

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu



Załącznik 3

Autoreferat w języku polskim

Dr n. farm. Ewa Totoń

Poznań 2019

- 1. Imię i nazwisko:** Ewa Totoń (nazwisko panieńskie Ciężka)
- 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej**

Dyplom magistra analityki medycznej – Nr 590/2001 uzyskany dnia 24 września 2001 roku, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (aktualnie Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu), Wydział Farmaceutyczny, Oddział Analityki Medycznej. Praca magisterska pt. „Wpływ pochodnych nitroimidazolu na kinazy białkowe erytrocytu” realizowana w Zakładzie Chemii Klinicznej, Katedry Biochemii Farmaceutycznej.

Promotor: Prof. dr hab. Maria Rybczyńska.

Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego - PWZDL – seria AA06039 nadany dnia 15 października 2003 roku uchwałą Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych w Warszawie (Uchwała Nr 31/2003).

Stopień doktora nauk farmaceutycznych (dyplom z wyróżnieniem) nadany w dniu 09 lipca 2008 roku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP), Wydział Farmaceutyczny. Dysertacja pt. „Badanie zależności między kinazą białkową C epsilon a kinazą ogniskowo-adhezyjną komórek nowotworowych w procesie adhezji”, realizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP.

Promotor: Prof. dr hab. Maria Rybczyńska.

- 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

01.10.2001 – 31.12.2001 - starszy referent inżynierijno – techniczny
Zakład Chemii Klinicznej, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

01.01.2002 – 31.12.2002 – asystent do określonych zadań

Zakład Chemii Klinicznej, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

01.01.2003 – 01.10.2009 – asystent

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (CKDM UMP)

01.10.2009 – 16.02.2018 – adiunkt

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (od grudnia 2016 kierownik Pracowni Analizy Białek)

2018 – nadal – starszy wykładowca, kierownik Pracowni Analizy Białek,

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Badanie molekularnego mechanizmu regulacji apoptozy i autofagii przez onkogenną kinazę białkową C epsilon w komórkach nowotworowych

Podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi spójny cykl pięciu prac (czterech publikacji oryginalnych i jednej pogładowej), opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W pracach przedstawiono wyniki badań dotyczących poznania molekularnych modyfikacji transdukcji sygnału z udziałem kinazy białkowej C epsilon (PKCε) w szlaku apoptozy i autofagii.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1. Dorota Garczarczyk, **Ewa Totoń**, Verena Biedermann, Erika Rosivatz, Florian Rechfeld, Maria Rybczyńska, Johann Hofmann. Signal transduction of constitutively active protein kinase C epsilon. *Cell. Signal.* 2009; 21(5): 745-52. **IF = 4,094; Punktacja MNiSW = 32, liczba cytowań: 21**

H2. **Ewa Totoń**, Ewa Ignatowicz, Karolina Skrzeczkowska, Maria Rybczyńska. Protein kinase Cε as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacol. Rep.* 2011; 63(1):19-29. **IF = 2,445; Punktacja MNiSW = 25, liczba cytowań: 31**

H3. **Ewa Totoń**, Natalia Lisiak, Błażej Rubiś, Jaromir Budzianowski, Peter Gruber, Johann Hofmann, Maria Rybczyńska. The tetramethoxyflavone zapotin selectively activates protein kinase C epsilon, leading to its down-modulation accompanied by Bcl-2, c-Jun and c-Fos decrease. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 682(1-3): 21-8. **IF = 2,592; Punktacja MNiSW = 25, liczba cytowań: 2**

H4. Ewa Totoń, Aleksandra Romaniuk, Jaromir Budzianowski, Johann Hofmann, Maria Rybczyńska. Zapotin (5,6,2',6'-tetramethoxyflavone) modulates the crosstalk between autophagy and apoptosis pathways in cancer cells with overexpressed constitutively active PKC. *Nutr. Cancer*, 2016; 68(2): 290-304.

IF = 2,447; Punktacja MNiSW = 20, liczba cytowań: 4

H5. Ewa Toton, Aleksandra Romaniuk, Natalia Konieczna, Johann Hofmann, Jan Barciszewski, Maria Rybczynska. Impact of PKC ϵ downregulation on autophagy in glioblastoma cells. *BMC Cancer*, 2018; Vol. 18 (1): 185.

IF = 3,288; Punktacja MNiSW = 30, liczba cytowań: 0

Publikacje stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego oznaczone są w tekście cyframi od **H1** do **H5**.

Łączny Impact Factor dla tych pięciu prac wynosi: 14,866

Łączna punktacja MNiSW dla tych pięciu prac wynosi: 132

Łączna liczba cytowań wg Web of Science (WoS): 58

Badania opisane w **publikacji H1** są efektem międzynarodowej współpracy z prof. Johannem Hofmannem z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku (Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Innsbruck Medical University) i były finansowane przez Austriacką Fundację Nauki (The Austrian Science Fund, Granty: P15039, P16477). Poglądowa **publikacja H2** była finansowana z funduszu przeznaczonego na działalność statutową Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP (502-01-03318432-02496). Wyniki badań zawarte w **publikacji H3** były finansowane z środków przyznanych w ramach funduszu statutowego Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP (502-01-03318432-02496) oraz w ramach współpracy międzynarodowej z prof. Johannem Hofmannem (Austriacka Fundacja Nauki, Granty: P15039-B12, 19878-B12). Wyniki badań, zawarte w **publikacjach H4 i H5** były prowadzone w ramach projektu badawczego nr UMO-2011/03/B/NZ7/06244, pt. „Ocena możliwości modyfikacji udziału PKC epsilon w procesie autofagii komórek nowotworowych”, realizowanego w latach 2012-2015 i finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego byłam współpomysłodawcą i głównym wykonawcą.

Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonywanych prac i procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku 5.

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 6.

Analiza bibliometryczna potwierdzająca punktacje IF oraz MNiSW, sporządzona przez Bibliotekę Główną UMP, znajduje się w załączniku 7.

Kopie prac H1-H5 wskazanych, jako osiągnięcie naukowe zestawiono w załączniku 8.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wprowadzenie

Dane epidemiologiczne dotyczące zjawiska zachorowań na nowotwory złośliwe wskazują, że jest to jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Pomimo ogromnego postępu nauki w dziedzinie biologii komórki i ciągłego poszerzania wiedzy na temat patogenezы chorób nowotworowych, prace nad stworzeniem skutecznej metody leczenia nie przyniosły dotąd oczekiwanych rezultatów. Najpoważniejszym problemem w walce z nowotworami jest proces ciągłego, niekontrolowanego namnażania się komórek nowotworowych. Wiele lat badań pokazało, że u podstaw procesu kancerogenezy leży zaburzona transdukcja ścieżek sygnałowych mających znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania komórki. Efektem rosnącej w tym zakresie świadomości jest choćby test FLAVINO, którego ideą jest stworzenie indywidualnej terapii, dedykowanej konkretnemu profilowi metabolicznemu i genetycznemu określonego nowotworu.

Kinazy białkowe stały się przedmiotem szczególnego zainteresowania w kontekście farmakologii, kiedy to w latach 80-tych ubiegłego wieku zaczęły pojawiać się informacje o ich znaczącej roli w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Ludzki genom koduje ponad 500 kinaz białkowych, które zostały w roku 2002 określone przez Manninga mianem kinomu (Manning i wsp., 2002). Oddziaływanie kinaz z białkami polega na ich fosforylowaniu, czyli przeniesieniu grupy fosforanowej z wysokoenergetycznego związku ATP na hydroksylową grupę reszt aminokwasów - seryny, treoniny lub tyrozyny w łańcuchu białka docelowego. Konsekwencją tego faktu

jest zmiana aktywności białek docelowych, ich lokalizacja subkomórkowa oraz powinowactwo do innych białek. Kinazy regulują niemal wszystkie ścieżki biochemiczne i mogą fosforylować do 30% całego proteomu. Deregulacje funkcji kinaz białkowych są ściśle związane z rozwojem wielu stanów patologicznych włączając w to choroby nowotworowe (Klein i Levitzki, 2006; Cooke M., 2017).

Kinaza białkowa C epsilon (PKC ϵ) zaliczana jest do klasy nowych serynowo-treoninowych kinaz białkowych C (nPKC), które aktywowane są przez DAG (diacyloglicerol), estry forbolu, ale nie wykazują wrażliwości na jony Ca²⁺ (Gorin i wsp., 2009). PKC ϵ , kodowana przez gen *PRKCE* zlokalizowany na chromosomie 2p21, zbudowana jest z 737 aminokwasów. Aktywacja izozymu PKC ϵ odgrywa w komórce wielotorową rolę. Uczestniczy ona w procesach takich jak: proliferacja, różnicowanie, ekspresja genów, metabolizm, transport, skurcz mięśni oraz adaptacja do wysiłku fizycznego (Ikeda i wsp., 2001; Kao i wsp., 2008; Akita, 2008; Rechfeld i wsp., 2014). Dodatkowo reguluje procesy zapalne i wywiera wpływ na układ immunologiczny (Akita Y., 2002) oraz uczestniczy w regulacji wzrostu i formowania się komórek nerwowych (Zeidman i wsp., 2002).

Liczne doniesienia naukowe dowodzą, że izoforma PKC ϵ charakteryzuje się największym potencjałem onkogennym wśród wszystkich izoform tej rodziny (Basu i wsp., 2007). Nadekspresja PKC ϵ została udowodniona w licznych typach komórek nowotworowych i odgrywa kluczową rolę niemal we wszystkich aspektach kancerogenezy. Należą do nich m.in: transformacja komórkowa, proliferacja, przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT), reorganizacja cytoszkieletu, a także oporność na terapię (Akita Y., 2002; Gorin i wsp., 2009; Jain i Basu, 2014). Mechanizm promocji nowotworowej jest związany z udziałem białka ras na poziomie aktywacji kinazy Raf-1 (Basu i wsp., 2007). Konstytutywnie wysoki jej poziom zaobserwowano m.in. w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego, mózgu, skóry, piersi, wątroby, żołądka, tarczycy, płuc i prostaty (do Carmo i wsp., 2013; Kang 2014). Odgrywa ona istotną rolę nie tylko w rozwoju nowotworu, ale także w inwazji komórek nowotworowych i tworzeniu przerzutów do innych tkanek (Ivaska i wsp., 2002; Pan i wsp., 2005).

Ze względu na fakt, iż nadekspresja PKC ϵ nie występuje w komórkach prawidłowych, przypuszcza się, że białko to może stanowić ważny biomarker i potencjalny cel dla terapii przeciwnowotworowych. Dobór odpowiednich celowanych

terapii w leczeniu chorób nowotworowych jest wciąż wielkim wyzwaniem dla medycyny, dlatego też prace badawcze skupiające się na selektywnym hamowaniu aktywności PKC ϵ w komórkach nowotworowych idealnie wpisują się w ten nurt badań. Znaczenie zagadnień dotyczących funkcji kinazy białkowej C epsilon oraz jej potencjalnego udziału we współczesnych strategiach leczenia chorób nowotworowych zostało przeze mnie opisane we włączonej do cyklu prac pracy poglądowej (**publikacja H2**).

Cel badań

Głównym celem badań, przedstawionym w publikacjach składających się na cykl prac stanowiący osiągnięcie naukowe, była charakterystyka transdukcji sygnału z udziałem onkoproteiny PKC ϵ w komórkach nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją PKC ϵ oraz możliwość molekularnych modyfikacji tej transdukcji w celu indukcji procesu programowanej śmierci komórek nowotworowych z wysokim poziomem PKC ϵ .

Realizację zaplanowanych badań przeprowadzono w następujących etapach:

1. Zbadano rolę konstytutywnie aktywnej PKC ϵ w procesie transdukcji sygnału w komórkach nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją PKC ϵ .
2. Oceniono efekt działania substancji pochodzenia naturalnego (zapotyny) na przesyłanie sygnału z udziałem PKC ϵ w komórce w celu identyfikacji mechanizmu indukcji śmierci komórek nowotworowych z wysokim poziomem onkoproteiny PKC ϵ .
3. Zbadano czy poprzez ingerencję w ekspresję genu *PRKCE* (zastosowanie interferencji RNA) i/lub aktywność białka PKC ϵ można przyczynić się do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych charakteryzujących się wysokim poziomem onkoproteiny PKC ϵ na drodze indukcji procesu apoptozy lub autofagii?

Omówienie wyników

Transdukcja sygnału z udziałem PKC ϵ w komórkach nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ

Coraz więcej dowodów wskazuje, że nadekspresja PKC ϵ związana jest z proliferacją, różnicowaniem, adhezją i migracją komórek oraz hamowaniem procesu apoptozy. Jednakże dostępne dane literaturowe nie wyjaśniają do końca mechanizmu, poprzez który PKC ϵ wywołuje przytoczone efekty. W wielu przypadkach, podejmując próby wyjaśnienia drogi przesyłania sygnału z udziałem PKC ϵ prowadzone były badania z wykorzystaniem estrów forbolu (TPA), będących egzogennym aktywatorem, który przyłączając się do domeny regulatorowej w miejscu wiązania aktywatora endogennego – diacyloglicerolu (DAG), aktywuje (między innymi) PKC ϵ . Stymulacja aktywności kinazy wywołana działaniem estrów forbolu powoduje fosforylację wielu białek cytozolowych i błonowych prowadząc do mobilizacji ścieżek przesyłania sygnału. Niestety, taki model jest niewystarczający dla wyjaśnienia transdukcji sygnału z udziałem PKC ϵ , ponieważ TPA wykazuje dwojaki charakter działania. Krótkotrwałe traktowanie TPA zwykle prowadzi do aktywacji enzymu, natomiast długotrwałe traktowanie wywołuje efekt przeciwny. Dlatego też w podjętych przeze mnie badaniach prowadzących do identyfikacji mechanizmu transdukcji sygnału z udziałem PKC ϵ w komórkach nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją tej kinazy wykorzystałam, jako model eksperymentalny, zmutowany enzym PKC ϵ o konformacji konstytutywnie otwartej/aktywnej (PKC ϵ A/E) (**publikacja H1**). Badania prowadziłam we współpracy z prof. Johannem Hofmannem i jego zespołem z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku (Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Innsbruck Medical University), natomiast komórki linii raka szyjki macicy HeLaPKC ϵ A/E, otrzymałam dzięki uprzejmości dr. Gottfieda Baier z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku (Institute of Medicinal Biology and Human Genetics, Innsbruck Medical University). Komórki te wykazują ekspresję odpowiadającego na tetracyklinę/doksycyklinę aktywatora transkrypcyjnego pBI Tet-on uzyskaną w wyniku transfekcji plazmidem pBI-PKC ϵ A/E z konstytutywnie aktywną izoformą ϵ kinazy białkowej C (PKC ϵ). Modyfikacja była wynikiem zastąpienia alaniny (A) kwasem glutaminowym (E) w pozycji 159 aminokwasu regionu pseudosubstratowego tego enzymu. Efektem tej mutacji jest ciągła aktywność enzymu, ponieważ ujemny ładunek

kwasu glutaminowego naśladuje grupę fosforanową, co utrzymuje enzym w konformacji otwartej umożliwiając związanie i ufosforylowanie substratu (**publikacja H1**).

Na początku moje badania skoncentrowały się na uzyskaniu w badanych komórkach linii HeLaPKCεA/E nadekspresji konstytutywnie aktywnej PKCε. Aby uzyskać model eksperymentalny z nadekspresją PKCεA/E badane komórki potraktowano induktorem, pochodną tetracykliny – doksycykliną w stężeniu 2 µg/ml. Miarą indukcji zmutowanego genu *PRKCE A/E* była obecność konstytutywnie aktywnej PKCε, którą wykazano techniką elektroforezy i Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał. Uzyskane wyniki przedstawione w **publikacji H1** pokazały, że największa ilość konstytutywnie aktywnej PKCε występuje po 24-godzinnej indukcji genu doksycykliną. Co istotne, indukcja genu doksycykliną ujawniła obecność dwóch izoform konstytutywnie aktywnej PKCε: jednej o ciężarze 87 kDa i drugiej - 95 kDa, o różnym stopniu ufosforylowania kluczowej dla aktywności białka seryny w pozycji 729 (S⁷²⁹). Dodatkowo, komórki poddano działaniu egzogenego aktywatora fosforylacji – TPA (12-*O*-tetradekanoiloforbol-13-octan) w celu zbadania zdolności konstytutywnie aktywnej PKCε do generowania odpowiedzi w wyniku związania estrów forbolu. Eksperyment ten przeprowadzono w celu zbadania i porównania stopnia ufosforylowania seryny 729 konstytutywnie aktywnej PKCε po działaniu tylko induktora oraz po działaniu samego aktywatora. Uzyskane wyniki jednoznacznie dowiodły istnienia aktywnej formy PKCεA/E w komórkach linii HeLaPKCεA/E po indukcji doksycykliną, bez konieczności stosowania TPA, wykazującego plejotropowy mechanizm działania.

PKCε w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe ulega translokacji do różnych przedziałów komórki. Badania wielu autorów wskazują na różną subkomórkową lokalizację PKCε zależną od statusu jej aktywacji. Obserwacje England i Rumsby sugerują, że fosforylacja i defosforylacja seryny w pozycji 729 PKCε ma kluczowe znaczenie dla precyzowania lokalizacji tego enzymu w komórce (England i Rumsby, 2000). Obecność PKCε zaobserwowano w cytoplazmie, aparacie Golgiego, w błonie komórkowej oraz w pobliżu jądra komórki (Stanwell i wsp., 1994; Goodnighta i wsp., 1995). Uwzględniając powyższe informacje, nasuwa się zatem pytanie jak wygląda wewnątrzkomórkowa lokalizacja kinazy białkowej C ε występującej w nadekspresji w komórkach nowotworowych. W celu znalezienia

odpowiedzi na to pytanie, w kolejnym etapie własnych badań, podjęłam zadanie badawcze, polegające na ocenie subkomórkowej lokalizacji konstytutywnie aktywnej PKCε w badanych komórkach linii HeLaPKCεA/E po indukcji genu doksycykliną. Przedstawione w **publikacji H1** badania z zastosowaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej z immunoidentyfikacją wykazały, że w komórkach nieindukowanych doksycykliną (kontrolnych) kinaza PKCεA/E lokalizuje się głównie w cytoplazmie oraz w mniejszym stopniu w okolicach jądra komórkowego. Natomiast wydłużenie czasu indukcji (24 lub 48 godz.) skutkuje translokacją kinazy do aparatu Golgiego, gdzie jej występowanie potwierdzono poprzez kolokalizację z syntaksynem 11, markerem stosowanym do detekcji aparatu Golgiego. Jej niewielką ilość wykazano również w cytoplazmie i błonie komórkowej. Z kolei badania przeprowadzone z egzogennym aktywatorem kinazy, TPA, wykazały translokację konstytutywnie aktywnej PKCε głównie do błony komórkowej.

Uzyskane wyniki jednoznacznie dowiodły, że w zależności od drogi aktywacji konstytutywnie aktywnej PKCε (induktor ekspresji genu lub TPA) ulega ona translokacji do różnych kompartmentów komórki (aparat Golgiego, błona komórkowa). Dane te sugerują, że subkomórkowa lokalizacja ufosforylowanej PKCεA/E może determinować zdolność kinazy do mobilizacji różnych ścieżek przesyłania sygnału prowadząc do aktywacji lub inhibicji wielu procesów biologicznych zachodzących w komórkach nowotworowych.

Badania wielu autorów donoszą, że PKCε wykazuje onkogenny charakter (Cacace i wsp., 1993; Mischak i wsp., 1993), jednakże są i takie, które wskazują, że PKCε hamuje proliferację komórek (Petrovics i wsp., 2002). W związku z powyższym w kolejnym etapie badań oceniłam *in vitro* potencjał proliferacji oraz zdolność formowania kolonii przez komórki nowotworowe z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKCε, bez udziału aktywatora TPA. Wyniki zaprezentowane w **publikacji H1** pokazały podobny stopień proliferacji komórek z nadekspresją PKCεA/E, jak i kontrolnych, nietraktowanych induktorem, wykazany poprzez określenie „czasu podwojenia komórek” (*ang. cell doubling time*). Natomiast, co ciekawe, zaobserwowałam, że komórki HeLaPKCεA/E hodowane w obecności induktora genu *PRKCE A/E* (doksycykliny) cechuje większa zdolność do tworzenia kolonii w półpłynnym agarze w porównaniu z komórkami hodowanymi bez obecności induktora. Uzyskane przeze mnie dane wskazują, że zlokalizowana w aparacie

Golgiego ufosforylowana PKC ϵ A/E jest zaangażowana w proces proliferacji niezależnie od zjawiska przyczepiania do podłoża (*ang. anchorage independence of growth*).

Jak wiadomo, wiele aktywności komórkowych, tj. proliferacja, różnicowanie, adhezja i ruchliwość są modulowane przez interakcje PKC ϵ ze strukturami cytoszkieletu (Akita Y., 2002; Cacace i wsp., 1993). Adhezja komórek odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu migracji, dlatego też w kolejnym etapie badań postanowiłam ocenić proces adhezji komórek nowotworowych z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ . Posłużyłam się w tym badaniu testem funkcjonalnym z zastosowaniem podłoża żelatynowego, naśladującego *in vitro* macierz zewnątrzkomórkową (ECM). Przedstawione w **publikacji H1** wyniki wskazały na brak różnicy w adhezji do macierzy żelatynowej komórek HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją PKC ϵ A/E w porównaniu z komórkami kontrolnymi, nieindukowanymi. Wykazano natomiast wzrost adhezji komórek HeLaPKC ϵ A/E po potraktowaniu aktywatorem fosforylacji – TPA (5 minut). Uzyskane wyniki jednoznacznie dowodzą, że zlokalizowana w aparacie Golgiego aktywna PKC ϵ A/E nie wpływa na adhezję komórek, natomiast zlokalizowana w błonie komórkowej PKC ϵ A/E (po potraktowaniu TPA) uczestniczy w aktywacji procesu przylegania komórek do macierzy ECM. Interakcje między komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową są niezbędne dla przeżycia i rozwoju komórki. Utrata wewnątrzkomórkowych kontaktów jest jedną z przyczyn ułatwiających migrację komórek nowotworowych (Jain i Basu, 2014).

Otrzymane wyniki własne dotyczące procesu adhezji przyczyniły się do podjęcia kolejnych badań polegających na ocenie zaangażowania konstytutywnie aktywnej PKC ϵ w proces migracji komórek. Eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem testu, polegającego na obserwacji „zarastania” przez komórki wolnej powierzchni naczynia hodowlanego, utworzonej za pomocą jałowego skrobaka (*ang. scratch test*). Wykazano, że komórki kontrolne nieindukowane doksycykliną nie migrują do wolnej przestrzeni utworzonej poprzez zeskrabanie komórek. Z kolei komórki traktowane induktorem genu *PRKCE A/E* przez okres 12 godzin wykazują ruchliwość i znacząco zarastają wolną przestrzeń. Natomiast, co ciekawe, komórki, które były pierwotnie traktowane induktorem genu przez 4 godziny a po zeskrabaniu dodatkowo traktowane przez następne 12 godzin doksycykliną, wykazują największą ruchliwość i zdolność migracji do wolnej przestrzeni. Ponieważ ten efekt został

wygenerowany tylko przy użyciu induktora genu (doksycykliny) bez udziału TPA, można jednoznacznie stwierdzić, że konstytutywnie aktywna PKC ϵ jest zaangażowana w proces migracji komórek bez współuczestnictwa innych izozymów kinazy białkowej C.

Inwazyjność i zdolność komórek nowotworowych do metastazy jest najpoważniejszym problemem w walce z rakiem. Coraz więcej dowodów wskazuje, że zaburzenia w adhezji są istotnym czynnikiem generującym inwazyjność komórek nowotworowych (Chun i wsp, 1996; Basu i wsp. 2007). W celu wykazania zaangażowania konstytutywnie aktywnej PKC ϵ w proces inwazji, w kolejnym etapie oceniłam zdolność komórek HeLaPKC ϵ A/E do przenikania przez pory o określonej wielkości, zlokalizowane na membranie, w odpowiedzi na chemoatraktanty. Analizę przeprowadziłam przy użyciu fluorymetrycznego testu z wykorzystaniem zmodyfikowanych komór Boydena zawierających membrany pokryte kolagenem. Migracja komórki w określonym kierunku jest inicjowana przez gradient czynników wzrostu lub chemokin, a także przez bodźce mechaniczne np. rozciąganie komórki (Calvin i wsp., 2014). Przedstawione w **publikacji H1** wyniki jednoznacznie wskazały większą inwazyjność komórek HeLaPKC ϵ A/E hodowanych w obecności induktora genu *PRKCE A/E* w porównaniu do komórek nieindukowanych. Co istotne, tutaj również, podobnie jak w przypadku oceny migracji komórek, nie wykazano zwiększenia inwazyjności po działaniu aktywatora TPA. Te wyniki jednoznacznie wskazują, że PKC ϵ A/E zlokalizowana w aparacie Golgiego, jest zaangażowana we wzrost potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych z wysokim poziomem onkoproteiny PKC ϵ .

Analizując otrzymane dotychczas wyniki zaobserwowałam, że konstytutywnie aktywna PKC ϵ zlokalizowana w aparacie Golgiego i konstytutywnie aktywna PKC ϵ zlokalizowana w błonie komórkowej prowadzą do odmiennej mobilizacji komórkowej w wyniku transdukcji sygnału z ich udziałem. Istotne, zatem było szczegółowe zidentyfikowanie mechanizmu drogi przesyłania tego sygnału. W tym celu wykorzystując technikę elektroforezy i Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał oceniłam wpływ nadekspresji PKC ϵ A/E na ekspresję innych izozymów PKC (α , β II, δ , ζ) w komórce oraz status fosforylacji białek zaangażowanych w kaskadę przesyłania sygnału z udziałem PKC ϵ tj. pMARCKS^{S152/S156}, p38MAPK^{T180/Y182}, pERK2^{T185/T187}, pElk-1, pPDK1^{S241}, pNMP^{S4} i pRB^{S807/S811}. Jednoznacznie dowiodłam,

że nadekspresja PKCεA/E wywołana działaniem doksycykliny manifestuje się wzrostem poziomu fosforylacji seryny 729 a w konsekwencji prowadzi do ulokowania się tej kinazy w aparacie Golgiego. Wykazałam wzrost ufosforylowania Elk-1^{S383}, pPDK1^{S241} i pRB^{S807/S811} oraz większą zdolność do tworzenia kolonii w półpłynnym agarze. Dodatkowo pokazałam, że w tych warunkach, komórki HeLaPKCεA/E cechuje większa zdolność do migracji i inwazji komórek, ale co istotne, brak zdolności do nadmiernej proliferacji. Z piśmiennictwa wiadomo, że uczestniczący w kaskadzie sygnałowej Ras-Raf-MAPK, ufosforylowany czynnik transkrypcyjny Elk-1 prowadzi do aktywacji ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost, podział i różnicowanie komórek, również aktywna PDK1 jest niezbędna dla przekazywania sygnałów stymulujących rozwój komórek i ich progresję (Chang i wsp., 2001; Molina i wsp., 2006).

Wyniki prezentowane w **publikacji H1**, wymownie wskazują, że występująca w nadekspresji konstytutywnie aktywna PKCε w komórkach nowotworowych, w zależności od miejsca lokalizacji może indukować różne ścieżki przesyłania wewnątrzkomórkowego sygnału, a co za tym determinować odmienne biologiczne zachowanie się komórek. W niniejszych badaniach wykazałam, co stanowi *novum*, że aktywacja kaskady sygnału z aparatu Golgiego z udziałem onkoproteiny PKCε jest wystarczająca do nabycia przez komórki nowotworowe zdolności do migracji i inwazji, do inhibicji apoptozy poprzez fosforylację białka retinoblastoma (pRB^{S807/S811}) oraz do wzrostu potencjału proliferacji komórek bez możliwości przyczepiania do podłoża.

PKCε jako potencjalny cel dla terapii przeciwnowotworowych

Stosowane współcześnie algorytmy walki z chorobami nowotworowymi niejednokrotnie są nieefektywne, przez co skłaniają nas do poszukiwania coraz to nowych, bardziej skutecznych metod leczenia. Zahamowanie określonych szlaków molekularnych procesu onkogenezy, poprzez ingerencję w ekspresję i/lub aktywność odpowiednich białek przekaźnikowych, stanowi ideę nowych terapii celowanych w leczeniu chorób nowotworowych oraz rzutuje na poprawę efektów leczenia i wyraźnie zwiększa rokowania pacjentów na przeżycie (**publikacja H2**; Kang J., 2014). Wydaje się, że PKCε ze względu na jej onkogenny charakter może stanowić potencjalny cel dla terapii przeciwnowotworowych. Dlatego też w dalszym etapie podjętych przeze mnie zadań badawczych postanowiłam odpowiedzieć na

pytanie czy poprzez wyciszenie ekspresji, zastosowanie interferencji RNA (siRNA) do PKCε i/lub zmianę aktywności tego enzymu za pomocą modulatorów możemy spowodować skuteczną eliminację komórek nowotworowych z nadekspresją kinazy białkowej C epsilon poprzez indukcję procesu programowanej śmierci komórki (apoptozy lub autofagii).

Zapotyna (5,6,2',6'-tertametoksyflawon), wyizolowany z liści *Primula veris* L., selektywnie aktywując PKCεA/E prowadzi do indukcji śmierci komórek nowotworowych z nadekspresją onkoproteiny PKCε

Flawony, przedstawiciele flawonoidów, charakteryzują się obecnością 15-węglowego szkieletu, który może być podstawiony jedną lub kilkoma grupami hydroksylowymi lub metoksyłowymi. Flawony stanowią integralną część ludzkiej diety ze względu na szeroko rozpowszechnione ich występowanie w środowisku roślinnym. Znajdują się m.in. w cytrusach, pomidorach, oliwkach, pietruszce, owocu głogu, liściu lipy, zielu skrzypu polnego oraz selerze. Dostępne w piśmiennictwie dane wskazują, że flawony wykazują właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antymutagenne, antyproliferacyjne i proapoptotyczne. Dodatkowo dowiedziono, że flawony stanowią ważną grupę związków o działaniu chemoprewencyjnym (Akao i wsp., 2008; Babenko i wsp. 2008). Udowodniono, że poprzez udział w hamowaniu proliferacji oraz indukcji apoptozy flawony chronią przed rozwojem raka jelita grubego, piersi, prostaty i okrężnicy (Kandaswami i wsp., 2005; Pan i wsp., 2005; Lepley i wsp., 2006). Liczne badania potwierdziły wysoki potencjał antyproliferacyjny dwóch polimetoksyflawonów: tangeretinu i nobiletinu (Morley i wsp., 2007; Miyata i wsp., 2008). Zapotyna (*ang. zapotin*; 5,6,2',6'-tetrametoksyflawon) jest występującym w środowisku naturalnym przedstawicielem tetrametoksyflawonów. Dowiedziono, że zapotyna również wykazuje właściwości przeciwnowotworowe. Hamuje indukowaną TPA aktywność dekarboksylazy ornityny w komórkach ludzkiego raka pęcherza moczowego (T24) i aktywność NF-κB w komórkach ludzkiego raka wątroby (HepG2) (Maiti i wsp., 2007) oraz wpływa na wzrost, różnicowanie i apoptozę komórek linii HT29 i HL-60 (Murillo i wsp., 2007; Walle 2007).

Uwzględniając powyższe dane postanowiłam w kolejnym etapie badań własnych zbadać wpływ zapotyny na przeżywalność komórek nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKCε. Jak dotąd

w literaturze nie ma doniesień na temat wpływu zapotyny na transdukcję sygnału z udziałem onkogennej PKC epsilon w komórce nowotworowej. Badania realizowałam we współpracy z prof. dr hab. Jaromirem Budzianowskim i jego zespołem z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W ramach tej współpracy otrzymałam do badań wyizolowany z liści *Primula veris* L. (Pierwiosnek prawdziwy) i zidentyfikowany 5,6,2',6'-tetrametoksyflawon – zapotyne. Nadrzędnym celem moich badań była ocena wpływu zapotyny na przeżywalność komórek nowotworowych z wysokim poziomem onkoproteiny PKCε oraz sprawdzenie czy badany związek poprzez możliwość modyfikacji ekspresji i aktywności PKCε kieruje komórki nowotworowe na drogę programowanej śmierci komórki, apoptozy lub autofagii (**publikacja H3** i **publikacja H4**). Mechanizm działania zapotyny wykazano w użyciu technik: elektroforezy i Western blot z immunoidentyfikacją, cytometrii przepływowej, PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz mikroskopii konfokalnej. Jako model badawczy wykorzystałam scharakteryzowane komórki raka szyjki macicy z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKCε (HeLaPKCεA/E) (**publikacja H1**) oraz komórki raka szyjki macicy typu dzikiego HeLaWT (*HeLa wild-type cells*). Nadekspresję konstytutywnie aktywnej PKCε, dla realizacji planowanych badań, uzyskałam poprzez indukcję ekspresji genu *PRKCE A/E* doksycykliną zastosowaną w stężeniu 2 μg/ml przez 24 godziny. W wyniku przeprowadzonej oceny cytotoksyczności za pomocą testu MTT wykazałam, że linia komórkowa z nadekspresją PKCεA/E (HeLaPKCεA/E) charakteryzuje się dużo większą wrażliwością na działanie zapotyny ($IC_{50} = 7,6 \pm 1,3 \mu M$) w porównaniu do komórek HeLaWT ($IC_{50} = 17,9 \pm 1,6 \mu M$) (**publikacja H3**). Niższa wartość IC_{50} wykazana dla komórek linii nowotworowej z nadekspresją PKCεA/E sugeruje, że PKCε może być zaangażowana w indukowaną zapotyne ścieżkę przesyłania sygnału prowadzącą do śmierci komórek. W związku z powyższym oceniłam *in vitro* w kolejnym etapie badań wpływ zapotyny na aktywność różnych izozymów rodziny PKC. Badaniu poddałam dziesięć rekombinantów enzymu PKC (α, βI, βII, γ, δ, ε, η, θ, ι, ζ). Przedstawione w **publikacji H3** wyniki jednoznacznie pokazały, że zapotyne selektywnie aktywuje tylko izoformę ε kinazy białkowej C. Pozostałe izozymy PKC nie wykazują wrażliwości na działanie zapotyny.

Jak donoszą liczne prace, zazwyczaj aktywacja izozymów rodziny PKC prowadzi do obniżenia ich ekspresji. Dlatego też w kolejnym etapie badań oceniłam

wpływ zapotyny na poziom białka PKC ϵ w komórkach HeLaPKC ϵ A/E po indukcji genu doksycykliną. Wykazałam, że indukowana doksycykliną ekspresja PKC ϵ A/E ulega obniżeniu pod wpływem działania zapotyny. Największy efekt down-modulacji PKC ϵ A/E wywołany działaniem zapotyny występuje po 24 godzinach traktowania komórek badanym związkiem (**publikacja H3**). Dodatkowo, aby wykazać, że efekt ten jest specyficzny dla białka PKC ϵ przeprowadzono badanie oceny wpływu zapotyny na ekspresję najbliższego dla PKC ϵ homologa – izoformy δ PKC. Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w poziomie ekspresji PKC δ pod wpływem działania zapotyny, co jednoznacznie dowodzi, że zapotyna jest selektywnym aktywatorem kinazy PKC ϵ i jednocześnie czynnikiem obniżającym poziom jej ekspresji. Związki, tj. TPA, ingerol czy bryostatyna również są powszechnie stosowanymi aktywatorami kinaz PKC prowadzącymi do obniżenia ekspresji izozymów PKC w tym również PKC ϵ (Armstrong i Ganote, 1994; Hofmann, 2004).

Wcześniejsze badania dowodzą, że PKC ϵ jest zaangażowana w proces migracji i inwazji komórek nowotworowych (England i wsp., 2001; **publikacja H1**). Postanowiłam, zatem ocenić wpływ zapotyny na proces ruchliwości komórek mierzony migracją w macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano, że traktowanie komórek HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ zapotyną prowadzi do zahamowania migracji komórek w porównaniu z komórkami nietraktowanymi badanym związkiem. Dodatkowo wykazano zależność między zastosowanym stężeniem zapotyny a obserwowaną inhibicją migracji komórek (**publikacja H3**).

Rola PKC ϵ w regulacji śmierci

Apoptoza, w odróżnieniu od nekrozy, jest procesem aktywnym i polega na uruchomieniu wielu utajonych procesów biochemicznych, prowadzących do wybiórczego rozkładu wybranych składników komórek. Powszechnie wiadomo, że stosowane obecnie chemioterapeutyki mogą indukować, w zależności od typu komórek nowotworowych, apoptozę zachodzącą zarówno na drodze mechanizmu mitochondrialnego, jak i receptorowego (Lim i wsp., 2007; Torkin i wsp., 2005). Doniesienia naukowe wskazują na zaangażowanie flawonów w indukcję procesu apoptozy poprzez obniżenie poziomu białka Bcl-2 (Shim i wsp., 2007; Shukla i wsp., 2004). W kolejnym etapie badań oceniłam wpływ zapotyny na cykl komórkowy komórek HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ oraz na

poziom białek biorących udział w programowanej śmierci typu I – apoptozy. Kierunek zmian w cyklu życiowym komórek zbadano z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej. Przedstawione w **publikacji H3** wyniki wskazują, że zapotyna znacząco ($P < 0,05$) obniża procent populacji komórek w fazie G1, podczas gdy znacząco zwiększa procent populacji komórek apoptotycznych (wzrost o około 30% w porównaniu z kontrolą). W celu potwierdzenia proapoptotycznego działania zapotyny w kolejnym etapie badań oceniłam poziom białek zaangażowanych w proces apoptozy (Bcl-2 i PARP-1). Wykazano pod wpływem działania zapotyny obniżenie poziomu białka Bcl-2. Uzyskana obniżona ilość białka Bcl-2 koreluje ze zwiększoną obserwowaną apoptozą komórek HeLaPKCεA/E wykazaną w cyklu komórkowym. W badaniach własnych wykazałam, że zapotyna indukuje rozpad PARP-1. Białko PARP-1 jest substratem dla kaspazy 3, podczas proteoliotycznej degradacji ulega rozpadowi na dwie podjednostki o masie cząsteczkowej 89 kDa i 24 kDa. Wyniki własnych badań podobnie jak wyniki innych autorów wskazują, że flawony poprzez wpływ na ekspresję genów oraz poziom białek z rodziny Bcl-2 posiadają zdolność kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy (Shim i wsp., 2007; Shukla i wsp., 2004; Li i wsp., 1999; Gupta i wsp., 2002).

Interesująca wydała się ocena wpływu zapotyny na poziom czynnika transkrypcyjnego AP-1. AP-1 występuje w komórce, jako dimer różnych kombinacji dwóch białek: c-Fos i c-Jun. Aktywacja AP-1 pojawia się w odpowiedzi na działanie różnych czynników zewnętrznych (mitogeny, cytokiny, hormony, czynniki wzrostowe i rakotwórcze) doprowadzając do indukcji odpowiednich genów regulujących, w zależności od rodzaju czynnika lub tkanki, procesy mitogenezy, transformacji lub stanu zapalnego (Surh i wsp., 2005). Stymulacja aktywności PKCε wywołana interakcją z estrami forbolu (PMA) prowadzi na skutek fosforylacji wielu białek do zmian w funkcjonalności komórki poprzez uruchomienie kaskady sygnału PKC/MAPK/AP-1 w sznurzych kardiomiocytach (Li i wsp., 2000). W badaniach własnych wykazałam, że podczas równoczesnego traktowania zapotyną i doksycykliną (Dox + Zap), zapotyna hamuje indukcyjny wpływ doksycykliny na c-Fos i c-Jun w komórkach HeLaPKCεA/E. Uzyskane obniżenie poziomu czynnika AP-1 pod wpływem działania zapotyny potwierdza zaangażowanie tego związku w transdukcję sygnału z udziałem czynników transkrypcyjnych prowadząc do ich zmniejszonej aktywności, co w konsekwencji kieruje komórki na drogę apoptozy.

Wyniki prezentowane w **publikacji H3**, jednoznacznie wskazują, że kinaza PKC ϵ jest zaangażowana w indukowaną zapotyną ścieżkę przesyłania sygnału prowadzącą do śmierci komórek nowotworowych z nadekspresją PKC ϵ . Zapotyina jest selektywnym aktywatorem onkoproteiny PKC ϵ i jednocześnie represorem jej ekspresji w komórkach nowotworowych. Dodatkowo zapotyina wykazuje właściwości proapoptotyczne poprzez inhibicję aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1, degradację proteolityczną białka PARP-1 oraz obniżenie poziomu białka antyapoptotycznego Bcl-2. Ponadto hamuje migrację komórek HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją onkoproteiny PKC ϵ A/E.

Współzależności między autofagią i apoptozą w komórkach nowotworowych z nadekspresją PKC ϵ pod wpływem działania zapotyiny (5,6,2',6'-tetrametoksyflawonu)

Apoptoza i autofagia są procesami istotnymi dla prawidłowego rozwoju organizmu, obydwa mają decydujący wpływ na losy komórek w organizmie. Autofagia określana jest też mianem programowanej śmierci komórkowej typu II (PCD II), niezależnej od kaspaz (Yoshimori T, 2004; Yang i Klionsky, 2010). Rolę procesu autofagii można rozpatrywać w dwojaki sposób: z jednej strony jej celem jest zachowanie homeostazy wewnątrzkomórkowej, z drugiej nadmierna aktywacja przyczynia się w efekcie do destrukcji komórki. Dychotomiczny charakter autofagii obserwowany jest również w komórkach nowotworowych, czego skutkiem jest szerokie zainteresowanie autofagią, jako elementem terapii przeciwnowotworowej. Autofagia w komórkach nowotworowych warunkuje reakcję adaptacyjną na stres w warunkach deficytu bioenergetycznego, poprzez utrzymanie homeostazy pomiędzy biosyntezą a rozkładem makrocząsteczek. Dodatkowo proces ten dostarcza niezbędnych aminokwasów dla rozwoju i przeżycia komórek nowotworowych w obrębie guza oraz prowadzi do dalszej progresji choroby. Stanowi również barierę ochronną przed działaniem niektórych leków używanych w chemioterapii. Z drugiej strony jest narzędziem eliminacji komórek nowotworowych, co wskazuje na jej rolę w hamowaniu procesu nowotworzenia (Levine i Kroemer, 2008). Liczne badania wskazują na indukcję autofagii po zastosowaniu terapii przeciwnowotworowej (Hu i wsp., 2009; Siddiqui i wsp., 2013).

Dla lepszego zrozumienia podstaw mechanizmu chemoprewencyjnego i chemioterapeutycznego działania zapotyny na komórki HeLaPKCεA/E z nadekspresją onkoproteiny PKCεA/E w kolejnym etapie oceniłam wpływ zapotyny na proces autofagii komórek nowotworowych charakteryzujących się wysokim poziomem PKCε (**publikacja H4**). Dla zobrazowania przebiegu procesu autofagii w badanych komórkach oceniono poziom białka MAP LC3 (*ang. Microtubule-Associated Protein I Light Chain 3*), będącego wiarygodnym markerem obecności aktywnych autofagosomów i autofagolizosomów w komórce. W celu wizualizacji struktur autofagosomalnych zastosowano technikę immunofluorescencji z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Wykazano brak zmian w formowaniu się autofagosomów po zastosowaniu zapotyny w stężeniu 7,5 μM. Natomiast wyższe zastosowane stężenia zapotyny (15 μM i 30 μM) obniżają poziom formowania się autofagosomów odpowiednio o 44% dla stężenia 15 μM i 58% dla 30 μM, co świadczy o inhibicji procesu autofagii. Translokacje białka MAP LC3 i jego przemiany stanowią podstawę większości metod wykrywania procesu autofagii. Ilość białka LC3-II w komórce jest wprost proporcjonalna do liczby autofagosomów, a proces przekształcania LC3-I w LC3-II ulega nasileniu po indukcji autofagii, dlatego też białko to jest aktualnie jedynym wiarygodnym markerem obecności aktywnych autofagosomów i autofagolizosomów (Wysokińska i Kałas, 2013; Polewska, 2012). W badaniach własnych wykorzystując technikę Western blot z immunoidentyfikacją oceniłam wpływ zapotyny na poziom białka LC3 podczas indukcji ekspresji genu *PRKCE A/E* doksycykliną. Wykazano obecność dwóch lizoform białka LC3, jednej LC3-I o masie 18 kDa i drugiej LC3-II o masie 16 kDa. Analizując uzyskane wyniki wykazano zależność między zastosowanym stężeniem zapotyny a poziomem białka LC3. Zapotyna wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia prowadzi do obniżenie poziomu białka LC3 w komórkach z nadekspresją PKCεA/E. Wyniki te korelują z oceną mikroskopową obecności autofagosomów (**publikacja H4**). Obniżony poziom białka LC3 oraz niższy procent autofagosomów obecny w komórkach po zastosowaniu zapotyny, wskazuje, że badany związek prawdopodobnie przyczynia się do zahamowania procesu autofagii. Z piśmiennictwa wiadomo, że blokowanie dojrzewania autofagosomów w wyniku działania flawonoidów prowadzi do apoptozy (Chahar i wsp., 2011). W związku z powyższym w kolejnym etapie badań oceniłam wpływ zapotyny na poziom białek uczestniczących w przesyłaniu sygnału o autofagii

w komórkach nowotworowych z nadekspresją PKC ϵ A/E. Białkami uczestniczącymi w aktywacji i regulacji procesu autofagii są mTOR, kinaza PI3 klasy III, Atg5, Bcl-2, beklina-1, LC3, p62. Białka te stanowią użyteczne markery umożliwiające monitorowanie przebiegu tego procesu w komórkach nowotworowych. W badaniach własnych analizie poddano poziom kinazy PI3-K, bekliny 1, Atg5 oraz mTOR po potraktowaniu zapotyną w trzech stężeniach (7.5 – 30 μ M). Zaobserwowano zależność między zastosowanym stężeniem zapotyny a poziomem badanych białek. Wykazano wraz z wzrastającym stężeniem badanego związku statystycznie znamienne obniżenie poziomu białek odpowiedzialnych za aktywację kaskady procesu autofagii w komórkach z nadekspresją PKC ϵ A/E: PI3-K, bekliny 1 i Atg5. Równocześnie wykazano znaczący wzrost poziomu białka mTOR po potraktowaniu zapotyną w najwyższym badanym stężeniu (30 μ M). Nasze wyniki są zbieżne z wynikami innych autorów, którzy pokazali korelację między ekspresją genu *BECN1* a progresją onkogenezy (Itakura i wsp., 2008). Również niski poziom białka mTOR w komórce koreluje z aktywacją procesu autofagii, natomiast wysoki poziom tej kinazy hamuje autofagię (Jung i wsp, 2010; Yang i Klionsky, 2010).

Dla lepszego zrozumienia mechanizmu zahamowania autofagii oraz aktywacji apoptozy po potraktowaniu zapotyną w komórkach nowotworowych z wysokim poziomem PKC ϵ A/E, oceniono poziom ekspresji wybranych genów zaangażowanych w oba te procesy. Przeprowadzono za pomocą techniki qPCR analizę następujących genów *RPTOR*, *ATG12*, *ATG5*, *PI3KC3*, *BECN1*, *MAP1LC3b*, *BAX*, i *BCL2*. Badania te dowiodły, że zapotyna moduluje profil ekspresji poszczególnych genów w zależności od zastosowanego stężenia badanego związku. Docelowo zapotyna kieruje komórki HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ na drogę apoptozy. Przeprowadzone przez nasz zespół badania wykazały, że zapotyna spowodowała spadek ekspresji genów pro-autofagicznych (*PI3KC3*, *BECN1*, *ATG12*, *ATG5*, *MAP1LC3b*). Dodatkowo zaobserwowano, wzrost poziomu mRNA Bax i spadek poziomu mRNA Bcl-2. Ponadto wykazano, że zmianom na poziomie mRNA bekliny1, Atg5, mTOR, PI3-K oraz Bcl-2 towarzyszyły zmiany w poziomie oznaczanego białka metodą elektroforezy i Western blot z immunoidentyfikacją (**publikacja H4** i **publikacja H3**).

Wyniki prezentowane w **publikacji H4** wskazują, że zapotyna, jako naturalny związek może stać się potencjalnym kandydatem aktywującym ścieżki wzajemnego powiązania między autofagią a apoptozą w komórkach nowotworowych z nadekspresją

PKC ϵ i w konsekwencji prowadzić komórki do programowanej śmierci (PCD). Jednoznacznie wykazano, że PKC ϵ jest zaangażowana w indukowaną zapotyną ścieżkę przesyłania sygnału prowadzącą do śmierci komórek nowotworowych z nadekspresją onkoproteiny PKC ϵ .

Modulacja procesu autofagii w komórkach nowotworowych po wyciszeniu genu kodującego onkogeną PKC ϵ .

Współczesny stan wiedzy na temat biologii komórki pozwala na walkę z chorobą nowotworową na poziomie molekularnym. Zahamowanie określonych szlaków molekularnych procesu onkogenezy, poprzez modulację aktywności odpowiednich białek przekaźnikowych, stanowi ideę stosowania terapii celowanych we współczesnej strategii leczenia chorób nowotworowych. Poszerzając wiedzę i nadal skupiając się w zadaniach badawczych nad mechanizmem modulacji ekspresji i aktywności enzymu PKC ϵ w celu indukcji procesu programowanej śmierci komórki postanowiłam ocenić możliwość modyfikacji nadekspresji PKC ϵ w transdukcji sygnału w procesie autofagii komórek nowotworowych. Jako model badawczy wykorzystałam dwie linie komórkowe glejaka wielopostaciowego U-118 MG oraz U-138 MG pochodzenia ludzkiego, charakteryzujące się wysoką ekspresją genu *PRKCE*, kodującego onkoproteinę PKC ϵ . Poziom białka PKC ϵ wykazano techniką elektroforezy, Western blot i immunoidentyfikacji (**publikacja H5**). Odkrycie zjawiska interferencji RNA wzbudza nadzieję na zastosowanie tego mechanizmu do wyciszania genów odpowiedzialnych za rozwój wielu chorób. W badaniach własnych w obu liniach komórkowych U-138 MG i U-118 MG, wyciszenie genu *PRKCE* uzyskano za pomocą transfekcji PKC ϵ siRNA z użyciem odczynnika do transfekcji TransIT-siQUEST. Ekspresję badanego genu *PRKCE* po wyciszeniu z użyciem PKC ϵ siRNA oceniono za pomocą techniki qPCR na poziomie mRNA po przepisaniu go na cDNA oraz na poziomie białka techniką elektroforezy Western, blot i immunoidentyfikacji z przeciwciałem anti-PKC ϵ . Wykazano skuteczność wyciszenia ekspresji genu *PRKCE* dla linii U-138 MG na poziomie 65% a dla linii U-118 MG na poziomie 56 % (**publikacja H5**).

W celu przedstawienia pierwotnego obrazu procesu autofagii w badanych komórkach glejaka z biologicznie konstytutywnym, wysokim poziomem kinazy białkowej C epsilon, przeprowadzono jednoczesną analizę ekspresji 88 genów

zaangażowanych w proces autofagii. Ekspresję badanych genów oceniono za pomocą techniki qPCR na poziomie mRNA po przepisaniu go na cDNA. W analizie uwzględniono tylko te geny, których cykl kwantyfikacji był mniejszy lub równy 30 Cq. Otrzymane wyniki względnej ekspresji, umieszczone w **publikacji H5**, przedstawiono na wykresach w postaci map ekspresji genów z użyciem programu GENE-E (Broad Institute, Cambridge). Szczegółowa analiza poziomu ekspresji genów pozwoliła podzielić pulę badanych genów na trzy grupy: I – geny, których ekspresja jest wysoka, II - geny, których ekspresja jest niska oraz III – geny, których ekspresja się nie zmienia lub zmienia się w sposób nieznamienny. Analizując poziom ekspresji badanych genów przynależących do grupy I wykazano wzrost poziomu transkryptów genów bezpośrednio zaangażowanych w aktywację procesu autofagii i tworzenie autofagosomu (*BECLIN1* i *MAP1LC3B2*). W drugiej grupie zaobserwowano niski poziom ekspresji genów *BCL2* i *RAPTOR*. Obserwowany niski poziom transkryptu *BCL2* oraz wysoki poziom transkryptu *BECLIN1* w badanych komórkach glejaka sugeruje o dysocjacji Bcl-2 od bekliny 1 i aktywacji procesu autofagii. Uzyskane wyniki sugerują, że w komórkach nowotworowych glejaka charakteryzujących się bazalnie wysokim poziomem onkoproteiny PKC ϵ , występuje naturalnie wysoki poziom autofagii. Co więcej wyniki te znajdują potwierdzenie w analizie poziomu istotnych białek kaskady autofagii (mTOR, PI3-K klasy III, ATG5, beklina1, MAP LC3, Bcl-2, p62) (**publikacja H5**). Komórki nowotworowe glejaka cechuje wybitna złośliwość, niestabilność genetyczna, duża heterogenność, zdolność do dyfuzyjnego wzrostu oraz tworzenia przerzutów, co wiąże się z ich słabą odpowiedzią na stosowane terapie i bardzo złym rokowaniem (do Carmo i wsp., 2013). Naturalnie występujący wysoki poziom onkogennej PKC ϵ , która promuje proces kancerogenezy, poprzez wzrost tempa proliferacji komórek, zwiększenie ich zdolności do migracji i metastazy, a także oporności na apoptozę (Gorin i Pan, 2009), może przyczyniać się do tak dużej agresywności tego rodzaju nowotworu. Zaobserwowany w moich badaniach wysoki poziom autofagii w komórkach glejaka linii U-138 MG i U-118 MG charakteryzujących się nadekspresją PKC ϵ pozwala sądzić, że jest ona niezbędna, ponieważ dostarcza komórkom substratów do aktywacji lub inhibicji wielu ścieżek metabolicznych, umożliwiając tym samym ich przeżycie w niekorzystnych warunkach.

W celu sprawdzenia, czy rzeczywiście istnieje zależność między kinazą PKC ϵ a przebiegiem procesu autofagii, równolegle przeprowadzono eksperyment polegający na analizie poziomu transkryptów 88 genów zaangażowanych w proces autofagii

w badanych komórkach glejaka linii U-138 MG i U-118 MG po wyciszeniu ekspresji genu *PRKCE* techniką transfekcji siRNA a także ocenę wpływu modulatorów tego procesu (rapamycyny i 3-metyloadeniny) na przebieg autofagii w następstwie wyciszenia onkogennej PKCε. Szczegółowa analiza danych wykazała, że wyciszenie onkogennej PKCε w badanych liniach glejaka przyczynia się do inhibicji procesu autofagii. W przypadku linii U-138 MG największy spadek ekspresji odnotowano w przypadku genów *ATG7*, *BARKOR*, *LAMP3*. Ze względu na brak wzrostu ekspresji genów postrzeganych jako podstawowe wyznaczniki aktywacji autofagii i przebiegu procesu *ATG5*, *BCL2*, *BECLIN1*, *PIK3C3* i *RAPTOR* oraz przy jednoczesnym znamienym obniżeniu ekspresji genów *ATG12*, *ATG7*, *MAP1LC3B* oraz *ULK1* otrzymane dane sugerują, że wyciszenie onkogennej PKCε w linii komórkowej U-138 MG przyczynia się do inhibicji procesu autofagii. Podobnie, w przypadku linii U-118 MG zaobserwowano ogólne obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w proces autofagii w następstwie wyciszenia genu *PRKCE*. Powyższe wyniki skłaniają do wyciągnięcia wniosku, że zaobserwowany efekt może być związany, ze zmniejszonym zapotrzebowaniem komórek nowotworowych na składniki odżywcze, w odpowiedzi na wyciszenie onkogennej kinazy białkowej C epsilon (**publikacja H5**).

Uzyskane wyniki mają potwierdzenie w analizie poziomu białek będących reprezentatywnymi markerami procesu autofagii. Za prawidłowy przebieg autofagii w komórkach odpowiada szereg białek takich jak: kinaza mTOR, kinaza PI3K klasy III, beklina-1, białko Bcl-2, LC3-II, Atg5, Atg7, Atg9, Atg12, UKL1, p53 oraz p62. Zaobserwowane zahamowanie procesu autofagii manifestowało się obniżonym poziomem białek postrzeganych, jako podstawowe wyznaczniki indukcji i elongacji oraz dojrzewania autofagosomu (PI3-K, Bekliny-1, Atg5 i LC3) przy jednoczesnym wzroście poziomu białek odpowiedzialnych za aktywację (mTOR) i regulację (Bcl-2) (**publikacja H5**).

W kolejnym etapie dla pełnego zrozumienia mechanizmu modulacji PKCε i związanej z tym transdukcji sygnału w procesie autofagii postanowiono ocenić funkcjonalne markery procesu autofagii (LC3 i p62) w komórkach obu linii glejaka po wyciszeniu ekspresji genu kinazy białkowej C epsilon. W pierwszym etapie dokonano techniką mikroskopii fluorescencyjnej wizualizacji autofagosomów w komórkach linii U-138 MG i U-118 MG po wyciszeniu ekspresji genu *PRKCE*. Analiza obrazu mikroskopowego polegała na określeniu poziomu nagromadzenia się sygnału znakowanego białka LC3, co odpowiada formowaniu się struktury autofagosomu.

Analizując uzyskane dane zaobserwowano wysoki poziom liczby autofagosomów w komórkach kontrolnych obu badanych linii glejaka wielopostaciowego. Uzyskane dane jednoznacznie wskazują na aktywację procesu autofagii w komórkach charakteryzujących się konstytutywnym wysokim poziomem onkoproteiny PKC ϵ . Natomiast, co istotne, w komórkach obu linii glejaka z wyciszonym genem *PRKCE* (w wyniku transfekcji PKC ϵ siRNA) zaobserwowano niską obecność autofagosomów. Uzyskane w tej części wyniki wizualizacji i lokalizacji autofagosomów korelują z wcześniej uzyskanymi wynikami badań. Wykorzystując technikę qPCR oraz Western blot wykazano inhibicję procesu autofagii w obu badanych liniach komórkowych glejaka U-138 MG i U-118 MG na skutek wyciszenia genu *PRKCE* (**publikacja H5**).

W badaniach własnych analizie poddałam białko p62/SQSTM1, które postrzegane jest, jako funkcjonalny marker przebiegu procesu autofagii. Technika Western blot i immunoidentyfikacji z zastosowaniem specyficznego przeciwciała skierowanego przeciw badanemu białku, oceniono w lizatach komórkowych poziom p62/SQSTM1. Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano w obu badanych liniach glejaka U-138 MG i U-118 MG brak statystycznie znamiennych zmian w ilości białka p62/SQSTM1 w następstwie wyciszenia genu *PRKCE* w porównaniu do próby z kontrolnym siRNA (**publikacja H5**).

Moje badania są zbieżne z badaniami innych autorów, którzy również prowadząc eksperymenty na komórkach glejaka (linii U251 i U87) wykazali współzależność między poziomem PKC ϵ , a procesem proliferacji, apoptozy i inwazji (Xu i wsp., 2015). Z kolei badania Ding (Ding i wsp., 2002) prowadzone na komórkach ludzkiego raka płuc wykazały, że regulacja ekspresji genu *PRKCE* jest istotnym czynnikiem, który determinuje oporność lub wrażliwość komórek na chemioterapię. Zaobserwowali oni, że nadekspresja PKC ϵ nadaje komórkom raka płuca znaczną oporność na chemioterapeutyki, natomiast zniesienie ekspresji PKC ϵ poprzez zastosowanie antysensownego cDNA zwiększa wrażliwość tych komórek na terapię.

Zahamowanie procesu adhezji w komórkach glejaka wielopostaciowego po wyciszeniu onkoproteiny PKC ϵ

W procesie adhezji uczestniczy niereceptorowa kinaza ognisk adhezji (FAK). Jej nadrzędną funkcją jest odbieranie i przekazywanie sygnałów pochodzących z receptorów adhezyjnych, których główną grupę stanowią receptory integrynowe, do

wewnątrzkomórkowej kaskady białek (Schaller i wsp., 2001; Tai i wsp., 2015). Białko FAK jest zaangażowane w zakotwiczenie komórek w podłoże, w migrację i inwazję, fosforylację cytoszkieletu, i apoptozę.

Wysoka ekspresja zarówno PKC ϵ , jak i białka FAK w komórkach nowotworowych, wiąże się ze złym rokowaniem dla pacjentów. Uwzględniając powyższe dane postanowiłam w kolejnym etapie badań własnych ocenić proces adhezji komórek glejaka wielopostaciowego po molekularnej manipulacji polegającej na wyciszeniu genu kodującego onkoproteinę PKC ϵ . W eksperymencie wykorzystałam komórki linii U-118 MG i U-138 MG z wyciszonym genem *PRKCE*, uzyskanym w wyniku transfekcji PKC ϵ siRNA oraz komórki kontrolne (Kontrola siRNA). Do oceny procesu adhezji posłużyłam się testem funkcjonalnym z zastosowaniem gotowego podłoża, zawierającego białka macierzy zewnątrzkomórkowej (Matrigel[®]). Wyniki zaprezentowane w **publikacji H5** pokazały znacząco mniejszą adhezję komórek obu badanych linii glejaka wielopostaciowego z wyciszonym genem *PRKCE* w porównaniu z komórkami kontrolnymi manifestującymi się konstytutywnie wysokim poziomem tej kinazy. Wykazana obniżona adhezja stała się przyczynkiem do oceny ilości białka FAK i stopnia ufosforylowania tyrozyn w pozycji 397, 576 oraz 577 w komórkach glejaka wielopostaciowego po wyciszeniu onkoproteiny PKC ϵ . Technika elektroforezy i Western blot z immunoidentyfikacją wykazałam obniżony poziom białka FAK oraz obniżony stopień ufosforylowania badanych tyrozyn w obu liniach glejaka po wyciszeniu genu kodującego onkoproteinę PKC ϵ . Podsumowując, wydają się, że ingerencja w ekspresję genu *PRKCE* w komórkach nowotworowych z bazalnie wysokim poziomem PKC ϵ może stanowić obiecującą strategię hamowania adhezji oraz promowania śmierci komórek.

Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe oraz ich ewentualne wykorzystanie

W prezentowanym spójnym cyklu prac, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, przedstawiono wyniki badań dotyczące poznania molekularnych modyfikacji transdukcji sygnału z udziałem PKC ϵ w celu indukcji procesu programowanej śmierci komórek nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją onkoproteiny PKC ϵ .

W przedstawionych pracach:

- Uzyskane wyniki wskazują, że PKC ϵ A/E może, w zależności od jej subkomórkowej lokalizacji, indukować różne ścieżki transdukcji sygnału w komórce nowotworowej.
- Wykazano, że nadekspresja konstytutywnie aktywnej PKC ϵ manifestuje się wzrostem poziomu fosforylacji biologicznie ważnej seryny⁷²⁹, co w konsekwencji prowadzi do translokacji tej kinazy do aparatu Golgiego i wpływa na wzrost potencjału proliferacyjnego komórek bez możliwości przyczepiania do podłoża.
- Nadekspresja PKC ϵ A/E w komórkach nowotworowych prowadzi do zwiększonej fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Elk-1, kinazy PDK1 i białka retinoblastoma (pRB), co przekłada się na aktywację ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost, podział i różnicowanie komórek oraz hamowanie apoptozy.
- Wykazano, że komórki HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ cechuje większa zdolność do migracji i inwazji.
- Zapotyna – naturalnie występujący tetrametoksyflawon, wykazuje cytotoksyczne działanie wobec komórek nowotworowych linii HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ prawdopodobnie na drodze obniżania ekspresji genu *PRKCE*, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji procesu apoptozy poprzez zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, degradację proteolityczną białka PARP-1 oraz obniżenie poziomu białka antyapoptotycznego Bcl-2
- Zapotyna hamuje migrację komórek HeLaPKC ϵ A/E z nadekspresją onkoproteiny PKC ϵ A/E.
- Zapotyna poprzez swoje oddziaływanie na poziom ekspresji i aktywność konstytutywnie aktywnej PKC ϵ może stać się potencjalnym kandydatem aktywującym ścieżki wzajemnego powiązania między autofagią a apoptozą w komórkach nowotworowych z nadekspresją PKC ϵ i w konsekwencji prowadzić do zahamowania proliferacji i aktywacji programowanej śmierci komórek (PCD).
- Wysoki poziom PKC ϵ w komórkach glejaka wielopostaciowego koreluje pozytywnie z wysokim poziomem autofagii, podczas gdy wyciszenie tej onkoproteiny skutkuje obniżeniem poziomu białek PI3-K, Bcl-2, Atg5 zaangażowanych w indukcję i elongację autofagii oraz wzrost poziomu kinazy mTOR i białka Bcl-2.

- Wyciszenie genu *PRKCE* skutkuje zahamowaniem procesu tworzenia autofagosomów.
- Wyciszenie genu *PRKCE* w komórkach glejaka wielopostaciowego skutkuje obniżeniem potencjału przylegania do macierzy ECM najprawdopodobniej na drodze zahamowania kaskady fosforylacji kinazy ognisk adhezji.

W świetle obecnego stanu wiedzy, wyniki prezentowanych przeze mnie badań przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli, jaką pełni PKC ϵ w procesie transformacji nowotworowej i związanej z tym transdukcji sygnału, a także jej udziału w procesach promujących progresję nowotworu, takich jak: adhezja, migracja, inwazja, autofagia i apoptoza. Wykazany efekt modyfikacji transdukcji sygnału z udziałem PKC ϵ poprzez ingerencję w ekspresję genu *PRKCE* i aktywność białka przyczynia się do zahamowania progresji nowotworu poprzez indukcję procesu programowanej śmierci komórki *in vitro*.

Wyniki uzyskane w ramach moich badań mają przede wszystkim charakter poznawczy, ale co nie ulega wątpliwości, posiadają również walor aplikacyjny. Modyfikacja ekspresji genu i aktywności białka PKC ϵ pozytywnie koreluje z zahamowaniem progresji nowotworów. W takim ujęciu sprawa kinaza PKC ϵ może stanowić ważny biomarker i potencjalny cel dla nowych związków, które dzięki dokładnemu zaprojektowaniu struktury za pomocą modelowania komputerowego będą elementami nowych terapii przeciwnowotworowych.

Piśmiennictwo:

Akao Y, Itoh T, Ohguchi K, Iinuma M, Nozawa Y. Interactive effects of polymethoxy flavones from Citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008;16:2803-2810.

Akita Y. Protein Kinase C- ϵ (PKC- ϵ): Its unique structure and function. *Journal of Biochemistry* 2002;132:847-852.

Akita Y. Protein kinase C epsilon: multiple roles in the function of, and signaling mediated by, the cytoskeleton. *FEBS J*. 2008;275:3995-4004.

Armstrong S, Ganote CE. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glycolytic blockade, phorbol esters, and ischaemia. *Cardiovasc. Res*. 1994;28:1700-1706.

Babenko NA, Shakhova EG. Effects of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells. *Lipids in Health and Disease*. 2008;7:1

- Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase C ϵ makes the life and death decision. *Cellular Signalling*, 2007;19:1633–1642.
- Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D, Weinstein IB. The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 1993;8:2095-104.
- Calvin R J, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L. *In vitro* Cell Migration and Inasion Assays. *J Vis Exp*. 2014:51046.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410. 6824:37-40.
- Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, and Joshi YC: Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 5, 1–12, 2011
- Chun JS, Ha MJ, Jacobson BS. Differential translocation for protein kinase C ϵ during HeLa cell adhesion to a gelatin substratum. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:13008-13012.
- Cooke M, Magimaidas A, Casado-Medrano V, Kazanietz MG. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Mol Carcinog*. 2017;56(6):1531-1542.
- Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L. Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35305-13.
- do Carmo A, Balça-Silva J, Matias D, Lopes MC. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(4):287-94.
- England K, Rumsby M.G. Changes in protein kinase C ϵ phosphorylation status and intracellular localization as 3T3 and 3T6 fibroblasts grow to confluency and quiescence: a role for phosphorylation at Ser-729? *Biochem J*. 2000;352:19-26.
- England K, Watson J, Beale G, Warner M, Cross J, Rumsby M. Signalling pathways regulating the dephosphorylation of Ser729 in the hydrophobic domain of protein kinase C upon cell passage. *J. Biol. Chem*. 2001;276:10437–10442.
- Gorin MA, Pan Q. Protein kinase C epsilon: an oncogene and emerging tumor biomarker. *Mol Cancer*. 2009;8:9.
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem*. 1995;270(17):9991-10001.
- Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells; *Oncogene*; 2002;21:3727-373820.
- Hofmann J. Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Current Cancer drug Targets*. 2004;4:1-11.

- Hu H, Chai Y, Wang L, Zhang J, Lee HJ, Kim SH, Lü J. Pentagalloylglucose induces autophagy and caspase- independent programmed deaths in human PC-3 and mouse TRAMP-C2 prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(10):2833-2843.
- Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase C epsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes.* 2001;50(3):584-92.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12):5360-72.
- Ivaska J., Whelan R.D., Watson R., Parker P.J. PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *The EMBO J.* 2002;21:3608-19.
- Jain K, Basu A. The Multifunctional Protein Kinase C-ε in Cancer Development and Progression. *Cancers* 2014;6:860-878.
- Jung CH, Ro S, Cao J, Otto NM, Kim D. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 2010; 584:1287–1295.
- Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC., Huang YT, Lee MT. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 2005;5:895-909.
- Kang JH. Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science* 2014; ID 231418:36.
- Kao YS, Fong JC. Endothelin-1 induction of Glut1 transcription in 3T3-L1 adipocytes involves distinct PKCepsilon- and p42/p44 MAPK-dependent pathways. *Bioch. Biophys Acta* 2008;1780:154-9.
- Klein S, Levitzki A. Signal transduction therapy for cancer – whither now? *Current Signal Transduction Therapy.* 2006;1:1-12.
- Lepley DM, Li B, Birt DF, Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G₂/M arrest in keratinocytes; *Carcinogenesis*; 2006;11:2367-2375.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.
- Lim DY, Jeong Y, Tyner AL, Park JHY. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin; *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2007;292:G66-G75.
- Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein; *Oncogene* 1999;18:3166-3172.
- Li RCX, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R. PKCε modulates NF-κB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes; *American Journal of Physiology.* 2000;279:H1679-H1689.
- Maiti A, Cuendet M, Kondratyuk T, Croy VL, Pezzuto JM, Cushman M. Synthesis and Cancer Chemopreventive Activity of Zapotin, a Natural Product from *Casimiroa edulis*; *Journal of Medicinal Chemistry.* 2007;50:350-355.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-1934.

Miyata Y, Sato T, Imada K, Dobashi A, Yano M, Ito A. A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2008; 66:168-173.

Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mushinski JF. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C- α and - δ and not by protein kinase C- β II, - ϵ , - ζ , and - η . *J Biol Chem*. 1993;268(27):20110-5.

Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*. 2006;1(1):7-9.

Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters*. 2007;22:168-178.

Murillo G, Hirschelman WH, Ito A, Moriarty RM, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Mehta RG. Zapotin, a phytochemical present in a Mexican fruit, prevents colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*. 2007;57,1:28-37.

Polewska J. Autofagia - mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postepy. Hig. Med. Dośw*. 2012;66:921-36.

Pan M, Chen W, Lin-Shiau S, Ho C, Lin J. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cell. *Carcinogenesis* 2005;23,10: 1677-1684

Pan Q, Bao LW, Kleer CG, Sabel MS, Griffith KA, Teknos TN, Merajver SD. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Research* 2005;65:8366-71.

Petrovics G, Bird T, Libel C, Oravec T, Anderson WB. Protein kinase Cepsilon mediates PMA-induced growth inhibition of low population density NIH 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):217-23.

Rechfeld F, Gruber P, Kirchmair J, Boehler M, Hauser N, Hechenberger G, Garczarczyk D, Lapa GB, Preobrazhenskaya MN, Goekjian P, Langer T, Hofmann J. Thienoquinolines as Novel Disruptors of the PKC ϵ /RACK2 Protein-Protein Interaction *J Med Chem*. 2014;57(8):3235–3246.

Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein, *Oncogene*, 2001;20, (44):6459-6472.

Shim H, Park J, Paik H, Nah S, Kim D, Han YS. Acacetin- induced Apoptosis of Human Breast Cancer MCF-7 Cells Involves Caspase Cascade, Mitochondria-mediated Death Signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun Activation. *Molecules and Cells*. 2007;24,1: 95-104.

Shukla S, Gupta S. Suppression of Constitutive and Tumor Necrosis Factor α -Induced Nuclear Factor (NF)- κ B Activation and Induction of Apoptosis by Apigenin in Human Prostate Carcinoma PC-3 Cells: Correlation with Down-Regulation of NF- κ B-Responsive Genes. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:3169-3178.

Siddiqui A, Dandawate P, Rub R, Padhye S, Aphale S, Moghe A, Jagyasi A, Venkateswara SK, Singh B, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat HK. Novel Aza-resveratrol analogs: synthesis,

characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23:635-640.

Stanwell C, Gescher A, Bradshaw TD, Pettit GR. The role of protein kinase C isoenzymes in the growth inhibition caused by bryostatin 1 in human A549 lung and MCF-7 breast carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1994 ;56(4):585-92.

Surh Y, Kundu JK, Na H, Lee J. Redox-Sensitive Transcription Factors as Prime Targets for Chemoprevention with Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytochemicals; *The Journal of Nutrition.* 2005;135:2993S-3001S.

Tai YL, Chen LC, Shen TL. Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. *Biomed Res Int.*, 2015;1-13.

Torkin R, Lavole J, Kaplan DR, Yeger H. Induction of caspase-dependent, p53-mediated apoptosis by apigenin in human neuroblastoma; *Molecular Cancer Therapeutics* 2005;4:1-11.

Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol.* 2007;17:354–362.

Wysokińska E, Kałas W. Metody badania autofagii oparte na przemianach białek MAP1LC3 i p62/SQSTM1. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:442-448.

Xu Y, Li Z, Zhang C, Zhang S, Ji Y, Chen F. Knockdown of PKC ϵ expression inhibits growth, induces apoptosis and decreases invasiveness of human glioma cells partially through Stat3. *J Mol Neurosci.* 2015;55(1):21-31.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin Cell Biol.* 2010;22:124-131.

Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:453-458.

Zeidman R, Troller U, Raghunath A, Pahlman S, Larsson C. Protein kinase C epsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Molecular Biology of the Cell* 2002;13:12–24.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Moje zainteresowania naukami biologicznymi zdecydowały o wyborze klasy o profilu biologiczno-chemicznym w II Liceum Ogólnokształcącym im. Dąbrówki w Gnieźnie, a następnie studiów na Akademii Medycznej. Jestem absolwentką Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Medyczny). Studia

ukończyłam w 2001 roku broniąc pracę magisterską pt. "Wpływ pochodnych nitroimidazolu na kinazy białkowe erytrocytu", wykonaną w Zakładzie Chemii Klinicznej, Katedry Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rybczyńskiej. Bezpośrednio po obronie pracy magisterskiej zostałam zatrudniona w Zakładzie Chemii Klinicznej na stanowisku starszego referenta inżynierjno – technicznego. W styczniu 2002 roku zostałam włączona do zespołu naukowego prowadzonego przez prof. dr hab. Marię Rybczyńską w charakterze asystenta naukowego. Zarówno praca magisterska, jak i pierwsze zadania naukowe, jakie mi powierzono dotyczyły oceny wpływu nowosyntetyzowanych pochodnych 4-nitroimidazolu na poziom izoformy α i ζ kinazy białkowej C (PKC) w błonie erytrocytu i aktywność PKC α oraz na stymulowaną estrem forbolu (PMA) translokację PKC α z cytozolu do błony krwinki czerwonej. Proces ten świadczy o uruchomieniu drogi przekazywania sygnału związanego z PKC, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i w patologicznych. W badaniach zastosowano dwie nowosyntetyzowane pochodne 4-nitroimidazolu: ester benzylový kwasu-2-metylo-4-nitro-5-bromo-imidazilo-mrówkowego oraz bis(2-chloroetyloamino)-1-(4-chlorofenacylo)-2-metylo-4-nitroimidazol. Nitroimidazole to grupa leków ciesząca się uznaniem ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej m.in. przeciwko bakteriom i pierwotniakom. Z dużym powodzeniem są stosowane zarówno w medycynie, jak i w weterynarii. Uzyskane wyniki dowiodły, że badane pochodne 4-nitroimidazolu, w krwince czerwonej jako komórce modelowej, hamują stymulowaną działaniem PMA translokację do błony komórkowej izoformy α kinazy białkowej C, co w komórkach jądrzastych może przekładać się na obniżoną aktywność tego izoenzymu i wpływać na zahamowanie proliferacji komórek i ich różnicowanie. Mechanizm działania badanych pochodnych 4-nitroimidazolu opiera się na blokowaniu transdukcji sygnału w komórce, co w perspektywie daje nowe możliwości w leczeniu wielu chorób, włączając w to choroby nowotworowe. Uzyskane wyniki zaprezentowano na XXXVIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu w roku 2002 (pozycja III/B/15 wg załącznika 5).

Badanie właściwości przeciwnowotworowych nowosyntetyzowanych pochodnych 4-nitroimidazolu

Udział w Szkole Letniej „Postępy biologii molekularnej” w roku 2002, w znacznym stopniu poszerzył moją wiedzę i umiejętności stosowania nowoczesnych

technik oraz metod badawczych. Moment ten zbiegł się czasowo ze zmianą profilu badawczego Zakładu oraz zapoczątkowaniem badań w zakresie modulacji dróg przekazywania sygnału w komórce nowotworowej. Od tego momentu brałam udział w planowaniu i realizacji badań w zakresie odpowiedzi komórki nowotworowej w modelu *in vitro* na działanie czynników chemicznych, jak również fizycznych. Moje zainteresowania nadal koncentrowały się na badaniu właściwości przeciwnowotworowych nowosyntetyzowanych pochodnych 4-nitroimidazolu. Zostałam włączona w zadania badawcze prowadzone we współpracy z Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych (prof. dr hab. Stanisław Sobiak i dr Iwona Weidlich). Badania prowadzono dwukierunkowo. Z jednej strony dotyczyły analizy wpływu nowosyntetyzowanych pochodnych 4-nitroimidazolu na przeżywalność komórek raka szyjki macicy (HeLa). Z drugiej strony, ze względu na fakt, że nitroimidazole wykazują właściwości alkilujące i są silnymi uczulaczami komórek hipoksycznych, badano wpływ promieniowania gamma w obecności testowanych pochodnych 4-nitroimidazolu na badane linie komórkowe. W obu modelach eksperymentalnych zastosowano trzy typy linii komórek HeLa: typ dziki (HeLaWT) oraz dwa z wprowadzonymi modyfikacjami na poziomie molekularnym (HeLa-MDR1-G185 i HeLaPKC ϵ A/E). Obie zmodyfikowane linie komórek HeLa stanowią przykład trudności napotykaną w leczeniu nowotworów z racji nadekspresji białek będących przyczyną oporności na chemioterapię (P-glikoproteiny, PKC epsilon). Badana obejmowały cztery nowosyntetyzowane pochodne 4-nitroimidazolu: 5-bromo-1-(4-chlorofenacylo)-2-metylo-4-nitroimidazolu (StS1), estru benzyłowego kwasu 5-bromo-2-metylo-4-nitroimidazolilomrówkowego (I.W.31), 5-[bis (2-chloroetyloamino)]-1-(4-chlorofenacylo)-2-metylo-4-nitroimidazolu (I.W.92), estru etylowego kwasu-5-bromo-2-metylo-4-nitroimidazolilomrówkowego (I.W.61). Zebrane w trakcie badań dane pozwoliły wykazać, zależną od budowy chemicznej efektywność działania badanych nitroimidazoli wobec komórek HeLa. Związek StS1, posiadający w swojej budowie dwie bardzo aktywne grupy (brom w pozycji 5 oraz grupę ketonową układu fenacylowego), okazał się najbardziej efektywny wobec wszystkich badanych linii HeLa. Dodatkowo wykazano, że łączny wpływ obu czynników: 4-nitroimidazoli i promieniowania gamma wykazuje silniejszy efekt cytotoksyczny, niż indywidualne ich stosowanie. Tym samym dowiedziono, że badane pochodne 4-nitroimidazolu posiadają właściwości radiouczulające. Taka cecha ma ogromne znaczenie kliniczne, bowiem addytywny efekt działania czynników

przyczynia się do skuteczniejszego zahamowania wzrostu komórek w porównaniu do samego promieniowania stosowanego w wysokich dawkach. Prezentowany schemat badań jednoznacznie wskazuje, że sposobność stosowania u pacjentów ukierunkowanego leczenia skojarzonego z radioterapią stwarza szansę na uzyskiwanie lepszych wyników przy jednoczesnej eliminacji niektórych niekorzystnych następstw tradycyjnej radioterapii. Wyniki zaprezentowano na XXXIX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Gdańsku w roku 2003 (pozycja III/B/1 wg załącznika 5).

Równocześnie zostałam włączona w nowe prace, związane z moimi zainteresowaniami biologią nowotworów, które prowadziłam w ramach badań statutowych oraz współpracy międzynarodowej z prof. Johannem Hofmannem z Uniwersytetu Medycznego w Innsbrucku (Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Innsbruck Medical University). Moja chęć poznania ogniskowała się na procesach transformacji nowotworowej, adhezji i migracji komórek nowotworowych oraz mechanizmie przerzutowania. W tym okresie, po raz pierwszy, zetknęłam się onkogeną kinazą białkową C epsilon (PKC ϵ), a moje badania skupiły się na ocenie zaangażowania tej kinazy w proces adhezji komórek nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Uzyskane wyniki zaprezentowano na międzynarodowej konferencji naukowej w Innsbrucku (18th Meeting of the European Association for Cancer Research) w roku 2004 (pozycja III/B/16 wg załącznika 5). Model badawczy – komórki raka szyjki macicy z konstytutywnie aktywną PKC ϵ (HeLaPKC ϵ A/E), który analizowałam w ramach tych badań, stał się na długie lata moim podstawowym modelem eksperymentalnym. Sama kinaza PKC ϵ była znakomitym obiektem badań ze względu na fakt, że jako jedyna w rodzinie kinaz białkowych C, przejawia wysoki potencjał onkogenny.

Udział białka FAK i β_1 integryny w procesie adhezji i rozprzestrzeniania się komórek HeLa charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej kinazy białkowej C epsilon

Jak wiadomo, w toku formowania i progresji nowotworu złośliwego kluczową rolę odgrywa proces adhezji komórek. W proces ten zaangażowana jest niereceptorowa

kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK). Jej nadrzędną funkcją jest odbieranie i przekazywanie sygnałów pochodzących z receptorów adhezyjnych, których główną grupę stanowią receptory integrynowe, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek. Kinaza FAK uczestnicząc w transmisji sygnału do wnętrza komórki, odgrywa pośrednio istotną rolę w wielu reakcjach zachodzących w komórce. Deregulacja szlaków zależnych od FAK tj. adhezji, wzrostu i różnicowania, przeżycia oraz migracji komórek, jest niewątpliwie znaczącym elementem procesu progresji nowotworu. Zgłębia wiedza na temat właściwości adhezyjnych komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, ECM (od ang. *extracellular matrix*) zaowocowała w roku 2007 publikacją artykułu na temat charakterystyki kinazy FAK i jej roli w procesie nowotworzenia, który opublikowano w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (pozycja II/D/1 wg załącznika 5).

Zagadnienie zaangażowania białka FAK w proces adhezji i migracji komórek z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ (PKC ϵ A/E) do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz modyfikacja tych procesów przez egzogenne modulatory było przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt. „Badanie zależności między kinazą białkową C epsilon a kinazą ogniskowo-adhezyjną komórek nowotworowych w procesie adhezji”, której promotorem była prof. dr hab. Maria Rybczyńska. Dla wykazania potencjalnych oddziaływań występujących pomiędzy obiema kinazami (PKC ϵ A/E a FAK) badania realizowałam dwuetapowo. W pierwszym, z zastosowaniem elektroforezy i Western blot z immunoidentyfikacją, szczegółowo scharakteryzowałam komórki z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ , poprzez ocenę ilości PKC ϵ A/E i stopnia jej ufosforylowania oraz oceniłam wpływ nadekspresji PKC ϵ A/E na poziom białka FAK i jego fosforylację. W drugim etapie, wykorzystując metodę koimmunoprecypitacji za pomocą przeciwciała anti-FAK badałam interakcje białko-białko pomiędzy konstytutywnie aktywną PKC ϵ , a kinazą FAK podczas procesu przylegania komórek HeLaPKC ϵ A/E (ocenianego w przedziale czasowym 0-45 minut) *in vitro* do podłoża żelatynowego naśladującego macierz ECM. Dodatkowo techniką mikroskopii konfokalnej oceniłam poziom i lokalizację w komórce β 1 integryny oraz paksyliny, białek uczestniczących w tworzeniu ognisk adhezji. Zadania badawcze przedstawione w pracy doktorskiej były realizowane w ramach projektu pt. „Udział β 1 integryny w procesie adhezji i rozprzestrzeniania komórek HeLa charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej kinazy białkowej C epsilon”, którego byłam

kierownikiem. Badania te były finansowane przez UMP z funduszu przeznaczanego dla młodych naukowców (501-01-3302405-08186). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że zaobserwowany niższy poziom białka FAK i zmiany jego fosforylacji (Tyr-397, Tyr576/577, Ser-722 i Ser-732) oraz niższy poziom $\beta 1$ integryny, obserwowane w komórkach charakteryzujących się nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ , prowadzą do obniżonej adhezji i jednocześnie zwiększonej migracyjności badanych komórek nowotworowych. Ponadto wykazałam obecność, powstałego podczas adhezji i rozplaszczania komórek z nadekspresją konstytutywnie aktywnej PKC ϵ , kompleksu PKC ϵ A/E - FAK, co wymownie świadczy o zaangażowaniu kinazy białkowej C ϵ w proces adhezji. Uzyskane wyniki mają znaczenie nie tylko teoretyczne, ale przede wszystkim praktyczne, ponieważ określenie poziomu białka FAK i stopnia jego ufosforylowania w komórkach nowotworów złośliwych może być w przyszłości elementem pozwalającym na identyfikację stopnia złośliwości nowotworu. Ingerencja w ekspresję genu lub fosforylację białka FAK w komórkach nowotworowych może zmieniać ich fenotyp, przez co kinaza ta może stać się jednym z ogniw w procesach terapeutycznych. Uzyskane wyniki opublikowano w formie rozprawy doktorskiej oraz zaprezentowano na konferencji międzynarodowej 4th International Conference "Inhibitors of Protein Kinase" (pozycja III/B/2 wg załącznika 5). Dysertację doktorską obroniłam z wyróżnieniem na Wydziale Farmaceutycznym UMP w roku 2008.

5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Badanie aktywności biologicznej nowosyntetyzowanych cyklicznych pochodnych pirazolu

Po uzyskaniu stopnia doktora, równolegle podczas prowadzenia badań przedstawionych w ramach prac ujętych w osiągnięciu naukowym będącym podstawą do nadania stopnia doktora habilitowanego, moje zainteresowania koncentrowały się nadal na poszukiwaniu związków pochodzenia zarówno syntetycznego, jak i naturalnego, które wykazują wielokierunkowe mechanizmy działania, a w konsekwencji prowadzą do inhibicji proliferacji komórek nowotworowych i indukcji procesu programowanej śmierci komórki. Dziś nowoczesne metody leczenia

nowotworów opierają się na terapii celowanej molekularnie, która polega na stosowaniu leku skierowanego bezpośrednio przeciw komórce nowotworowej z określoną zmianą genetyczną. Niezbędnym warunkiem powodzenia takiej terapii jest obecny w komórce nowotworowej cel molekularny, którym może być konkretnie zmieniony gen lub białko powstałe na matrycy wadliwego genu. W badaniach ukierunkowanych na leczenie terapią celowaną, dla uzyskania maksymalnego efektu terapeutycznego, stosuje się komputerowe modelowanie związków. Wpisując się w ten nurt badań, realizowałam w latach 2010-2012 zadania badawcze prowadzone we współpracy z dr. hab. Markiem Bernardem i dr. Jackiem Kujawskim z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej UMP oraz z dr. Ewą Ignatowicz z Katedry Biochemii Farmaceutycznej UMP. Dotyczyły one oceny aktywności biologicznej nowosyntetyzowanych cyklicznych pochodnych pirazolu wobec komórek linii raka okrężnicy (HT29). Grupa pirazoli i ich cyklicznych pochodnych posiada udokumentowaną aktywność przeciwgorączkową, przeciwbólową, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą. Związki te dzięki zdolnościom interakcji z cząsteczką DNA poprzez proces interkalacji wykazują skuteczne działanie przeciwnowotworowe manifestujące się zahamowaniem proliferacji i migracji oraz indukcją procesu apoptozy. W ramach podjętej współpracy badaniom poddano uzyskane w wyniku modelowania komputerowego dwa nowosyntetyzowane związki: tospyrquin (5-(p-toluenosulfonylo)-pirazolo-[4,3-f]cholina) oraz tosind (5-chloro-3-(p-toluenosulfonylo)-indazol). Badania biologicznej aktywności związków były finansowane przez UMP z funduszu na prowadzenie badań naukowych przez młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich Wydziału Farmaceutycznego w ramach projektu pt. „Ocena ekspresji genów procesu apoptozy pod wpływem działania cyklicznych pochodnych pirazolu” (502-14-03318432-08186), którego byłam kierownikiem. Mój udział w projekcie polegał na wykonaniu części eksperymentalnej *in vitro* z wykorzystaniem komórek linii HT29, charakteryzujących się mutacją punktową (G/A w kodonie 273) w genie *TP53*, co w konsekwencji powoduje brak funkcjonalności białka p53. Stosując test MTT wykazałam zależny od budowy chemicznej i czasu działania efekt cytotoksyczny wobec badanych komórek nowotworowych. Dla pełnego wyjaśnienia molekularnych podstaw obserwowanego zjawiska przeprowadziłam ocenę cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej oraz oceniłam poziom markerów zaangażowanych w proces apoptozy (Bax, Bcl-2, kaspaza 8, kaspaza 9, PARP-1). Dodatkowo oceniłam morfologię jąder komórek traktowanych badanymi związkami wykorzystując technikę mikroskopii

fluorescencyjnej. Uzyskane dane jednoznacznie wskazały, że pochodną o skuteczniejszym potencjale antyproliferacyjnym i proapoptotycznym względem linii komórkowej HT29 jest związek tosind. Przedstawiony efekt jest najprawdopodobniej wynikiem wprowadzenia dodatkowego atomu azotu do rdzenia indolowego i przekształcenia cząsteczki w indazol, co przekłada się na zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że metoda modelowania komputerowego odgrywa istotną rolę w procesie projektowania nowych związków o oczekiwanym znaczeniu terapeutycznym. Wyniki zostały ujęte w publikacji w *Journal of Physiology and Pharmacology* (pozycja II/A/2 wg załącznika 5) i zaprezentowane na dwóch konferencjach: PTBioch w 2012 r. (pozycja III/B/6 wg załącznika 5) oraz V Symposium Niemiecko-Polskim w 2009 r. (pozycja III/B/18 wg załącznika 5).

Ocena efektu działania antracyklin poddanych promieniowaniu w komórkach białaczki limfoblastycznej z nadekspresją genu *ABCB1*

Kolejne badania, w których uczestniczyłam były realizowane w latach 2014 i 2015, we współpracy z prof. dr hab. Anną Jelińską i dr Katarzyną Dettlaff z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej UMP. Dotyczyły one oceny efektu działania antracyklin (doksorubicyny, epirubicyny i daunorubicyny) poddanych promieniowaniu wiązką elektronów w dawce 10 i 25 kGy (napromienianie elektronowe EBI od ang. *E-beam irradiation*) na komórki ostrej białaczki limfoblastycznej linii CCRF-CEM i jej odmiany linii CCRF-VCR1000 charakteryzującej się nadekspresją genu *ABCB1* kodującego białko ABCB1, które odpowiedzialne jest za oporność wielolekową komórek nowotworowych. Mój udział w projekcie polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej oznaczenia cytotoksyczności napromieniowanych leków testem MTT oraz wyznaczeniu wartości IC_{50} dla każdego z badanych związków. Dodatkowo, aby wykazać różnice w mechanizmie działania leków napromieniowanych w porównaniu do nienapromieniowanych, przy zastosowaniu techniki elektroforezy oraz Western blot z immunoidentyfikacją oceniałam poziom białek regulujących proces autofagii, apoptozy oraz cykl komórkowy. Wykazałam, że naświetlanie wiązką elektronów ma korzystny wpływ na aktywność biologiczną antracyklin w komórkach linii CCRF z opornością wielolekową (CCRF-VCR1000). Spośród trzech badanych antybiotyków antracyklinowych, najsilniejszy efekt był widoczny dla doksorubicyny. Uzyskany rezultat związany jest z wysoką zawartością wolnych rodników powstających

w wyniku napromieniowania doksorubicyny. Wyniki wskazują, że badany model eksperymentalny jest obiecujący i otwiera drogę dla nowych koncepcji stosowania antybiotyków antracyklinowych w leczeniu chorób nowotworowych. Uzyskana większa efektywność przy niskim stężeniu leku, budzi nadzieję na redukcję ryzyka wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych działania antracyklin, które zwykle występują przy podawaniu wysokich dawek leku w powszechnie stosowanych algorytmach leczenia. Badania te były realizowane w ramach projektu pt. "Ocena efektu działania antracyklin poddanych promieniowaniu w komórkach białaczki limfoblastycznej z nadekspresją genu *ABCBI*" finansowanego z funduszu statutowego Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej UMP (502-01-03318432-02496). Wynikiem tych badań jest publikacja w *Chemico-Biological Interactions* opublikowana w roku 2016 (pozycja II/A/6 wg załącznika 5).

Badanie aktywności biologicznej związków występujących w *Drosera spatulata* wobec wybranych linii komórkowych

W ostatnich latach uczestniczyłam także w badaniach dotyczących oceny aktywności biologicznej nowych związków pochodzenia naturalnego. Stosowanie związków pochodzenia naturalnego od wieków stanowi zasadniczy element sztuki lekarskiej. Rośliny lecznicze są bogatym źródłem bioaktywnych związków odgrywających ważną rolę w chemoprewencji i leczeniu chorób przewlekłych dotyczących przewodu pokarmowego, układu krążenia, oddechowego, moczowego, jamy ustnej czy skóry, jak i leczeniu chorób o agresywnym przebiegu m.in. w nowotworach. Nowe, wyizolowane z roślin związki, stanowią dla nas naukowców źródło doskonałej materii do obróbki. W tym obszarze moich zainteresowań ogromną rolę odegrała już wcześniej wspomniana współpraca z prof. dr hab. Jaromirem Budzianowskim i jego zespołem z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UMP. Tym razem nasze badania koncentrowały się na ustaleniu aktywności biologicznej dwóch związków: rossolizydu i kwasu 3-acetyloaleuritolowego (3-*O*-AAA), wyizolowanych z rośliny owadożernej - rosiczki łyżeczkowatej (*Drosera spatulata*). Rossolizyd jest przedstawicielem naftalenu, niezbadanym do tej pory pod kątem aktywności biologicznej. Natomiast kwas 3-*O*-AAA jest pochodną pentacyklicznych triterpenów. W przypadku naszych badań fitochemicznych, co należy podkreślić, kwas 3-*O*-AAA jest wyodrębniony, jako nowy dla gatunku *Drosera spatulata*, dlatego też został poddany analizie aktywności przeciwnowotworowej.

Badania biologiczne były realizowane w ramach projektu pt. „Ocena aktywności biologicznej związków występujących w *Drosera spatulata* wobec wybranych linii komórkowych”, finansowanego z środków UMP (502-01-03318432-02496), którego byłam głównym wykonawcą. Obecnie stosowane metody leczenia chorób nowotworowych cechują się małą selektywnością, co warunkuje ich dużą toksyczność wobec komórek prawidłowych organizmu. W związku z tym niezmiernie ważne jest prowadzenie badań w kontekście typowania związku o silnym działaniu cytotoksycznym i wysokiej wybiórczości zawsze w modelu komórkowym *in vitro* opartym zarówno o komórki nowotworowe, jak i prawidłowe. Moja rola w przedmiotowym projekcie polegała na analizie właściwości cytotoksycznych obu związków właśnie w takim modelu komórkowym, przy wykorzystaniu ludzkich komórek nowotworowych pochodzących z okrężnicy (linia HT29), szyjki macicy (linia HeLaWT) i gruczołu piersiowego (linia estrogenozależna MCF7) oraz komórek nienowotworowych wyprowadzonych z nabłonka gruczołu piersiowego (linia MCF12A). Badania, które realizowałam wykazały, że rossolizyd cechuje się efektem cytotoksycznym wobec komórek linii nienowotworowej (MCF12A) oraz brakiem wpływu na przeżywalność nowotworowych komórek linii HeLaWT, HT29 i MCF7. Natomiast drugi z badanych związków - kwas 3-O-AAA wykazał zależny od stężenia, ale nie zależny od czasu ekspozycji efekt hamowania wzrostu komórek nowotworowych. Dodatkowo, w celu zdefiniowania mechanizmu działania przeciwnowotworowego tego związku przeprowadzałam ocenę cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej, wykonałam test klonogenności oraz test na migrację komórek. Ponadto oznaczyłam wpływ badanego związku na poziom kluczowych białek uczestniczących w procesie adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Uzyskane wyniki wskazują, że kwas 3-O-AAA wybiórczo hamuje proces migracji komórek nowotworowych poprzez obniżenie poziomu kinazy ogniskowo-adhezyjnej, paksyliny oraz $\beta 1$ integryny. Dane te są korzystne z punktu widzenia współczesnej onkoterapii nastawionej nie tylko na poszukiwanie leków skierowanych bezpośrednio przeciw komórkom nowotworowym z określoną zmianą genetyczną, ale również leków uniemożliwiających komórkom nowotworowym rozprzestrzenianie się poza ognisko pierwotne guza. Uzyskane wyniki przyczyniają się do rozwoju nowych, bardziej skutecznych strategii stosowanych w leczeniu nowotworów. Wyniki oddziaływania obu związków wyizolowanych z rosziczki łyżeczkowatej były zaprezentowane na konferencji BIO Congress, 50 th Meeting of the Polish Biochemical Society we Wrocławiu w roku

2016 (pozycja III/B/13 wg załącznika 5) i zostały aktualnie wysłane do recenzji w postaci manuskryptu w *Pharmacological Reports*.

Ocena procesu adhezji w komórkach raka piersi traktowanych syntetycznymi pochodnymi kwasu oleanolowego

Większość czasu mojej działalności naukowej poświęciłam na zgłębianie wiedzy na temat dwóch niezmiernie istotnych procesów biologicznych, jakim podlegają komórki nowotworowe: proces adhezji i migracji oraz proces programowanej śmierci komórki. Zdobyta merytoryczna wiedza oraz umiejętność planowania i prowadzenia badań w obszarze obu zagadnień zostały wykorzystane w ramach kolejnej współpracy, którą podjęłam z dr Natalią Lisiak (z Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej). Owocem naszej kooperacji są trzy pogładowe publikacje na temat autofagii i jej roli w terapii przeciwnowotworowej opublikowane w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (pozycja II/A/3 wg załącznika 5) w roku 2014, w *Journal of Physiology and Pharmacology* (pozycja II/A/4 wg załącznika 5) w roku 2014 oraz w *Current Cancer Drug Targets* (pozycja II/A/10 wg załącznika 5) w roku 2018. W ramach tej współpracy uczestniczyłam także w badaniach oceniających wpływ przedstawiciela cyklicznych triterpenów - kwasu oleanolowego (OA) oraz jego dwóch nowosyntetyzowanych pochodnych: kwasu 3-hydroksyimino-11-oksoolean-12-en-28-owego (HIMOXOL) oraz 28→13 laktonu kwasu 12 α -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego (Br-HIMOLID) na proces adhezji ludzkich komórek nowotworowych pochodzących z gruczołu piersiowego (MCF7, MDA-MB-231, T-47D, MDA-MB-468) oraz nienowotworowych komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF12A). Ponadto, we współpracy z dr Lisiak, dokonałyśmy oceny zaangażowania obu związków w indukcję procesu autofagii w badanych komórkach. Przeprowadzone badania pokazują, że komórki nowotworowe guza traktowane pochodnymi OA, charakteryzują się obniżonym potencjałem adhezyjnym, a w konsekwencji tracą funkcjonalne połączenia z ECM. Mechanizm przeciwnowotworowego działania OA oraz jego dwóch syntetycznych pochodnych opiera się na hamowaniu ekspresji genów zaangażowanych w organizację ognisk adhezji. Uzyskany efekt jest obiecującym zjawiskiem, ponieważ wskazuje na nowe możliwości w leczeniu nowotworów piersi wykazujących zdolność do metastazy. Wyniki tych badań opublikowano w dwóch artykułach: w *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* w roku 2016 (pozycja II/A/7 wg załącznika 5) oraz w *Chemico-Biological Interactions* w roku 2017 (pozycja II/A/8

wg załącznika 5) i zaprezentowano na konferencji międzynarodowej FEBS EMBO Conference Paris we Francji w roku 2014 (pozycja III/B/9 wg załącznika 5).

Ocena skuteczności modyfikacji telomerazy w procesie indukcji śmierci i starzenia komórek raka piersi

Równolegle zostałam także włączona w realizację dwóch projektów, których kierownikiem był dr hab. Błażej Rubiś pt. „Badanie skuteczności siRNA w regulacji ekspresji i aktywności telomerazy zależnie od wyciszonej podjednostki enzymu w komórkach raka piersi” oraz „Identyfikacja mechanizmu indukcji śmierci i starzenia komórek raka piersi w wyniku wyciszenia telomerazy za pomocą systemu lentiwirusowego”, finansowanych przez MNiSW oraz NCN. Realizowane projekty obejmowały wykorzystanie metod molekularnych dla wytypowania optymalnej metody eliminacji telomerazy celem uzyskania jak najlepszego efektu terapeutycznego. Uzyskane wyniki opublikowano w następujących publikacjach: *Molecular Biology Reports* (pozycja II/A/1 wg załącznika 5) i *DNA and Cell Biology* (pozycja II/A/5 wg załącznika 5) oraz *Cellular and Molecular Life Sciences* (pozycja II/A/9 wg załącznika 5), i zaprezentowano na konferencji międzynarodowej 2nd Congress of Biochemistry and Cell Biology, 46th Meeting of the Polish Biochemical Society w Krakowie w roku 2011 (pozycja III/B/5 wg w załącznika 5). Poszerzając wiedzę i nadal skupiając się w zadaniach badawczych nadal nad tematyką znaczenia mechanizmu modulacji ekspresji i aktywności katalitycznej podjednostki telomerazy (hTERT, ang. *human telomerase reverse transcriptase*), zostałam włączona w charakterze głównego wykonawcy, w aktualnie realizowany w Katedrze projekt pt. „Badanie znaczenia regulacji telomerazy dla oporności komórek nowotworowych na leki uszkadzające DNA”, finansowany przez NCN (UMO- 2016/21/B/NZ7/01079), którego kierownikiem jest dr hab. Błażej Rubiś, prof. UMP. Podejmowanym w ramach projektu zagadnieniem jest identyfikacja mechanizmu powiązania telomerazy i wrażliwości komórek nowotworowych na leki uszkadzające DNA w odniesieniu do zjawisk migracji, adhezji i oporności wielolekowej związanej z genami i białkami rodziny ABC w modelu doświadczalnym komórek nowotworowych. Należy podkreślić, że badania te są ważne, ponieważ o zależności pomiędzy regulacją telomerazy, odpowiedzią na leki i lekoopornością komórek nowotworowych wiadomo bardzo niewiele. Znaczenie podejmowanych zagadnień zostało opisane w publikacjach opublikowanych w roku 2017 i 2018 w *Molecular Biology Reports* (pozycja II/A/11 wg załącznika 5) oraz

Wydaw. Nauk. Uniw. Med. (pozycja II/D/3 wg załącznika 5) a dotychczas uzyskane w ramach projektu wyniki zaprezentowano na konferencji międzynarodowej 3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018 w Gdańsku w roku 2018 (pozycja III/B/14 wg w załącznika 5).

