w 2012 roku nagrody indywidualnej III^o Rektora UMK w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2011 roku.

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk medycznych, moje główne zainteresowania i tematyka badawcza nie zmieniły się i w dalszym ciągu dotyczyły aktyny i jej zaangażowania w procesy zachodzące na terenie komórek nowotworowych. Skupiłam się głównie na możliwości manipulacji jądrową pulą mikrofilamentów poprzez zmianę ekspresji białek transportujących F-aktynę w obszarach jądro-cytoplazma, a także na pożądanym lub niepożądanym skutkach jakie niesie ta zmiana. Dodatkowo swoje badania rozszerzyłam o białka powiązane

ze strukturą cytoszkieletu aktynowego m.in. SATB1, laminy oraz β -kateninę. Ponadto widząc potrzebę lokalizacji F-aktyny na poziomie ultrastrukturalnym opracowaliśmy metodę znakowania filamentów aktynowych z użyciem nanokryształów półprzewodnikowych. Wynikami tych badań były kolejne publikacje, które wchodziły w skład osiągnięcia naukowego pt. „Wykazanie zależności pomiędzy jądrową lokalizacją F-aktyny a procesem śmierci komórek nowotworowych” oraz liczne doniesienia na konferencjach naukowych.

Warto również wspomnieć o zrealizowanym w Katedrze grantie NCN nr N N401 596140 pt.: „Ocena wpływu nadekspresji tropomiozyny na stabilizację międzykomórkowych i adhezyjnych połączeń komórek ludzkiego śródbłonka naczyń w warunkach sprzyjających rozwojowi procesów miażdżycowych”, którego byłam wykonawcą. W ramach tego projektu określiliśmy możliwość stabilizacji włókien aktynowych, a tym samym połączeń międzykomórkowych i adhezyjnych poprzez podwyższenie ekspresji tropomiozyny. W komórkach ludzkiego śródbłonka naczyń z nadekspresją białka stabilizującego F-aktynę obserwowaliśmy mniejszą wrażliwość na działanie czynników sprzyjających rozwojowi procesów miażdżycowych tj. nornikotyliny czy L-homocysteiny (Int. J. Mol. Med. 2013, 32: 115-129.; Folia Histochem. Cytobiol. 2013, 51(3): 179-192; Acta Histochem. 2014, 116: 606-618).

W 2014 roku otrzymałam wyróżnienie Rektora UMK w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2013 roku. Ponadto badania dotyczące udziału filamentów aktynowych (F-aktyny) w organizacji wewnętrznej jądra komórkowego oraz interakcji komórka-komórka uzyskały wyróżnienie Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego za rok 2013 w kategorii nauka, badania naukowe i postęp techniczny.

Od początku mojej pracy w Katedrze Histologii i Embriologii uczestniczę w badaniach statutowych naszej jednostki, które związane są z białkami cytoszkieletu i ich powiązaniem z ważnymi procesami zachodzącymi na terenie komórki. W badaniach tych ocenialiśmy wpływ czynników fizycznych (hipertermii, UV), cytostatyków (trójtlenek arsenu, doksorubicyna) i związków pochodzenia naturalnego (kofeina, kotynina, zielona herbata, alliina, kwercetyna) na białka

cytoszkieletu komórek nowotworowych. Ponadto prezentowaliśmy również udział białek cytoszkieletu w adhezji międzykomórkowej ludzkiego nabłonka oddechowego w obecności najczęstszych czynników prowadzących do chorób płuc. Badaliśmy także wpływ składników diety owocowo-warzywnej na komórki linii EA.hy926 oraz nabłonka oddechowego poddanych działaniu czynników prowadzących do najczęstszych chorób cywilizacyjnych. W wyniku tych badań w latach 2014-2018 powstało aż 13 prac naukowych, których byłam współautorem (Med. Biol. Sci. 2013, 27(2): 19-25; Postępy Hig. Med. Dośw. 2014, 68: 1492-1500; Central Eur. J. Biol. 2014, 9(8): 727-738; Med. Biol. Sci. 2014, 28(1): 17-21; Med. Biol. Sci. 2014, 28(2): 25-32; Med. Biol. Sci. 2014, 28(2): 11-17; Med. Biol. Sci. 2015, 29(1): 25-31; Postępy Hig. Med. Dośw. 2015, 69: 1478-1484; Tissue Cell 2015, 47(1): 105-114; Acta Histochem. 2016, 118(3): 225-235; Acta Histochem. 2017, 119(2): 99-112; Med. Res. J. 2017, 2(3): 102-110; Adv. Clin. Exp. Med. 2018, 27(3)).

Od 2011 roku byłam również wykonawcą grantów, których realizacja związana była ze współpracą z innymi Jednostkami CM. Badania pt.: „Powiązanie funkcjonalne puli F-aktyny jądrowej i białka SATB1 w komórkowym modelu raka piersi” (grant MNiSW luventus Plus 2011 nr IP2011 016571) wskazywały na wpływ ekspresji białka SATB1 oraz rozmieszczenia F-aktyny na rodzaj indukowanej śmierci w komórkach raka sutka linii MCF-7 oraz konieczność obecności SATB1 i jądrowej aktyny podczas apoptozy (Folia Histochem. Cytobiol. 2015, 53(1): 79-87; Folia Histochem. Cytobiol. 2015, 53(2): 152-161). Realizacja kolejnego grantu NCN nr N N401 596040 pt.: „Ekspresja SATB1 i β -kateniny w pierwotnych chłoniakach skóry (CTCL, *ang. Cutaneous T - cell lymphoma*) opierała się na materiale tkankowym uzyskanym od pacjentów z chłoniakiem T-komórkowym skóry, w którym oznaczono ekspresję białka macierzy jądrowej SATB1 i jej korelację z przebiegiem klinicznym choroby. Wyniki pracy sugerują, że ekspresja SATB1 może być potencjalnym czynnikiem rokowniczym potwierdzającym zróżnicowanie przebiegu klinicznego CTCL (Oncol. Rep. 2015, 33(1): 250-266).

Uczestniczyłam również w badaniach realizowanych w ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Chorób Oczu, na podstawie których powstała praca prezentująca immunohistochemiczną analizę ekspresji MGST1 i klasteryny w nabłonkowych komórkach soczewki pacjentów z zespołem PEX (Exp. Ther. Med. 2017, 13(3): 1057-1063).

W tym miejscu warto wspomnieć, że w ramach staży badawczo-rozwojowych również przeprowadzałam badania naukowe określające m.in. wpływ laseroterapii na komórki linii CHO AA8, a także właściwości soków warzywnych i ich mieszanek na kondycję układu krwionośnego osób narażonych na stres (Wydaw. Nauk. UMK, 2013; Int. J. Physiother. 2015, 2(6): 939-946).

W 2013 roku opublikowany został wykład pt. „Arszenik- trucizna czy lek?”, który wygłosiłam w ramach „Medycznej środy” (Wiad. Akad. 2013, 51: 24-25).

Wyniki mojej pracy prezentowane były również podczas wielu konferencji krajowych i zagranicznych, których dokładny wykaz zawarty jest w Załączniku nr 3.

5.3. PLANY BADAWCZE NA PRZYSZŁOŚĆ

Moje przyszłe badania przede wszystkim dotyczyć będą zaangażowania cytoszkieletu aktynowego w proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Jestem już współautorem pracy poglądowej obejmującej informacje dotyczące aktualnego stanu wiedzy na temat aktyny i jej zaangażowania w powyższy proces (BioMed Res. Int. 2018, 2018: 1-13). Ponadto wraz z Członkami Koła Naukowego Biologii Komórki i Ultrastruktury, którego jestem opiekunem, realizujemy projekt prezentujący ograniczenie tego procesu w komórkach linii HepG2 (wątrobiak) wywołanego hipoksją. Planuję również badania nad manipulacją korową F-aktyną poprzez białka ABP (np. profilinę), w celu ograniczenia tworzenia się struktur takich jak filopodia, czy lamellipodia, niezbędnych do ruchu i migracji komórek nowotworowych podczas przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego.

Jednocześnie w dalszym ciągu zaangażowana będę w wykonawstwo obecnie realizowanych w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (grant NCN nr 2015/17/D/NZ7/00809, grant NCN nr 2016/21/B/NZ7/01121).

Ponadto we współpracy z Katedrą i Kliniką Chorób Oczu zamierzam także kontynuować badania nad ekspresją białek połączeniowych w nabłonkowych komórkach soczewki pobranych od pacjentów z zespołem PEX.

5.4. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

	Ilość	IF	MNiSW
Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych	23	6.612	194
Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych	32	35.156	413
Łącznie	55	41.768	607

	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Całkowita liczba cytowań	216	198	349
Indeks H	8	8	11

Magdalena Izdebska