

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Agnieszka Siomek-Górecka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- I. 20 czerwca 2001 roku - tytuł magistra analityki medycznej z wynikiem bardzo dobrym, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, kierunek analityka medyczna,
- II. 13 wrzesień 2006 roku - stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Wydział Lekarski; tytuł rozprawy doktorskiej: "*Analiza poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA, produktów ich reperacji oraz stanu obrony antyoksydacyjnej, w aspekcie starzenia się organizmu człowieka.*"; promotor: prof. dr hab. Ryszard Oliński, recenzenci: prof. dr hab. Ewa Sikora, prof. dr hab. Kornelia Kędziora-Kornatowska.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- I. 5.10.2001-06.10.2002- stanowisko starszego technika, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna w Bydgoszczy
- II. od 1 października 2006: Akademia Medyczna w Bydgoszczy/Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej - adiunkt.

4. Wskazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy:

I. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Rola stresu oksydacyjnego w profilowaniu wybranych zmian patologicznych u ludzi oraz modulacji szlaku sygnalizacji komórkowej NF-κB u zwierząt”

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem pięciu przedstawionych poniżej publikacji w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) cytowanych łącznie 42 razy; o sumarycznym współczynniku IF równym **11.057**.

	IF	Cyt.
1. Szaflarska-Popławska A, Siomek A , Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Różalski R, Guz J, Szpila A, Zarakowska E, Oliński R. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.</i> 2010 Aug;19(8):1960-5.	4.190	9
2. Siomek A , Brzoska K, Sochanowicz B, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Zarakowska E, Szpila A, Guz J, Bartłomiejczyk T, Kalinowski B, Kruszewski M, Olinski R. Cu,Zn-superoxide dismutase deficiency in mice leads to organ-specific increase in oxidatively damaged DNA and NF-κB1 protein activity. <i>Acta Biochim Pol.</i> 2010;57(4):577-83.	1.234	6
3. Brzóska K, Sochanowicz B, Siomek A , Oliński R, Kruszewski M. Alterations in the expression of genes related to NF-κB signaling in liver and kidney of CuZnSOD-deficient mice. <i>Mol Cell Biochem.</i> 2011 Jul;353(1-2):151-7.	2.057	4
4. Siomek A . NF-κB signaling pathway and free radical impact. <i>Acta Biochim Pol.</i> 2012;59(3):323-31.	1.185	23
5. Siomek A , Gackowski D, Szpila A, Brzóska K, Guz J, Sochanowicz B, Kruszewski M. Epigenetic modifications and NF-κB pathway activity in Cu,Zn-SOD-deficient mice. <i>Mol Cell Biochem.</i> 2014 Dec;397(1-2):187-94.	2.388	
Razem: 11.057		42

Wykaz prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu autorskiego w pkt. 5.I.B
Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim w załączniku nr 3.

II. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Reaktywne formy tlenu (RFT), ich źródła, funkcje oraz udział w fizjologii i patologii człowieka stanowią przedmiot licznie podejmowanych w ciągu ostatnich dwudziestu lat badań. Mechanizmy prowadzące do powstawania zmian patofizjologicznych pod wpływem tych wysoce reaktywnych cząsteczek nie zostały jednak jak dotąd dokładnie scharakteryzowane. Wiadomym jest, że w warunkach fizjologicznych anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek i organizmów ludzi i zwierząt, i między innymi wykorzystywane przez fagocyty do zabijania wchłoniętych przez nie bakterii. Wiadomo również, że pełnią istotną rolę w regulacji sygnalizacji komórkowej i ekspresji genetycznej. Równowaga pomiędzy szybkością wytwarzania wolnych rodników a stężeniem antyoksydantów i aktywnością enzymów ochronnych neutralizujących RFT decyduje o poziomie reaktywnych form tlenu w organizmie i szybkości ich reakcji ze składnikami komórek. Zaburzenie

homeostazy prowadzące do przesunięcia równowagi w kierunku RFT zostało określone terminem „stresu oksydacyjnego” czy też stanem „szoku tlenowego”. Stan ten może pojawić się jako skutek nadmiernej generacji wolnych rodników (np. przy ekspozycji na dodatkowe źródła RFT), bądź też w wyniku obniżenia wydajności systemów obronnych, na przykład stężenia antyoksydantów. Łagodny szok tlenowy jest zazwyczaj tolerowany przez organizm, natomiast jego przedłużenie lub nasilenie prowadzi do licznych, niekorzystnych dla komórki zmian, między innymi do zaburzeń metabolizmu komórkowego oraz przełączenia sygnałów zawiadujących procesami apoptozy i nekrozy. Reaktywne formy tlenu mogą reagować z każdą makrocząsteczką żywego organizmu, jak białka, węglowodany, lipidy oraz DNA. O ile oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki białek, lipidów czy węglowodanów mogą być w łatwy sposób zastąpione nowymi, niezmodyfikowanymi cząsteczkami, modyfikacje powstające na skutek działania reaktywnych form tlenu w obrębie DNA mogą prowadzić do destabilizacji materiału genetycznego lub powstania mutacji. Poznanie źródeł ich powstania oraz związku z poziomem obrony antyoksydacyjnej stanowią jedną z możliwości wyjaśnienia molekularnych mechanizmów rozwoju wielu chorób. Udział stresu oksydacyjnego w patogenezie licznych zmian patologicznych stwierdzono między innymi w chorobach sercowo-naczyniowych, nowotworach, stanach zapalnych oraz neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera. Liczne prace, których jestem współautorem również stanowią potwierdzenie roli stresu oksydacyjnego w patogenezie wyżej wymienionych chorób [prace 3,5,9,10,13,14,27 w pkt 5.II.A].

Występowanie tak zwanego endogennego poziomu zmodyfikowanych zasad azotowych, czyli pewnej puli oksydacyjnych modyfikacji DNA w prawidłowych komórkach jest powszechnie akceptowane. Stanowi ono wyraz równowagi pomiędzy powstawaniem reaktywnych form tlenu i uszkodzeniami DNA indukowanymi ich działaniem a usuwaniem powstałych uszkodzeń przez swoiste enzymy naprawiające DNA. Spośród ponad 20 różnego typu oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych, najlepiej poznaną oksydacyjną modyfikacją DNA powstającą pod wpływem rodnika hydroksylowego lub tlenu singletowego jest 8-oksyguanina. W komórkowym DNA poziom tej modyfikacji mierzony jest jako 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oksyoG), zaś produkty jej naprawy (na drodze mechanizmu BER oraz NER) w stanie niezmienionym wydalane z moczem, 8-oksyoGuanina (8-oksyoGua) oraz 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oksyoG), stanowią odzwierciedlenie nasilenia stresu oksydacyjnego na poziomie całego organizmu. Ponieważ 8-oksyoGuanina uznawana jest za czynnik współodpowiedzialny za rozwój zmian o charakterze nowotworowym, celem projektów w

których brałam udział była analiza tej modyfikacji jako markera procesu nowotworzenia [prace nr 5,9,10,12 w pkt.5 II A].

Obok zmian o charakterze nowotworowym istnieje szereg innych jednostek chorobowych, które nie stanowią zmian letalnych. Ich pojawienie się i obecność są jednak wysoce uciążliwymi dla normalnego funkcjonowania. Taką chorobą jest celiakia (coeliac disease, CD), zwana również chorobą trzewną. To trwająca przez całe życie choroba immunologiczna o podłożu genetycznym, będąca przewlekłym schorzeniem zapalnym jelita cienkiego. Zachorowalność na tę chorobę w krajach europejskich wynosi 1:100. Ponadto pojawiają się pierwsze doniesienia mówiące o tym, iż częstość występowania celiakii ciągle wzrasta (np. prace badaczy z Finlandii oceniają występowanie choroby trzewnej w tym kraju na około 2,5%). Wydaje się, iż jest to związane z coraz większym spożyciem glutenu (m.in. korzystaniem z wysoko glutenowych odmian zbóż i zmianą nawyków żywieniowych) oraz coraz lepszą wykrywalnością choroby. Jest więc ona dość częstym schorzeniem, które choć nie stanowi bezpośredniego zagrożenia życia, znacznie je utrudnia, zaś nieleczone może skutkować rozwojem nowotworu. Celiakię charakteryzuje nietolerancja glutenu, białka zapasowego zawartego w ziarnach zbóż (pszenicy, życie, jęczmieniu). Działający toksycznie gluten prowadzi do zaniku kosmków jelita cienkiego, czego efektem jest upośledzenie wchłaniania pokarmów, skutkujące wystąpieniem różnorodnych objawów klinicznych. Choroba może ujawnić się w każdym wieku, podczas dorastania, u kobiet w ciąży, po silnej infekcji, stresie, również w podeszłym wieku. Kobiety chorują dwa razy częściej niż mężczyźni. Jediną metodą leczenia i leczeniem "z wyboru" celiakii jest stosowanie przez całe życie ścisłej diety bezglutenowej. Rozpoznanie celiakii następuje na podstawie stwierdzenia typowego uszkodzenia błony śluzowej jelita cienkiego obejmującego zanik kosmków jelitowych, nacieki z limfocytów śród nabłonkowych oraz hiperplazję krypt. Pacjentów nieleczonych charakteryzuje wysokie ryzyko rozwoju chłoniaka T-komórkowego, osteoporozy, zaburzeń reprodukcji oraz rozwoju schorzeń autoimmunologicznych. Dokładny mechanizm prowadzący do uszkodzenia przez gluten śluzówki jelita cienkiego jest jak do tej pory nie całkiem poznany i zdecydowanie nie jest jednorodny. Próby wyjaśnienia tego zjawiska obejmują cztery mechanizmy: apoptozę enterocytów wywołaną cytotoksycznym działaniem limfocytów śród nabłonkowych, **uszkodzenie komórek w następstwie stresu oksydacyjnego**, destrukcję tkanki łącznej na skutek nieprawidłowej ekspresji metaloproteinaz oraz zaburzenia różnicowania komórek krypt jelitowych. Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie celiakii jak dotychczas została potwierdzona tylko niewielką ilością badań

wykazujących między innymi: a) indukcję stresu oksydacyjnego przez gliadynę pszenicy w warunkach *in vitro*; b) dobrą korelację ekspresji syntazy tlenku azotu (NOS) z wysokim poziomem produktów oksydacji NO w moczu w biopłatach pacjentów z aktywną postacią choroby; c) obniżony poziom antyoksydantów takich jak α -tokoferol u pacjentów z celiakią w porównaniu do grupy kontrolnej.

Dane te oraz częstotliwość występowania celiakii stały się podstawą przeprowadzenia badań w ramach pracy #1, pkt. 5.I.B, z moim aktywnym udziałem, których celem była szeroka analiza markerów stresu oksydacyjnego w warunkach *in vivo*. Badania przeprowadzono w trzech grupach dzieci i młodzieży, które obejmowały odpowiednio: pacjentów z wcześniej rozpoznaną celiakią znajdujących się na ścisłej diecie bezglutenowej; pacjentów ze świeżo rozpoznaną celiakią oraz osoby zdrowe. Nasilenie stresu oksydacyjnego mierzono w leukocytach krwi obwodowej oraz w moczu. Poziom obrony antyoksydacyjnej oceniano poprzez analizę stężenia drobnocząsteczkowych antyoksydantów takich jak: retinol, alfa-tokoferol, witamina C oraz kwas moczowy.

Potwierdzeniem roli „stresu oksydacyjnego” w patogenezie celiakii miało być wykazanie w grupie nieleczonych pacjentów z celiakią wyższego aniżeli w grupie kontrolnej poziomu 8-oksydG w DNA izolowanym z leukocytów i/lub 8-oksydG i 8-oksyaGua w moczu. Taka obserwacja miała ponadto stanowić uzasadnienie merytoryczne do stosowania leków z grupy antyoksydantów w terapii tej choroby. Natomiast obserwacja podobnego poziomu wybranych parametrów w grupie kontrolnej i u pacjentów leczonych ścisłą dietą bezglutenową miało dowodzić skuteczności diety w uruchamianiu antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych.

Uzyskane wyniki wykazały zdecydowanie wyższy poziom markerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA w grupach chorych z celiakią, niezależnie jednak od stosowanej diety. Zaobserwowano natomiast, że zarówno komórkowy, jak i obserwowany w moczu poziom oksydacyjnych uszkodzeń był nieznacznie wyższy u osób ze świeżo rozpoznaną celiakią. Wyjątek stanowił poziom 8-oksyaGua, który był znacząco niższy u osób przestrzegających diety bezglutenowej od lat, niż u osób ze świeżo rozpoznaną chorobą. Ponieważ podstawowy poziom 8-oksydG w komórkowym DNA stanowi wyraz równowagi pomiędzy powstawaniem i usuwaniem oksydacyjnych uszkodzeń obserwowany w obu grupach chorych **podwyższony poziom 8-oksydG w leukocytarnym DNA może stanowić rezultat obniżonej wydajności mechanizmów naprawczych u pacjentów z celiakią**. Dodatkową ocenę nasilenia stresu oksydacyjnego umożliwia analiza poziomu obrony antyoksydacyjnej. U pacjentów z celiakią

jest to szczególnie ważne, gdyż często wraz rozwijającym się nasileniem choroby dochodzi do zaburzeń wchłaniania. W przedstawionej pracy wykazaliśmy statystycznie istotne różnice w stężeniach witamin A i E pomiędzy grupami chorych z celiakią (niższe u chorych ze świeżo rozpoznaną postacią choroby) oraz witaminy C pomiędzy grupami chorych a grupą kontrolną. Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że **u pacjentów z celiakią obserwuje się stan stresu oksydacyjnego, mierzonego poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Mimo, iż dieta może stanowić czynnik częściowo odpowiedzialny za rozwój tego stanu, wydaje się on być niezależnym od diety, a raczej związanym z genetycznymi uwarunkowaniami oddziałującymi na mechanizmy naprawcze DNA. Natomiast suplementacja witaminami o aktywności antyoksydacyjnej u chorych z celiakią może stanowić ważny czynnik minimalizujący ryzyko rozwoju nowotworu.**

Potwierdzeniem naszych obserwacji mogą być wyniki ostatnio opublikowanych badań (M. Katar i wsp. 2014)¹, wskazujące na występowanie u chorych z celiakią polimorfizmów genetycznych enzymów o aktywności antyoksydacyjnej, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa SOD czy peroksydaza glutationu GSH-Px, co wpływa na ich strukturę a tym samym funkcjonalność.

Przeciwdziałanie zagrożeniom wywołanym przez reaktywne formy tlenu odbywa się na trzech poziomach, z których pierwszą linię obrony stanowi działanie enzymów neutralizujących RFT. Do enzymów tych należy dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) E.C.1.15.1.1, enzym katalizujący reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. Enzym zawierający miedź i cynk (Cu,Zn-SOD;SOD-1), występuje w cytoplazmie u prawie wszystkich organizmów eukariotycznych. Mimo liczego zainteresowania tematyką stresu oksydacyjnego w patofizjologii człowieka, nadal brakuje jednak żelaznych dowodów eksperymentalnych wskazujących na bezpośredni związek między stresem oksydacyjnym, zawartością potencjalnie mutagennych uszkodzeń DNA oraz rozwojem licznych stanów patologicznych.

¹ Katar M, Ozugurlu AF, Ozyurt H, Benli I. Evaluation of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzyme polymorphisms in celiac disease patients. *Genet Mol Res.* 2014 Feb 20;13(1):1030-7. doi: 10.4238/2014.February.20.4.

Bardzo dobrym modelowym organizmem w badaniach takich korelacji wydają się być myszy. Z tego też względu celem pracy #2, pkt. 5.I.B w kompleksowych badaniach na modelu zwierzęcym, było ustalenie **czy brak genu dysmutazy ponadtlenkowej (Cu,Zn-SOD), kodującego jeden z głównych enzymów stanowiących barierę antyoksydacyjną, może prowadzić do potencjalnie muta/karcynogenego wzrostu poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz, czy brak ten może oddziaływać w sposób istotny na działanie szlaku sygnalizacji komórkowej NF-κB.** Cel pracy został osiągnięty poprzez szereg badań, które umożliwiły ocenę: a) zawartości oksydacyjnie zmodyfikowanej guaniny (8-oksydG) w DNA izolowanym z wybranych organów myszy (wątroba, nerka, mózg); b) stężenia produktów reperacji oksydacyjnie uszkodzonego DNA: 8-oksyguaniny (8-oksyoGua) i/lub 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny (8-oksyoG) w moczu; c) wpływu nasilonego stresu oksydacyjnego na aktywność szlaku sygnalizacji NF-κB; d) związku pomiędzy markerami oksydacyjnych uszkodzeń DNA a genotypem determinującym aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i tym samym poziom obrony antyoksydacyjnej; e) poziomu ekspresji genów zależnych od NF-κB.

Jako kierownik i wykonawca brałam aktywny udział w realizacji wyżej opisanego projektu, którego rezultaty zaowocowały pracami #2 i #3, pkt 5.I.B. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono wyższy poziom 8-oksyoG w DNA izolowanym z nerki i wątroby w przypadku zwierząt pozbawionych genu Cu,Zn-SOD (*SOD1*^{-/-}) w porównaniu do heterozygot oraz szczepów „dzikich” oraz brak statystycznie istotnych różnic w poziomie analizowanego markera w DNA mózgu. Uzyskane wyniki wskazują na wystąpienie stanu stresu oksydacyjnego w wątrobie i nerce, co wydaje się być wynikiem osłabienia obrony antyoksydacyjnej spowodowanego brakiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Uzyskane obserwacje są zgodne z niektórymi danymi literaturowymi, według których analiza oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach wątroby wykazała dwukrotny wzrost poziomu 8-oksyoG u osobników homozygotycznych (*SOD1*^{-/-}) we wszystkich grupach wiekowych w odniesieniu do zwierząt kontrolnych. Wykazano również, że myszy pozbawione genu *SOD1* wykazują obniżoną długość życia oraz charakteryzuje je większa częstotliwość występowania nowotworów wątroby [Elchuri i wsp. 2005]².

² Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson RL, Van RH, Epstein CJ, Huang TT (2005) Cu,ZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24: 367–38

Zgodnie z uzyskanymi w omawianej pracy wynikami oraz szeroko udokumentowanymi muta-i karcynogennymi właściwościami oksydacyjnych uszkodzeń DNA obserwowany wyższy poziom 8-oksydG w wątrobie i nerce może stanowić jedną z przyczyn występowania nowotworów w obrębie tych narządów u myszy „znokautowanych”. Dodatkowym czynnikiem mogącym wpływać na wystąpienie stresu oksydacyjnego są wykazane w niektórych doniesieniach defekty homeostazy energetycznej u myszy posiadających mutacje w genie kodującym SOD1. Wykazano, że zmutowane myszy mają niższą masę niż pozbawione mutacji w tym genie, co spowodowane jest wyższym tempem metabolizmu w spoczynku, zaś obserwowany u tych zwierząt zredukowany poziom leptyny i insuliny może modyfikować metabolizm tkankowy. Wysoce prawdopodobne wydaje się, więc, że u myszy pozbawionych genu *SOD1* również dochodzi do nasilenia metabolizmu tkankowego, co wpływa na tempo generowania reaktywnych form tlenu w niektórych narządach, te zaś z kolei powodują oksydacyjne modyfikacje DNA.

Analiza stresu oksydacyjnego na poziomie całego organizmu, mierzona poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA 8-oksyGua i/lub 8-oksydG w moczu, nie wykazała jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi genotypami. Jest, więc wysoce prawdopodobne, że stres oksydacyjny związany z brakiem aktywności SOD1 może być specyficzny tkankowo i ograniczony tylko do niektórych typów komórek/narządów. Zaobserwowany brak różnic w poziomach badanych markerów w moczu analizowanych genotypów może sugerować zaburzenia mechanizmów naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA w niektórych narządach. Prowadzi to do ich akumulacji i obserwacji wyższego poziomu 8-oksydG w DNA nerki i wątroby u zwierząt pozbawionych genu kodującego SOD1.

Szlak NF- κ B jest jednym z najważniejszych czynników transkrypcyjnych obecnych w komórkach zwierzęcych, zaś od czasu odkrycia przez Sena i Baltimore'a w 1986 roku [Sena i Baltimore, 1986]³, jego działanie oraz mechanizmy regulacji stanowią cele licznych badań. Szlak sygnałowy NF- κ B jest odpowiedzialny za wczesną odpowiedź komórki na biologiczne, chemiczne i fizyczne czynniki uszkadzające komórkę. Aktywacja szlaku NF- κ B powoduje uruchomienie transkrypcji wielu genów biorących udział w dalszych etapach odpowiedzi, między innymi wywołaniu stanu zapalnego oraz stymulacji proliferacji komórek, stanowi on również kluczowy regulator procesów zapalnych, odpowiedzi immunologicznej oraz procesu apoptozy.

³Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921–928

Rodzina białek NF- κ B u ssaków składa się z pięciu białek określanych, jako RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 i p52. Aktywny czynnik transkrypcyjny składa się zawsze z dwóch podjednostek, przy czym cel naszych badań stanowił najbardziej typowy dimer p50/p65 (NF- κ B1/RelA). Ponieważ już wczesne wyjaśnienia aktywacji szlaku NF- κ B donosiły, że aktywacja poprzez różne czynniki następuje z udziałem stresu oksydacyjnego i generacją wysokiego wewnątrzkomórkowego poziomu RFT, modulacja aktywności szlaku stanem redoks komórki była w kręgu zainteresowań wielu badaczy od lat. Mimo, iż część badań wykazała, że teoria o koniecznym powstawaniu reaktywnych form tlenu by aktywować szlak NF- κ B nie jest uniwersalna, zainteresowanie tą tematyką wciąż pozostaje niesłabnące. Doniesienia literaturowe wskazują jednak, że udział RFT w aktywacji analizowanego szlaku jest zależny m.in. od rodzaju komórki i nie jest uniwersalnym zjawiskiem. Ponieważ aktywność szlaku sygnalizacji komórkowej NF - κ B jest regulowana stanem redoks komórki, **celem podjętego projektu była również analiza aktywności tego szlaku oraz ocena wpływu nasilonego stresu oksydacyjnego, mierzonego poziomem 8-oksydG w DNA na tę aktywność.**

Rezultatem przeprowadzonych badań była obserwacja, że aktywność białka p50 w jądrach komórek izolowanych z nerek jest wyższa w przypadku myszy *SOD1^{-/-}* w odniesieniu do heterozygot i szczepów „dzikich”, co wskazywać może na aktywację szlaku NF- κ B poprzez stres oksydacyjny. Natomiast analizy aktywności białka p65 (RelA) nie wykazały różnic pomiędzy genotypami w żadnym z badanych narządów. Dla uzyskania pełnej oceny profilowania aktywności szlaku NF- κ B poprzez reaktywne formy tlenu podjęto również próby ustalenia korelacji pomiędzy poziomem 8-oksydG w komórkowym DNA a aktywnością szlaku NF- κ B.

Uzyskane wyniki wykazały najwyższe i istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem 8-oksydG a aktywnością białek p50 i p65 w przypadku komórek nerki i wątroby. Korelacje te są odwrotne dla genotypów „+/+” oraz heterozygot. Dokładne dane dotyczące wszystkich analizowanych korelacji zawiera tabela 1, w pracy #2. Obserwacje te sugerują, że w warunkach fizjologicznych aktywność szlaku NF- κ B może być regulowana przez reaktywne formy tlenu/stres oksydacyjny oraz można obserwować wpływ aktywności szlaku na poziom oksydacyjnych uszkodzeń w DNA. Wyższej aktywności szlaku NF- κ B odpowiada mniej oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wysoce prawdopodobne jest, więc, że nasilona ekspresja genów „antyoksydacyjnych” (następująca wskutek aktywacji szlaku NF- κ B), powoduje obniżenie poziomu RFT i zmniejszenie ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Uzyskane obserwacje prowadzą, więc do pytania: „**Jaki czynnik jest odpowiedzialny za aktywację**

szlaku NF-κB?” Wydaje się, że mogą to być zarówno różne RFT, jak też może istnieć inny mechanizm, w którym NF-κB jest aktywowany pośrednio na drodze, której początkiem jest sama obecność RFT. U myszy pozbawionych genu dysmutazy nadadtlenkowej SOD1 obserwujemy brak korelacji pomiędzy analizowanymi markerami, mimo, iż aktywność białka p50 w komórkach nerki jest wyższa w tej grupie zwierząt. Sugeruje to, że podwyższony poziom aktywności szlaku NF-κB u tych zwierząt nie jest wystarczającym czynnikiem chroniącym komórki przed działaniem RFT, co objawia się zwiększonym poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem myszy pozbawionych genu kodującego jedną z dysmutaz nadadtlenkowych należy spodziewać się obniżonego poziomu nadadtlenku wodoru (uznawanego przez większość badaczy, jako czynnik stymulujący aktywność szlaku sygnalizacji NF-κB) oraz wyższego poziomu anionorodnika nadadtlenkowego. **Uzyskane na skutek przeprowadzonych w omawianym projekcie badań wyniki wskazują, że brak genu dysmutazy nadadtlenkowej może prowadzić do wystąpienia stresu oksydacyjnego w niektórych narządach (wątroba i nerka) i prowadzić do oksydacyjnych modyfikacji DNA, natomiast zgodnie z niektórymi danymi literaturowymi stres oksydacyjny nie koniecznie stanowi bezpośredni czynnik aktywujący szlak sygnalizacji NF-κB we wszystkich badanych narządach. Aktywacja ta wydaje się być komórkowo lub tkankowo specyficzna.**

Uzyskane wyniki sugerują ponadto wyjaśnienie zwiększonej zachorowalności na nowotwory wątroby obserwowanej u zwierząt pozbawionych aktywności SOD1. Uzyskane wyniki informują o wzroście poziomu promutagennej pochodnej, jaką jest 8-oksydG zarówno w nerce jak i wątrobie myszy *SOD1^{-/-}*, jednak obserwacja zwiększonej aktywności białka p50 tylko w nerce sugeruje mechanizm obronny tego narządu przed rozwojem nowotworu. **Ponieważ białko p50 nie posiada domeny aktywującej transkrypcję, obserwujemy hamujące działanie dla pro-zapalnej/pro-karcynogennej aktywności szlaku NF-κB w tym narządzie.**

Ponieważ według licznych doniesień poziom reaktywnych form tlenu oraz antyoksydantów może wpływać na ekspresję genów związanych ze szlakami sygnalizacji komórkowej jedno z zadań projektu stanowiła analiza ekspresji 84 genów związanych ze szlakiem NF-κB. Dokonaliśmy porównania ekspresji genów pomiędzy narządami zwierząt pozbawionych genu dysmutazy SOD1 oraz szczepów „dzikich”. Dokładne wyniki naszych badań przedstawia tabela 1 w pracy #3 pkt.

Ekspresja siedmiu genów w analizie nerki wykazała statystycznie istotną zmienność zależną od genotypu badanych zwierząt. U myszy *SOD1^{-/-}*, cztery wykazały zwiększoną ekspresję, *Erg1*, *Fos*, *Il1b*, *Tnfrst10b*, zaś trzy obniżoną *Card10*, *Ikbkb*, *Tgfbr2*. W przypadku wątroby tych myszy sześć genów charakteryzowała nadekspresja, *Fos*, *Il1b*, *Il1r1*, *Jun*, *Tlr7*, *Tnfrsf10b* natomiast pięć wykazało obniżoną ekspresję *Casp8*, *Ikbke*, *Irak1*, *Nfkb1*, *Raf1*. Uzyskane wyniki są zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami opisanymi w pracy #2, wskazującymi, że niedobór Cu,Zn-SOD dysmutazy skutkuje narządowo specyficzną odpowiedzią szlaku NF-κB. Dalsza analiza ekspresji genów w badanych narządach wykazała, że zarówno w wątrobie i nerce obserwowano wzrost ekspresji genów, których produkty białkowe stanowią składową aktywującego transkrypcję kompleksu AP-1 (*Fos*, *Jun*). Kompleks ten bierze udział w regulacji apoptozy, proliferacji i różnicowania się komórek. Jak wykazano zarówno *Fos* i *Jun* podlegają regulacji przez oksydanty na poziomie transkrypcji jak i translacji. Możliwe jest więc, że obserwowany stres oksydacyjny spowodowany niedoborem SOD1 prowadzi do nasilenia ekspresji tych genów. W komórkach wątroby wykazano także obniżenie ekspresji genu *Casp8*, kodującego jedną z kluczowych kaspaz inicjujących proces apoptozy oraz *Ikbke*, którego produkt białkowy to jedna z kinaz inhibitora białek szlaku NF-κB, biorąca udział w aktywacji szlaku NF-κB. Te obserwacje sugerowałyby osłabienie procesów zaprogramowanej śmierci oraz aktywacji NF-κB. Analiza genów cytokin oraz interleukin wykazała, że tylko ekspresja *Il1b* oraz jej receptora *Il1r1* w wątrobie jest nasiloną u zwierząt z deficytem SOD1. Jako, że *Il1b* jest odpowiedzialna za odpowiedź zapalną, proliferację, różnicowanie i apoptozę, nasiloną ekspresja genu tej cytokiny uznawana jest za czynnik mogący odgrywać istotną rolę w karcynogenezie. Obserwowana nasiloną ekspresja genu tej cytokiny oraz jej receptora w przypadku komórek wątroby myszy z deficytem SOD1 mogłaby częściowo tłumaczyć obserwowane w tym organie zmiany o charakterze nowotworowym. Mimo, iż zwiększony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz kumulacja mutacji obserwowane są zarówno w nerce jak i wątrobie znokautowanych zwierząt, występowanie nowotworów typowe jest tylko dla wątroby. Co ciekawe obserwujemy obniżenie ekspresji genu *Nfkb1* w komórkach wątroby tych zwierząt. W związku z tym, że w naszej pracy #2 wykazaliśmy wzrost aktywności białka p50 (NF-κB1) tylko w nerce myszy *SOD1^{-/-}* co sugerowaliśmy jako ochronne przed rozwojem nowotworu, obecne obserwacje stanowią poparcie tej tezy.

Dalsza analiza ekspresji genów wykazała, że zarówno w przypadku komórek wątroby i nerki myszy *SOD1^{-/-}*, ekspresja ośmiu genów jest obniżona. Co ciekawe pięć z nich *Ikbkb*,

Ikbke, Tgfbr2, Irak1, Raf1 koduje białka charakteryzujące się aktywnością kinaz, te zaś stanowią czynniki regulacyjne aktywności szlaku NF- κ B.

Analiza ekspresji genów w komórkach nerki wykazała ponadto, że obok obniżenia ekspresji genu *Card10*, którego produkt należy do rodziny białek zawierających domenę rekrutacji kaspaz (co sugerowałoby osłabienie procesu apoptozy) obserwuje się także wzrost ekspresji genów *Tnfrsf10* i *Fadd* (białko prowadzące do pobudzenia receptora Fadd, na skutek jego działania dochodzi do rekrutacji kaspaz inicjujących apoptozę).

Uzyskane wyniki mogą wskazywać na zaburzenia niektórych szlaków aktywujących proces programowanej śmierci komórek, co przy współobecności oksydacyjnych uszkodzeń DNA może skutkować inicjacją karcynogenezy. Ponadto obserwowane obniżenie ekspresji białek niezbędnych dla prawidłowej aktywności szlaku wskazuje, że stres oksydacyjny spowodowany niedoborem SOD1 moduluje aktywność szlaku na różnych poziomach. Zgodnie z wynikami pracy #2 opisującej specyficzną narządowo odpowiedź NF- κ B również i w tym przypadku obserwujemy różnicę w ekspresji genów pomiędzy nerką i wątrobą, w odpowiedzi na niedobór Cu,Zn-SOD dysmutazy. Wyniki te potwierdzają istnienie mechanizmów chroniących nerkę przed nowotworzeniem.

Podsumowując, rezultaty przeprowadzonych badań wykazują, że u zwierząt pozbawionych genu dysmutazy ponadtlenkowej Cu,Zn-SOD obserwuje się wystąpienie stresu oksydacyjnego, mierzonego poziomem markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA, jakim jest 8-oksydG. Stres oksydacyjny, obserwowany w wątrobie i nerce badanych zwierząt nie koniecznie stanowi bezpośredni czynnik aktywujący szlak sygnalizacji NF- κ B we wszystkich badanych narządach. Zarówno stres oksydacyjny, jak i aktywacja szlaku charakteryzują się specyficznością narządową. Obniżenie ekspresji białek niezbędnych dla prawidłowej aktywności szlaku wskazuje, że stres oksydacyjny spowodowany niedoborem SOD1 moduluje aktywność szlaku na różnych poziomach.

Pełna realizacja informacji genetycznej jest bezpośrednio zależna od przejścia chromatyny upakowanej w luźniejsze domeny, dostępne dla białek enzymatycznych. Procesy przemian heterochromatyny w euchromatynę zależne są zarówno od potranslacyjnej modyfikacji histonów, jak również metylacji bądź demetylacji DNA. Najlepiej scharakteryzowanym jak dotychczas markerem epigenetycznym jest 5-metylocytozyna (5mC), która stanowi 0,75-1% ogółu zasad DNA w typowej komórce ssaków. Metylacja cytozyny do 5-metylocytozyny jest enzymatyczną, poreplikacyjną modyfikacją DNA,

polegającą na przeniesieniu grupy metylowej na cytozynę, znajdującą się w obrębie dinukleotydów CpG. Metylacja DNA odgrywa znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów podczas embriogenezy u ssaków i różnicowania komórek, uczestniczy w transkrypcyjnym wyciszaniu genów, wyciszaniu licznych sekwencji powtórzonych, wyłączaniu drugiego chromosomu X w komórkach osobników żeńskich, piętnowaniu rodzicielskim. 5 - Metylocytozyna jest więc bardzo ważnym elementem w regulacji ekspresji wielu genów. O tym jak istotny dla rozwoju organizmu jest proces metylacji świadczy fakt, iż myszy pozbawione genu DNA-metylotransferazy obumierają w ciągu ośmiu dni od zapłodnienia.

W ostatnich latach podnosi się udział 8-oksoguaniny w regulacjach epigenetycznych, wskazując na jej oddziaływanie w modyfikacji ekspresji genów. Wykazano między innymi, **że obecność 8-oksoguaniny w oligonukleotydach całkowicie zmienia enzymatyczne metylowanie sąsiednich cytozyn *in vitro*. W związku z tym możliwe jest, że wzrost poziomu 8-oksoguaniny w DNA może zmniejszyć metylację cytozyny i w ten sposób oddziaływać na aktywność genomu.** W naszych wcześniejszych badaniach (prace #2 i #3, pkt. 5.I.B) wykazaliśmy, że niedobór SOD1 prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego oraz, że zmiany te są specyficzne narządowo. Fizjologiczne znaczenie modyfikacji szlaku sygnalizacji komórkowej NF- κ B przez metylację jest słabo znane. Z tego względu poszukiwanie związku między poziomem epigenetycznych modyfikacji a aktywnością białek szlaku NF- κ B są jak najbardziej zasadne. Biorąc pod uwagę powyższe oraz mając na uwadze szersze poznanie wyżej opisanych zjawisk zdecydowałam o realizacji projektu, którego przedmiotem badawczym była możliwość modulowania poziomu modyfikacji epigenetycznych poprzez niedobór dysmutazy ponadtlenkowej SOD1 u myszy oraz analiza związku pomiędzy poziomem tych modyfikacji a aktywnością szlaku NF- κ B u badanych zwierząt. Mimo utrzymujących się przez lata przekonań, iż wzór metylacji DNA raz ustalony jest utrzymywany podczas życia osobniczego, wyniki najnowszych badań wskazują, że obniżony poziom 5mC może być bezpośrednio związany z procesem aktywnej demetylacji DNA. Niedawne odkrycia opublikowane w 2009 r. w Science [Tahiliani i wsp. 2009]⁴ wykazały, że u ssaków 5mC może być hydroksylowana do formy 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), i że zawartość tej modyfikacji w genomowym DNA sięga 0.003-0.6 %. Po odkryciu udziału 5hmC w demetylacji wiele badań potwierdziło jej kluczową rolę w tym procesie, choć molekularne mechanizmy tego zjawiska nadal pozostają nie w pełni wyjaśnione. W kierowanym przez mnie projekcie, którego rezultaty zostały opisane w pracy #5, pkt 5.I.B analizie poddano również możliwą aktywną drogę demetylacji 5mC poprzez analizę poziomu jej hydroksylowanej pochodnej 5hmC. Obie modyfikacje epigenetyczne analizowano w

postaci nukleozydów, odpowiednio 5-metylo-2'-deoksycytydyny (5mdC) oraz 5-hydroksymetylo-2'-deoksycytydyny (5hmdC).

Za celowością badań w ramach powyższego projektu przemawiały ponadto rezultaty prac opublikowanych w ciągu ostatnich lat, w których wykazano, że białko p50 stanowi białko efektorowe w cytotoksycznej odpowiedzi na uszkodzenia DNA spowodowane metylacją [Schmitt i wsp. 2011]⁵, oraz, że w ekspresji deaminazy AID w komórkach nabłonkowych żołądka, zainfekowanych *H.pylori* pośredniczy IκB zależna droga aktywacji szlaku NF-κB.

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że niedobór dysmutazy Cu,Zn-SOD nie wpływa znacząco na poziom 5mdC oraz jej hydroksylowanej pochodnej 5hmdC w narządach badanych zwierząt. Statystycznie istotne różnice w poziomach analizowanych związków obserwowano natomiast w obrębie danego genotypu. Dokładne dane znajdują się w tabelach 1 i 2 w pracy #5, pkt. 5.I.B. Spośród badanych narządów (wątroba, nerka, mózg), w przypadku mózgu odnotowano najwyższy poziom zarówno 5mdC, jak i 5hmdC bez względu na genotyp badanych zwierząt, natomiast porównywalne poziomy analizowanych modyfikacji w obrębie wątroby i nerki. Również analiza korelacji pomiędzy badanymi parametrami wykazała szeroką różnorodność narządową oraz specyficzność genotypową. Spośród najważniejszych korelacji wymienić należy, że wykazano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy 5mdC i białkami p50 i p65 (RelA) w wątrobie szczepów "dzikich" oraz ujemnej pomiędzy 5mdC i p65 w mózgu homozygot *SOD1*^{-/-}. Ponadto stwierdzono występowanie dodatniej korelacji pomiędzy 5mdC i 5hmdC w wątrobie i mózgu znokautowanych myszy. Dokładniejsze dane dotyczące korelacji znajdują się w tabeli 3 w pracy #5.

Ponieważ nasze wcześniejsze badania (praca #2) wykazały wyższy poziom 8-oksydG w wątrobie i nerce homozygot *SOD1*^{-/-} obserwowane korelacje mogą stanowić poparcie tezy mówiącej, że 5hmC może być syntetyzowana jako rezultat oksydacji z udziałem białek TET. Ze względu na fakt, że wszystkie enzymy należące do rodziny białek TET są dioksygenazami zależnymi od jonów Fe(II) i alfa-ketoglutaranu, aktywność tych białek może wykazywać zróżnicowanie zależne od typu tkanki/narządu.

⁴ Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5.

⁵ Schmitt AM, Crawley CD, Kang S, Raleigh DR, Yu X, Wahlstrom JS, Voce DJ, Darga TE, Weichselbaum RR, Yamini B. p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. *Mol Cell*. 2011 Dec 9;44(5):785-96.

Nasze rezultaty stanowią również poparcie wcześniejszych badań stwierdzających najwyższy poziom 5hmC w genomie tkanki nerwowej. Dodatkowo, w oparciu o nasze wcześniejsze rezultaty oraz nieliczne dane literaturowe zasadna wydaje się sugestia o dodatkowym, poza utlenianiem, źródle tej pochodnej w mózgu.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych literaturowych wysunięto tezę sugerującą istnienie procesu aktywnej demetylacji jako narządowo-specyficznego procesu, niekoniecznie w sposób bezpośredni zależnego od stanu redoks komórki. Najbardziej prawdopodobny scenariusz w tym względzie tłumaczy różnorodność narządowo-tkankową, jako podstawę różnego tempa metabolizmu, mogącego oddziaływać na aktywność kofaktorów niezbędnych w procesie demetylacji, jak enzymy z rodziny TET. Nie można również wykluczyć aktywacji innego typu mechanizmów. Natomiast heterogeniczność korelacji pomiędzy analizowanymi markerami epigenetycznymi a aktywnością białek p50 i p65 sugeruje, że choć metylowany DNA postrzegany jest, jako zablokowany dla procesu transkrypcji, nie można wykluczyć, iż w przypadku szlaku NF- κ B istnieją specyficzne tkankowo interakcje pomiędzy białkami NF- κ B a DNA. Nie ulega jednak wątpliwości, że złożoność obserwowanych interakcji nadal pozostaje nie do końca wyjaśnioną.

Ponieważ wśród badaczy zajmujących się oddziaływaniem reaktywnych form tlenu na aktywność szlaku NF- κ B brak jednomyślności, praca #4, pkt. 5.I.B stanowi próbę zebrania aktualnej wiedzy oraz dostępnych danych dotyczących tej tematyki. Poprzez przypomnienie składowych szlaku sygnalizacji komórkowej NF- κ B oraz możliwych ścieżek jego aktywacji, przedstawiłam poszczególne elementy szlaku, mogące ulegać oksydacyjnej modulacji. Wśród ważniejszych oddziaływań reaktywnych form tlenu z białkami szlaku wymienić należy te modyfikujące procesy fosforylacji/defosforylacji oraz utlenianie reszt tiolowych aminokwasów siarkowych. Ponadto przedstawiłam możliwe oddziaływania stanu redoks komórki zarówno aktywujące, jak i hamujące funkcjonowanie szlaku. Ze względu na złożoność szlaku przedstawiłam również istniejące regulacje na poziomie cytoplazmatycznym oraz jądrowym.

Do głównych elementów ulegających modyfikacjom przy udziale RFT niewątpliwie zaliczyć należy inhibitory szlaku, białka I κ Bs, stanowiące centralny element klasycznej drogi aktywacji oraz kinazy tychże białek. Obszerny fragment pracy stanowią dane dotyczące oddziaływań RFT ze ścieżką kinaz MAPK/JNK, interakcje między antyoksydantami jak Cu,Zn-SOD dysmutaza a działaniem szlaku NF- κ B. W części dotyczącej modulacji szlaku na

poziomie jądrowym na uwagę zasługują dane informujące o wpływie RFT na proces transkrypcji genów w sekwencji NF- κ B, w tym na rolę acetylacji/deacetylacji reszt lizyny w obrębie białek p50/p65 w procesie wiązania tego dimeru z DNA oraz posttranslacyjne modyfikacje białka p65. Godne uwagi są ponadto informacje dotyczące procesu utleniania na poziomie białka p50.

Podsumowując należy podkreślić, że stres oksydacyjny stanowi czynnik mogący modulować zarówno cytoplazmatyczne jak i jądrowe składowe szlaku NF- κ B. Oddziaływanie to może być różnorakie, zależne od lokalizacji modulowanych elementów w obrębie samej komórki, czynnika stanowiącego źródło RFT, i co chyba najważniejsze typu/rodzaju komórki czy tkanki. Natomiast stres oksydacyjny stwierdzony u pacjentów z celiakią wydaje się być niezależnym od diety a raczej związanym z genetycznymi uwarunkowaniami oddziałującymi na mechanizmy naprawcze DNA, zaś suplementacja witaminami o aktywności antyoksydacyjnej u tych chorych może stanowić ważny czynnik minimalizujący rozwój nowotworu.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo/badawczych

Poza powyższym, cyklem pięciu prac, będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy obejmuje publikacje, których tematykę stanowi rola stresu oksydacyjnego w patogenezie licznych stanów patologicznych jak choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne, choroby sercowo-naczyniowe oraz oddziaływanie stresu oksydacyjnego na biomolekuły, w szczególności materiał genetyczny. Głównie badania koncentrują się na ocenie oksydacyjnych uszkodzeń zasad azotowych w komórkowym DNA oraz produktów ich reperacji oraz stanie obrony antyoksydacyjnej, głównie witamin o znaczeniu antyoksydacyjnym.

Dodatkowy aspekt badań stanowi rola epigenetyki w patogenezie zmian chorobowych oraz możliwy związek pomiędzy stanem redoks a modyfikacjami epigenetycznymi.

Mój dorobek naukowy obejmuje 34 prace naukowe w prestiżowych czasopismach polskich i zagranicznych w tym 28 prac oryginalnych oraz 6 poglądowych.

Sumaryczny IF moich publikacji wynosi 133.235 i osiąga wartość 785.000 punktów w punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, liczba cytowań wynosi 999 (wg Web of Science), a indeks Hirscha – 17.

5.A. Udział w międzynarodowych i krajowych projektach badawczych

Kierowanie dwoma projektami badawczymi:

MNISW; N301205233 tytuł :Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz aktywność szlaku sygnalizacji komórkowej NF- κ B u myszy pozbawionych genu dysmutazy ponadtlenkowej, heterozygot oraz szczepów „dzikich”. Okres realizacji 15 października 2007-14 października 2009. Kierownik oraz wykonawca projektu.

Grant Rektorski UMK: 02/CM/2013 tytuł: Poziom modyfikacji epigenetycznych u myszy pozbawionych genu dysmutazy ponadtlenkowej, heterozygot i szczepów dzikich, oraz związek analizowanych modyfikacji z aktywnością szlaku NF- κ B u badanych zwierząt. Okres realizacji 25 kwietnia 2013- 24 kwietnia 2014. Kierownik oraz wykonawca projektu.

Udział w 2 projektach międzynarodowych :

1. 6.PR UE “Enviromental cancer risk, nutrition and individual susceptibility (ECNIS)” –FOOD-CT-2005-513943.” Ryzyko zapadalności na choroby nowotworowe: wpływ środowiska, diety i indywidualnej podatności”. Okres realizacji: 2005–2010. Wykonawca
2. 7.PR UE Towards ECNIS Centre for Research and Education on Cancer, Environment and Food (ECNIS2), FP7-KBBE-2010-4 nr 266198. Okres realizacji 2011-2013r. Wykonawca

Udział w 10 projektach krajowych:

3. KBN: PBZ-KBN-091/P05/2003/55, pakiet: „Badania nad molekularną patogenezą nowotworów oraz wykorzystanie metod biologii molekularnej, genomiki i proteomiki dla wczesnego wykrywania, optymalizacji leczenia i rozwoju nowych metod terapii nowotworów złośliwych”. Zadanie: „Zdolność reperacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA jako czynnik predysponujący do nowotworów płuc oraz jelita grubego i odbytnicy”. Okres realizacji 01.11.2003–31.10.2006 -Wykonawca
4. KBN: PBZ-KBN-094/P06/2003 „Weryfikacja zasad technologii wytwarzania i wykorzystania żywności bogatej w naturalne antyoksydanty pod względem jej działania prozdrowotnego”. Zadanie: „Badania kliniczne na ludziach mające na celu powiązanie spożycia antyoksydantów przez osoby zagrożone chorobami nowotworowymi i chorobami układu krążenia z poziomem biomarkerów i rozwojem tych chorób”. Okres realizacji 01.12.2003–31.11.2006 -Wykonawca
5. KBN: Grant PBZ KBN-093/P06/2003 „Sterowanie rozwojem przewodu pokarmowego u noworodków zwierząt w celu zwiększenia ich przeżywalności i poprawy stanu zdrowotnego”. Zadanie: „Wpływ bioaktywnych składników diety na proliferację i apoptozę w procesie dojrzewania nabłonka jelitowego oraz zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki u nowo narodzonych prosiąt”. Okres realizacji 01.12.2003–31.11.2006 - Wykonawca
6. MNiI: 2 P05D 062 27, „Znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń DNA w rozwoju choroby Alzheimera”, okres realizacji: sierpień 2004- luty 2006r, Wykonawca
7. MNiI: 2 P05D 082 26, “Analiza oksydacyjnych uszkodzeń DNA u pacjentów chorych na nowotwory poddanych chemioterapii; czy oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą być biomarkerami oceniającymi skuteczność terapii?” Okres realizacji: 24.03.2004-23.03 2006. Wykonawca.
8. MNiI: PBZ-MNiI-2/1/2005 „Badania zaburzeń w szlakach przekazywania informacji komórkowej w patogenezie nowotworów z wykorzystaniem metod genomiki integracyjnej” Zadanie „Badania procesów oksydacyjnych w patogenezie nowotworów z wykorzystaniem metod genomiki integracyjnej” Okres realizacji 21.11.2006- 2.11.2009 - Wykonawca

9. MNI: N401 055 32/1380, – Czy mutacje konstytucyjne genu BRCA1 wpływają na poziom stresu oksydacyjnego/oksydacyjnych uszkodzeń DNA? Okres realizacji: 18.05.2007 – 17.11.2009. Wykonawca.
10. MNI: 0081/B/P01/2008/35 – Znaczenie stresu oksydacyjnego w rozwoju miażdżycy tętnic szyjnych. Okres realizacji 19.09.2008. – 18.09.2010. Wykonawca.
11. MNiSW: N N401 280039 – Badanie związku pomiędzy aktywnością oraz ekspresją polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) a poziomem stresu oksydacyjnego/oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz stopniem zaawansowania oraz progresją nowotworu u pacjentów z rakiem jelita grubego. Okres realizacji: 8.11.2010 -7.05.2014. Wykonawca.
12. MNiSW: NN407171439 – Ocena wpływu stresu oksydacyjnego/modyfikacji DNA na płodność mężczyzn. Okres realizacji: 3.11.2010– 2.05.2014. Wykonawca

5.B. Uzyskane nagrody

Warszawa 2006 - Zespołowa Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za współautorstwo cyklu prac pt. „Znaczenie uszkodzeń DNA indukowanych reaktywnymi formami tlenu w patogenezie raka płuc”.

Warszawa 2008 - Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia za cykl sześciu publikacji z zakresu biochemii kwasów nukleinowych p.t. ”Kliniczne znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń DNA”.

Toruń 2008 - Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2007 roku.

Toruń 2010 - Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2009 roku.

Toruń 2011 - Zespołowa Nagroda I stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2010 roku.

Toruń 2014 - Zespołowa Nagroda II stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w działalności naukowo-badawczej w 2013 roku.

Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w programie „Start” dla młodych naukowców. Dwukrotnie 2007 i 2008r.

Agnieszka Siomeli-Górecka