

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego
w Poznaniu

dr n. farm. Jarosław Paluszczyk

Autoreferat

Poznań, 2018

1. Imię i nazwisko: **Jarosław Paluszczak**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Dyplom magistra farmacji – Akademia Medyczna w Poznaniu, 29.07.2003

Stopień doktora nauk farmaceutycznych (dyplom z wyróżnieniem) nadany w dniu 10 marca 2010 r. – Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP), Wydział Farmaceutyczny.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Ocena profilu metylacji DNA w komórkach nowotworowych oraz możliwości jego modulacji przez roślinne polifenole.

Promotor: prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska

Dyplom magistra psychologii – Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 05.12.2011

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.09.2004 – 31.12.2010 – asystent, Katedra Biochemii Farmaceutycznej UMP

01.01.2011 – nadal – adiunkt, Katedra Biochemii Farmaceutycznej UMP

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Ocena znaczenia klinicznego metylacji antagonistów kanonicznej ścieżki Wnt w nowotworach głowy i szyi oraz poszukiwanie możliwości modulacji aktywności szlaku

Podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl pięciu prac oryginalnych opublikowanych w latach 2014-2018 przedstawiających wyniki oceny profilu metylacji genów, których produkty białkowe hamują przebieg szlaku Wnt, przeprowadzonej w materiale klinicznym pochodzącym od chorych na nowotwory głowy i szyi, a także rezultaty analizy wpływu związków naturalnych wyizolowanych z porostów na aktywność szlaku Wnt w komórkach raka okrężnicy.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1.**Paluszczak J**, Hemmerling D, Kostrzevska-Poczekaj M, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, Wierzbicka M, Baer-Dubowska W. (2014) Frequent hypermethylation of WNT pathway genes in laryngeal squamous cell carcinomas. J. Oral Pathol. Med. 43, 652-657.

IF=1,926; MNiSW=30. Liczba cytowań=14

H2.**Paluszczak J**, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, Mielcarek-Kuchta D, Baer-Dubowska W. (2015) The negative regulators of Wnt pathway - *DACH1*, *DKK1* and *WIF1* are methylated in oral and oropharyngeal cancer and *WIF1* methylation predicts shorter survival. Tumor Biol. 36, 2855-2861.

IF=2,926; MNiSW=30. Liczba cytowań=21

H3.**Paluszczak J**, Wiśniewska D, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Grenman R, Mielcarek-Kuchta D, Jarmuż-Szymczak M. (2017) Prognostic significance of the methylation of Wnt pathway antagonists - *CXXC4*, *DACT2*, and the inhibitors of sonic hedgehog signaling - *ZIC1*, *ZIC4* and *HHIP* in head and neck squamous cell carcinomas. Clin. Oral Investig. 21, 1777-1788.

IF=2,308; MNiSW=35. Liczba cytowań=3

H4.**Paluszczak J**, Kiwerska K, Mielcarek-Kuchta D. (2018) Frequent methylation of *DAB2*, a Wnt pathway antagonist, in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. Pathol. Res. Pract. 214, 314-317.

IF=1,543; MNiSW=20

H5.**Paluszczak J**, Kleszcz R, Studzińska-Sroka E, Krajka-Kuźniak V. (2017) Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. Mol. Cell. Biochem. DOI:10.1007/s11010-017-3178-7.

IF=2,669; MNiSW=20

Dla całego cyklu prac sumaryczna wartość wskaźnika **IF** wynosi **11,372**, łączna wartość punktacji **MNiSW** wynosi **135**, zaś łączna **liczba cytowań wg WoS** – **38**.

*Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 5. Oświadczenia habilitanta dotyczące zakresu wykonywanych prac i procentowego udziału znajdują się w załączniku 4.

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

Ścieżka sygnalizacyjna Wnt pełni istotną rolę w embriogenezie, różnicowaniu tkanek oraz prawidłowym funkcjonowaniu komórek macierzystych dorosłego organizmu człowieka. Za wskaźnik jej aktywacji uważa się obecność β -kateniny w jądrze komórkowym, gdzie może ona regulować ekspresję docelowych genów, które posiadają sekwencję rozpoznawaną przez czynniki transkrypcyjne TCF/LEF. Kanoniczna ścieżka Wnt inicjowana jest przez związanie liganda Wnt do kompleksu receptora Frizzled z białkami LRP (Saito-Diaz i wsp. 2013). To zdarzenie aktywuje z kolei białko Dishevelled, które blokuje funkcję kompleksu białkowego złożonego m.in. z GSK3 β , CK1 α , Aksyny, APC, którego funkcją jest kierowanie wolnej, cytoplazmatycznej β -kateniny na drogę zależnego od ubiquityny rozkładu przez proteasom. Skutkuje to kumulacją wolnej β -kateniny w cytoplazmie, co w efekcie prowadzi do jej przemieszczenia do jądra komórkowego, gdzie współdziałając z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TCF/LEF wzmacnia ekspresję takich genów jak *CCND1*, *c-MYC* czy *MMP-7*. Prowadzi to do stymulacji cyklu komórkowego oraz zwiększenia zdolności komórek do migracji, a co za tym idzie, nasilenia ich inwazyjności.

Przyjmuje się, że kanoniczny szlak Wnt nie jest aktywny w większości prawidłowo zróżnicowanych komórek. W tkankach nabłonkowych główną rolą β -kateniny jest uczestniczenie w tworzeniu połączeń międzykomórkowych typu *adherens*, poprzez interakcję z błonową E-kadheryną, α -kateniną oraz aktyną/białkami cytoszkieletu. Stąd, wykrywa się obecność β -kateniny w pobliżu błony komórkowej, a jedynie sporadycznie w cytoplazmie. Praktycznie nie odnotowuje się jej obecności w jądrze komórkowym. Taki obraz stwierdza się także w nabłonku wielowarstwowym płaskim wyścielającym jamę ustną. Komórki warstwy podstawnej charakteryzuje obecność β -kateniny w rejonie błony komórkowej, a poziom β -kateniny w komórkach maleje w kolejnych warstwach komórek w kierunku powierzchni nabłonka. Niski poziom jądrowej β -kateniny wskazuje na niewielką aktywność kanonicznej ścieżki Wnt w prawidłowo funkcjonującym nabłonku jamy ustnej (Liu i wsp. 2010). Wzorec ten zmienia się w przypadku dysplastycznych zmian przednowotworowych oraz w płaskonabłonkowych nowotworach regionu głowy i szyi (HNSCC), na co wskazuje podwyższony poziom ekspresji ligandów Wnt i receptorów Frizzled oraz obecność podwyższonego poziomu β -kateniny w jądrze komórek HNSCC (Alvarado i wsp. 2011; Leethanakul i wsp. 2000). Obecność jądrowej β -kateniny stwierdza się w około jednej piątej do jednej czwartej przypadków HNSCC, szczególnie we froncie inwazyjnym guza (Odajima i wsp. 2005; Garcia-Pedrero i wsp. 2015). Badania funkcjonalne wskazują na istotny udział szlaku Wnt w progresji raków głowy i szyi, poprzez wpływ na proliferację, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych. Jednocześnie mechanizmy aktywacji szlaku Wnt w tej grupie nowotworów pozostają słabo poznane.

Znaczenie aktywacji kanonicznej ścieżki Wnt w etiopatogenezie nowotworów zostało najwcześniej potwierdzone w przypadku guzów jelita grubego, w których niezwykle często obserwuje się wyciszające mutacje genu *APC*, kodującego jedno z najważniejszych białek hamujących przebieg szlaku. Stwierdza się również mutacje genu *CTNNB1*, kodującego β -kateninę, które uniemożliwiają fosforylację tego białka, na skutek czego upośledzona jest degradacja cytoplazmatycznej β -kateniny, co może prowadzić do jej przemieszczania do jądra komórkowego i aktywacji transkrypcji regulowanej przez czynniki TCF/LEF. Takich zmian genetycznych nie odnotowuje się jednak w rakach głowy i szyi. W badaniach nie stwierdzono występowania mutacji *CTNNB1*, a stosunkowo rzadkie zmiany w obrębie *APC* (Lea i wsp. 2007; Yeh i wsp. 2003). Dodatkowo sporadycznie wykrywa się mutacje *FAT1* (Morris i wsp. 2013). Aktualnie dominuje hipoteza o nadrzędnej roli zmian epigenetycznych w aktywacji kanonicznej ścieżki Wnt w HNSCC. Epigenetyczne wyciszenie niektórych genów kodujących białka hamujące przebieg szlaku zostało stwierdzone w rakach jamy ustnej (Sogabe i wsp. 2008; Towle i wsp. 2013).

Równowaga w szlaku Wnt w prawidłowych komórkach zachowywana jest m.in. dzięki aktywności wielu białek inhibitorowych (Saito-Diaz i wsp. 2013). Zewnątrzkomórkowe białka inhibitorowe (*SFRP1-5*, *DKK1-3*, *WIF1*) mają zdolność wiązania ligandów Wnt lub blokowania receptorów. Inhibitory cytoplazmatyczne (*APC*, *DACH1*, *DAB2*, *DACT1/2*) osiągają swój efekt głównie poprzez stymulację fosforylacji i degradacji β -kateniny. W przypadku inhibitorów jądrowych (*RUNX3*), ich działanie jest przede wszystkim związane z osłabianiem aktywności transkrypcyjnej β -kateniny. W wielu nowotworach obserwuje się utratę ekspresji tych genów, co zaburza aktywność ścieżki przez zniesienie sygnałów hamujących. Metylacja sekwencji promotorowych tych genów supresorowych jest dobrze udokumentowanym mechanizmem znoszenia ich ekspresji w komórkach rakowych. Poza najbardziej typowymi inhibitorami (*SFRPs*, *DKKs*), do tej pory nie poddano analizie jak często zjawisko to zachodzi w rakach głowy i szyi. To zaś nie tylko umożliwiłoby potwierdzenie roli mechanizmów epigenetycznych w indukowaniu aktywacji szlaku, ale również mogłoby przełożyć się na możliwości opracowania nowych markerów diagnostycznych.

Ocena obecności i/lub poziomu metylacji specyficznych sekwencji DNA ma potwierdzoną wartość w molekularnej diagnostyce nowotworów (Paluszczak & Baer-Dubowska 2006). W przypadku analiz zaburzeń szlaku Wnt w HNSCC, zarówno badania histochemiczne jak i badania DNA wskazywały na ich diagnostyczną przydatność (Ravindran & Devaraj 2012). Z uwagi jednak na potencjalnie szybszą i prostszą w wykonaniu ocenę metylacji sekwencji promotorowych genów kodujących inhibitory ścieżki, a także fakt, że w jej przypadku materiałem do badań może być zarówno wycinek guza jak i krew obwodowa, strategia ta wydaje się korzystniejsza w diagnostyce klinicznej.

Jednym z głównych celów badań przedstawionych w pracach składających się na cykl będący podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego była charakterystyka częstości

występowania oraz ocena diagnostycznej wartości metylacji grupy genów związanych z negatywną regulacją szlaku Wnt w rakach głowy i szyi.

O ile analiza literatury naukowej wskazywała na częste występowanie metylacji kilku kluczowych zewnątrzkomórkowych inhibitorów szlaku Wnt (*SFRPs*, *DKKs*, *WIF1*) w rakach jamy ustnej (OSCC) (Pannone i wsp. 2010; Yeh i wsp. 2003), brakowało takich informacji w odniesieniu do raków krtani (LSCC), z wyjątkiem danych dotyczących genu *RUNX3* (Tang i wsp. 2010). Histologicznie, błona śluzowa krtani nieco różni się od błony śluzowej jamy ustnej i gardła, ponieważ częściowo buduje ją nabłonek wielorzędowy migawkowy. Analizy histochemiczne wykazały jednak zaburzoną lokalizację subkomórkową β -kateniny także w tej grupie nowotworów. Status metylacji inhibitorów szlaku pozostawał jednak nieznany. Wyniki badań zaprezentowane w **publikacji H1** wskazują na bardzo częste występowanie metylacji genów *DKK1*, *PPP2R2B*, *SFRP1*, *SFRP2* i *WIF1* w LSCC, zaś brak metylacji *LKB1* i *RUNX3*. W badaniach wykorzystano materiał dwojakiego rodzaju – próbki DNA z ustalonych linii komórkowych raka krtani oraz wyizolowane bezpośrednio z wycinków guzów. Zaobserwowano dużą zgodność profilu metylacji badanego panelu genów między liniami komórkowymi wyprowadzonymi z raków krtani, a materiałem klinicznym pochodzącym z guzów pierwotnych. Częstość metylacji genów była bardzo wysoka, a co za tym idzie, w większości przypadków indeks metylacji (stosunek liczby genów zmetylowanych do liczby wszystkich badanych genów) był również wysoki, tzn. wykrywano jednoczesną metylację kilku genów: u 70% pacjentów stwierdzono metylację 3-5 genów. Istotnym elementem badań było włączenie do analizy próbek DNA wyizolowanych z wycinków prawidłowego, niezmienionego makroskopowo marginesu operacyjnego. Również w tym materiale odnotowano częstą metylację genów *DKK1*, *PPP2R2B*, *SFRP1*, *SFRP2* i *WIF1*. W przeważającej liczbie przypadków metylacja każdego z genów występowała jednocześnie w guzie i marginesie operacyjnym. W tym względzie, wyjątek stanowił gen *DKK1*, dla którego najczęściej odnotowywano obecność metylacji w marginesie operacyjnym przy braku metylacji w guzie. Od wielu lat do wyjaśniania obrazu klinicznego raków głowy i szyi wykorzystywany jest model kancerogenezy płaszczyznowej (Mohan & Jagannathan 2014). Zakłada się, że rozległa powierzchnia nabłonka ulega molekularnym zmianom, głównie pod wpływem narażenia na chemiczne kancerogeny, tworząc pole błony śluzowej predysponowane do przekształcenia w nowotwór. Kumulacja aberracji molekularnych w określonym miejscu błony śluzowej rozległego pola determinuje rozwój guza. Uzyskane wyniki wpisują się w taki model rozumienia etiopatogenezy HNSCC. Główne kancerogeny odpowiedzialne za powstawanie raków krtani – dym tytoniowy oraz wysokoprocentowe alkohole, cechuje zdolność do indukowania w komórkach nieprawidłowości epigenetycznych (Chang i wsp. 2004; Vuilleminot i wsp. 2004). Uzyskane wyniki wskazały, że epigenetyczne wyciszenie antagonistów ścieżki występuje powszechnie w nowotworach głowy i szyi. Ponadto ustalono, że metylacja badanych genów wpływa znacząco na poziom ich ekspresji. Analiza danych uzyskanych wcześniej z użyciem mikromacierzy wykazała, że ekspresja *PPP2R2B*, *SFRP2* i *WIF1* była znacząco

niższa w liniach komórkowych cechujących się obecnością metylacji tych genów. Takiego związku nie odnotowano w przypadku *SFRP1*, co wskazuje, że metylacja analizowanego odcinka DNA promotora tego genu nie ma decydującego wpływu na poziom jego ekspresji. Istotną obserwacją, z diagnostycznego z punktu widzenia, było stwierdzenie różnic w częstości występowania kometylacji *PPP2R2B* i *SFRP2* między liniami komórkowymi wyprowadzonymi z guzów pierwotnych i guzów będących wynikiem wznowy. Wszystkie linie wyprowadzone z wznowy nowotworu cechowała kometylacja genów. Gen *PPP2R2B* koduje jedno z białek kompleksu PP2A, który hamowany jest przez onkogenne białko CIP2A. Stwierdzono, że nadekspresja CIP2A jest częstym zjawiskiem w raku jamy ustnej (Basile & Czerninski 2010). Wyniki badań własnych wskazują pośrednio, że utrata ekspresji *PPP2R2B* na drodze metylacji promotora może potencjalnie upośledzać funkcję PP2A w rakach krtani, prowadząc do zaburzenia równowagi układu CIP2A/PP2A, które jak do tej pory obserwowane było w rakach jamy ustnej. W połączeniu z wynikami innych prac stanowi to podstawę do przyjęcia założenia, że układ CIP2A/PP2A może być celem terapeutycznym w HNSCC.

Ponieważ za cel badań postawiono charakterystykę częstości występowania metylacji możliwie szerokiego panelu genów kodujących inhibitory szlaku Wnt oraz analizę wartości diagnostycznej ich metylacji w HNSCC, kontynuowano badania poddając weryfikacji częstość metylacji tych genów, które do tej pory nie były pod tym kątem analizowane w HNSCC, w porównaniu z genami o udowodnionej regulacji epigenetycznej w tej grupie nowotworów.

W kolejnym etapie określono stopień metylacji genów *DACH1*, *DKK1* i *PPP2R2B* dla których brak było takich danych w odniesieniu do raków jamy ustnej, w połączeniu z oceną metylacji genów *LKB1*, *RUNX3*, *SFRP2* i *WIF1*, których epigenetyczna regulacja była wcześniej oceniana w OSCC (Sogabe i wsp. 2008; Yeh i wsp. 2003; Pannone i wsp. 2010). Wyniki tych analiz opisane są w **pracy H2**. Podobnie jak w publikacji H1, ponownie w pierwszym etapie badań testowano występowanie metylacji tych genów w liniach komórkowych wyprowadzonych z raków jamy ustnej. Stwierdzono częstą metylację *WIF1* oraz *SFRP2*, a także umiarkowanie częstą metylację *DKK1* i *DACH1*. Podobnie jak wcześniej w przypadku raków krtani, nie stwierdzono znaczącej obecności metylacji *RUNX3* czy *LKB1*. Co ciekawe, gen *PPP2R2B*, który wykazywał wysoki odsetek metylacji w LSCC, nie był zmetylowany w żadnej z badanych linii komórkowych OSCC. Wskazuje to, że status metylacji *PPP2R2B* w dużej mierze może diagnostycznie różnicować raki krtani od raków jamy ustnej. Od kilkunastu lat wiadomo, że zmiany w metylacji genów układają się w profil, który jest charakterystyczny dla danego typu nowotworu, w zależności od narządu czy tkanki, z której się wywodzi. Istotną kwestią, którą należy zbadać w trakcie poszukiwań markera molekularnego, jest to, na ile analizowany marker jest specyficzny dla komórek nowotworów. Wymaga to określenia profilu metylacji genów w prawidłowych komórkach tej samej tkanki. Jak wiadomo, pozyskiwanie materiału tkankowego od osób zdrowych zwykle nie jest praktykowane ze względu na ograniczenia etyczne, a

zatem uzyskanie prawidłowego materiału porównawczego nastręcza sporo trudności. Niektórzy badacze rozwiązują ten problem poprzez wykorzystywanie w tym celu prawidłowych makroskopowo wycinków marginesu operacyjnego, jednak jak pokazują wcześniej opisane badania, materiał taki może również wykazywać obecność zmian molekularnych zgodnie z modelem kancerogenezy płaszczyznowej. W związku z tym, jako materiał kontrolny wykorzystane zostały komercyjnie dostępne próbki DNA wyizolowane z komórek nabłonkowych jamy ustnej i tchawicy pobranych od zdrowych dawców. Żaden z badanych genów nie wykazywał metylacji w DNA pochodzącym z komórek prawidłowego nabłonka, z wyjątkiem genu *SFRP2*. Taka obserwacja w przypadku tego ostatniego genu jest zgodna z wcześniejszymi konkluzjami innych autorów (Sogabe i wsp. 2008). Na podstawie tych rezultatów stwierdzono, że metylacja *WIF1*, *DKK1* i *DACH1* jest specyficzna dla komórek rakowych. W kolejnym etapie potwierdzono, że poziom metylacji tych genów istotnie wpływa na ich ekspresję, co jest ważne, ponieważ tylko w ten sposób może przekładać się na cechy fenotypowe. Pełna metylacja *DKK1* i *WIF1* związana była z bardzo niskim poziomem ekspresji. W odniesieniu do genu *DACH1* nie było możliwe zaobserwowanie takich zależności, ponieważ w jego przypadku testowane linie komórkowe wykazywały jedynie częściową metylację. Zarówno badania własne jak i dane literaturowe wskazują zaś, że tylko pełna metylacja genu może znacząco obniżać (wyciszać) jego ekspresję. Bazując na obserwacjach poczynionych w trakcie realizacji badań opisanych w publikacji H1, wskazujących, że profil metylacji genów w liniach komórkowych LSCC w dużej mierze pokrywa się z profilem zmian obserwowanych w guzach pierwotnych, postanowiono w dalszej części badań z wykorzystaniem próbek DNA wyizolowanych z pierwotnych OSCC poddać analizie tylko geny *WIF1*, *DKK1* i *DACH1*, których metylacja była obecna w liniach OSCC, a nieobecna w komórkach prawidłowego nabłonka. Potwierdzono wysoką częstość metylacji *WIF1* oraz umiarkowaną częstość metylacji *DACH1*, natomiast w przypadku genu *DKK1* odnotowano rzadkie występowanie metylacji. Co ciekawe, w porównaniu z obrazem zmian w rakach krtani, ogólna częstość metylacji genów w OSCC była niższa, co wskazuje, że komórki nabłonka krtani mogą być bardziej podatne na występowanie zmian w poziomie metylacji genów, co jest zgodne także z innymi badaniami własnymi. Ważne było również odkrycie zależności pomiędzy występowaniem metylacji *WIF1*, a krótszym czasem przeżycia pacjentów.

Testowane geny nie wyczerpują listy inhibitorów szlaku Wnt, które mogą ulegać epigenetycznemu wyciszaniu w nowotworach. W kolejnym etapie rozszerzono pulę genów o kolejne, które rzadziej lub w ogóle nie były do tej pory analizowane pod tym kątem w HNSCC. W **publikacji H3** skupiono uwagę na genach *CXXC4*, *DACT2* i *HDPR1* (*DACT1*), które kodują wewnątrzkomórkowe białka hamujące szlak Wnt głównie poprzez interakcję z białkiem Disheveled, oraz *FBXW11*, który koduje białko uczestniczące w zależnym od ubikwityny rozkładzie β -kateniny. Poza szlakiem Wnt, wśród ścieżek sygnalizacyjnych ważnych dla rozwoju embrionalnego oraz funkcji komórek macierzystych, a nadmiernie aktywnych w nowotworach, wymienia się także ścieżkę Shh (McMillan & Matsui 2012).

Niewiele jest danych na temat roli tego szlaku w patogenezie nowotworów głowy i szyi (Cavicchioli Buim i wsp. 2011; Dimitrova i wsp. 2013), szczególnie na temat mechanizmów jego aktywacji w HNSCC. Pojedyncze prace wskazują na metylację genów kodujących inhibitory tej ścieżki: *PTCH1* oraz *ZIC4* (Ghosh i wsp. 2012; Guerrero-Preston i wsp. 2014). Ze względu na brak szerszych danych na ten temat, postanowiono przeanalizować w pracy profil metylacji genów *HHIP*, *PTCH1*, *SUFU*, *ZIC1* i *ZIC4*, które hamują szlak Shh na różnych jego poziomach, odpowiednio: wyłapywania ligandów, blokowania czynnika transkrypcyjnego Gli poprzez utrzymywanie go w cytoplazmie lub antagonizowania jego funkcji w jądrze komórkowym. Podobnie jak w pracy H2, wykonano w pierwszym etapie analizę metylacji wszystkich wyżej wymienionych genów w liniach komórkowych HNSCC, a geny dla których uzyskano pozytywne wyniki badano dalej w materiale pochodzącym z guzów pierwotnych. Odnotowano niezwykle częstą metylację *ZIC1*, bardzo częstą metylację *ZIC4*, umiarkowanie częstą metylację *HHIP* oraz niższą częstość metylacji *CXXC4* i *DACT2* w liniach komórkowych. Dla żadnego z tych genów nie stwierdzono występowania metylacji w komórkach prawidłowego nabłonka jamy ustnej czy tchawicy, co wskazuje na specyficzność zjawiska dla komórek nowotworowych. W ocenie wpływu metylacji genów *CXXC4*, *DACT2* i *HHIP* na poziom ich ekspresji zastosowano tym razem sposób analizy umożliwiający odniesienie intensywności ekspresji względem prawidłowych keratynocytów z jamy ustnej. W przypadku *CXXC4* tylko całkowita metylacja genu warunkowała obniżenie jego ekspresji. Podobne wyniki uzyskano dla *HHIP*, jednak tutaj łagodne obniżenie ekspresji następowało już przy częściowej metylacji genu. Z kolei obecność metylacji nie wpływała na średni poziom ekspresji genu *DACT2* w liniach komórkowych HNSCC. Zwykle silna metylacja promotora genu prowadzi do jego wyciszenia, jak pokazuje jednak przykład *DACT2*, mechanizmy regulacji epigenetycznej wykazują większy stopień złożoności, polegając na skomplikowanej sieci interakcji między różnymi modyfikacjami histonów a modyfikacjami DNA. Dodatkowo, w praktyce metylacja różnych odcinków DNA może z różną siłą wpływać na tworzenie nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny, więc tylko dokładne zbadanie całego odcinka wyspy/wysp CpG podatnych na metylację może pozwolić na dokładne określenie, jak rozkład metylacji w obrębie danej sekwencji DNA przekłada się na intensywność ekspresji genu. Taka analiza nie była jednak celem pracy. Dla wytypowanych pięciu genów przeprowadzono następnie ocenę metylacji w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów z rakami głowy szyi. Z wyjątkiem *CXXC4*, wszystkie geny wykazywały wysoką częstość metylacji w obu podgrupach HNSCC, a także obecność metylacji w marginesie operacyjnym chorych z OSCC. Ponownie zaobserwowano wyższą częstość metylacji w rakach krtani niż rakach jamy ustnej, choć nie dla wszystkich genów: *ZIC1* i *ZIC4* wykazywały równie wysoki odsetek metylacji w LSCC, co w OSCC. Jednak dla genów *DACT2*, *CXXC4* oraz *HHIP* różnice były znaczące. W związku z tym współczynnik metylacji w przypadku LSCC wyniósł 0,78, zaś w przypadku OSCC – 0,56. Może to być oczywiście związane z różnicami w charakterystyce klinicznej pacjentów – liczba guzów bardziej zaawansowanych (T3-T4) w podgrupie LSCC była znacznie wyższa, ale z kolei w podgrupie OSCC wyższy był odsetek pacjentów z przerzutami do

węzłów chłonnych. W związku z tymi odmiennościami, wniosek o większej kumulacji zmian w profilu metylacji DNA w rakach krtani nie może być jednak traktowany jako wystarczająco uprawniony. Metylacja genów *CXXC4*, *HHIP* i *ZIC1* nie była wcześniej opisywana w HNSCC. Wiadomo jednak, że poziom białka HHIP ulega częstemu obniżeniu w OSCC (Snijders i wsp. 2005), co może wskazywać, że mechanizm takiego wyciszenia może być związany z regulacją epigenetyczną. Metylacja tylko jednego genu – *ZIC4*, miała wartość prognostyczną i wiązała się z krótszym czasem przeżycia, ale tylko w podgrupie pacjentów z OSCC. W przypadku analizy łącznego występowania metylacji wszystkich pięciu genów stwierdzono, że wyższy współczynnik metylacji w rakach jamy ustnej może wiązać się z krótszym czasem przeżycia. Wyższy współczynnik metylacji genów w marginesie operacyjnym pochodzącym od pacjentów z rakiem jamy ustnej wiązał się z kolei z wystąpieniem drugiego pierwotnego nowotworu. Ze względu jednak na zbyt małą liczbę przypadków, przeprowadzone analizy statystyczne należy traktować z dużą ostrożnością. Sugerują one jednak, że poziom zmian molekularnych mierzony liczbą zmetylowanych genów może wskazywać na progresję choroby nowotworowej, na co wskazują również prace innych autorów.

W ostatnim etapie badań zweryfikowano, czy w liniach komórkowych OSCC dochodzi do metylacji kolejnych czterech inhibitorów szlaku Wnt: *NKD2*, *Axin*, *CDX2* i *DAB2* (dane niepublikowane). Jak do tej pory stwierdzono metylację tych genów w innych typach nowotworów, nie ma jednak dokładniejszych wyników w odniesieniu do raków głowy i szyi. Spośród 15 analizowanych linii, tylko w jednej stwierdzono obecność metylacji sekwencji promotorowej genu *NKD2*, zaś nie stwierdzono metylacji *Axin* czy *CDX2*. Metylację genu *DAB2* zaobserwowano z kolei w większości linii. W kolejnej pracy (**publikacja H4**) poddano zatem ocenie częstość występowania metylacji genu *DAB2* w rakach jamy ustnej. Stwierdzono bardzo wysoki odsetek metylacji tego genu (70%) w wycinkach guzów, zaś brak metylacji w kontrolnych, prawidłowych keratynocytach jamy ustnej. Obecność metylacji *DAB2* nie była jednak powiązana z czasem przeżycia pacjentów, w przeciwieństwie do parametrów klinicznych. Zarówno guzy T3-T4, jak i guzy z wykrywalnymi przerzutami komórek nowotworowych do węzłów chłonnych związane były ze znacząco krótszym czasem przeżycia, co jest zgodne z aktualną wiedzą. Jak do tej pory nie udało się klinicznie potwierdzić wartości żadnego markera molekularnego, który pozwalałby na pewniejsze stawianie prognozy, niż na podstawie parametrów klasyfikacji TN, z naciskiem na ten drugi człon. Co ciekawe, metylacja *DAB2* była analizowana w jednej pracy innych autorów, w której stwierdzono podobny odsetek metylacji, odmiennie jednak niż w moich badaniach, odnotowano związek zarówno z zajęciem węzłów chłonnych, jak i czasem przeżycia (Hannigan i wsp. 2010). Takie różnice mogą wynikać z dysproporcji w analizowanych populacjach klinicznych.

W podsumowaniu tej części badań można stwierdzić, że istnieje duża jednorodność profilu metylacji genów będących inhibitorami ścieżek Wnt i Shh w grupie płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi, a występujące różnice mają głównie charakter ilościowy. Jedyńm markerem różnicującym raki

krtni od raków jamy ustnej była obecność metylacji *PPP2R2B*. Pojawiają się jednak odmienności w zakresie prognostycznego znaczenia metylacji poszczególnych genów (np. *ZIC4*). Wykazano, że metylacja większości z analizowanych genów jest specyficzna dla procesu nowotworowego, jednak nie ogranicza się wyłącznie do komórek nowotworowych, ponieważ jest wykrywana także w prawidłowym marginesie operacyjnym, zgodnie z modelem kancerogenezy płaszczyznowej.

Wysoka częstość metylacji analizowanych genów czyni je potencjalnie obiecującymi markerami obecności raków głowy i szyi. Wynikiem przeprowadzonych badań jest zatem wytypowanie genów kandydatów, których diagnostyczną przydatność należy potwierdzić w kolejnych analizach. We wszystkich publikacjach składających się na osiągnięcie habilitacyjne ograniczono się do wykrywania obecności metylacji genów tylko w materiale operacyjnym. Najnowsze odkrycia wskazują z kolei na ogromne możliwości wykorzystania w diagnostyce molekularnej wolnokrążącego DNA izolowanego z osocza pacjentów. W Zakładzie Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka PAN przeprowadzono pilotażowe badanie z użyciem techniki mikromacierzy mające na celu porównanie poziomu metylacji genów w osoczu krwi między osobami zdrowymi oraz chorymi na raka krtani. W ramach współpracy, na bazie tych danych stwierdzono, że poziom metylacji przynajmniej niektórych z genów kandydatów opisywanych w pracach składających się na cykl habilitacyjny jest kilkukrotnie wyższy w osoczu pacjentów z nowotworem niż u zdrowych kontroli (dane niepublikowane). W związku z tym kolejne badania będą zmierzały do oceny wartości diagnostycznej analizy metylacji tych genów w badaniu prospektywnym w grupie chorych na raka głowy i szyi w ramach grantu finansowanego przez NCBR (POIR.04.01.04-000003/17). W efekcie ma to umożliwić opracowanie markera diagnostycznego (tzw. płynna biopsja) służącego do monitorowania przebiegu leczenia.

Biologiczne skutki aktywacji kanonicznej ścieżki Wnt, tzn. nasilona proliferacja komórek nowotworowych, oporność na indukcję apoptozy, zwiększona zdolność komórek do migracji, a także wzmożona inwazyjność komórek, są współodpowiedzialne za agresywny fenotyp komórek, związany z progresją choroby nowotworowej. Pewne dane sugerują, że aktywacja szlaku Wnt może mieć istotne znaczenie w powstawaniu nowotworów złośliwych, a zatem jego hamowanie może mieć potencjalnie istotne znaczenie terapeutyczne. W komórkach raka głowy i szyi wyciszenie funkcji β -kateniny na drodze interferencji RNA znacząco redukowało złośliwy fenotyp i wzrost guzów (Chang i wsp. 2013; Duan & Fan 2011). Taka strategia przeciwnowotworowa jest również skuteczna w zwalczaniu innych typów komórek nowotworowych, w tym komórek nowotworów jelita grubego (Novellasedemunt i wsp. 2015), które są często punktem odniesienia w badaniach szlaku Wnt, ze względu na dobrze opisane mechanizmy aktywacji tego szlaku w guzach jelita grubego. Jak na razie nie wprowadzono do praktyki klinicznej leków przeciwnowotworowych, których mechanizm działania opierałby się o hamowanie szlaku Wnt. Prowadzone są jednak badania nad identyfikacją i weryfikacją skuteczności inhibitorów tej ścieżki.

Drugim celem badań była ocena możliwości modulacji kanonicznej ścieżki Wnt przez związki naturalne i syntetyczne w komórkach nowotworowych.

Ze względu na zakładane znaczenie modyfikacji epigenetycznych w indukcji aktywności szlaku Wnt w komórkach raka głowy i szyi na drodze wyciszania inhibitorów ścieżki, można przyjąć hipotezę, że zahamowanie aktywności szlaku byłoby możliwe z użyciem modulatorów epigenetycznych. Takie testy przeprowadzono w kilku liniach komórkowych raka głowy i szyi (FaDu, BICR6, H314, CAL27, SCC-25), z zastosowaniem decytabiny jako inhibitora metylotransferaz DNA, oraz panobinostatu – inhibitora deacetylaz histonów. Zakładać można, że zmniejszenie poziomu metylacji DNA ma szansę przywrócić ekspresję wyciszonych inhibitorów szlaku Wnt. Podobne efekty mogłyby być skutkiem zwiększenia poziomu acetylacji histonów, co w dużej mierze związane jest ze wzrostem poziomu ekspresji genów supresorowych w komórkach nowotworowych. Efekty obu tych leków porównywano z działaniem inhibitora aktywności transkrypcyjnej β -kateniny – PKF118-310. Decytabina pozostawała bez istotnego wpływu na poziom aktywności szlaku mierzony nasileniem ekspresji genów znajdujących się pod transkrypcyjną kontrolą β -kateniny, z wyjątkiem linii CAL27, w której obniżała poziom ekspresji *c-MYC* i *MMP7*. Z kolei panobinostat wykazywał efekty zależne od zastosowanej linii komórkowej, obniżając aktywność szlaku (spadek ekspresji genu *Axin2*) w liniach raka języka (CAL27 i SCC-25), lecz dając zróżnicowane efekty w zależności od badanego genu i testowanej linii w pozostałych liniach komórkowych. Stosowany dla porównania związek PKF118-310 obniżał aktywność szlaku w niektórych (CAL27, FaDu) z linii komórkowych wyprowadzonych z raków regionu głowy i szyi. Różnice w obserwowanych efektach między liniami nowotworowymi głowy i szyi i linią raka okrężnicy HCT116 wskazywać mogą, że aktywność szlaku Wnt może być z jednej strony słabsza w HNSCC niż w nowotworach jelita grubego, a z drugiej mniej rozpowszechniona. Zgadzałoby się to z obserwacją innych autorów, że tylko około jedna trzecia z szerokiego zestawu badanych linii komórkowych raków głowy i szyi była wrażliwa na inhibitor szlaku Wnt LGK-974 (Liu i wsp. 2013). Działanie inhibitorów deacetylaz histonów było do tej pory analizowane w innych typach komórek, a wyniki badań są sprzeczne, tzn. w zależności od układu eksperymentalnego substancje z tej grupy prowadziły do nasilenia lub spadku aktywności kanonicznej ścieżki Wnt (Bordonaro i wsp. 2007; Gotze i wsp. 2014). Niewiele jest doniesień na temat wpływu inhibitorów metylotransferaz DNA na przebieg ścieżki Wnt, jednak pewne dane sugerują możliwość hamowania szlaku pod ich wpływem (Li i wsp. 2014), co nie zostało potwierdzone w moich badaniach. Wyniki tej części doświadczeń zostały do tej pory zaprezentowane na dwóch konferencjach naukowych (pozycje III/B/18 i III/B/19 wg załącznika 4). Wskazują one, że o ile metylacja genów kodujących inhibitory szlaku Wnt jest częstym zjawiskiem w rakach głowy i szyi, o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym, to analizowane mechanizmy epigenetyczne nie stanowią dobrego punktu uchwytu dla inhibicji tej ścieżki. Może to być związane z niską wybiórczością, jeśli chodzi o zakres genów, których ekspresja zmienia się pod wpływem klasycznych modulatorów

epigenetycznych, szczególnie w przypadku inhibitorów deacetylaz histonów. Być może również mechanizmy epigenetyczne nie są decydujące, jeśli chodzi o aktywację ścieżki Wnt w HNSCC. Może na to wskazywać także dysproporcja pomiędzy wysokim odsetkiem pacjentów wykazujących obecność metylacji wspomnianych genów kodujących białka antagonistyczne, a dużo niższym odsetkiem pacjentów, u których stwierdza się obecność jądrowej β -kateniny.

W dalszych poszukiwaniach możliwych inhibitorów szlaku Wnt skupiono się na ocenie aktywności związków naturalnych wyodrębnionych z porostów: depsydów (atranoryna, kwas lekanorowy, kwas skwamatowy), depsydonów (kwas fizodowy, kwas salazynowy) i kwasu kaperatowego (trójkarboksylowy kwas tłuszczowy). Ich biologiczne właściwości, a przede wszystkim molekularne mechanizmy działania przeciwnowotworowego w komórkach ludzkich są słabo poznane. Wiadomo jednak, że wyciągi z porostów mogą hamować wzrost guzów jelita grubego (He i wsp. 2010). Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie szlaku Wnt w patogenezie nowotworów okrężnicy uznano, że warto sprawdzić, czy inhibicja szlaku Wnt może stanowić molekularny mechanizm działania związków z porostów. Wyniki takich badań przedstawiono w **publikacji H5**. W celu weryfikacji, czy wskazane substancje wpływają na aktywność szlaku Wnt w liniach komórkowych nowotworu jelita grubego DLD-1 i HCT116, oceniono najpierw ich wpływ na poziom ekspresji genów *Axin2*, *CCND1*, *c-MYC*, *MMP7*, *BIRC5*, których transkrypcja jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne TCF/LEF aktywowane wskutek utworzenia kompleksu z jądrową β -kateniną. W celach porównawczych stosowano inhibitor β -kateniny – PKF118-310 (Lepourcelet i wsp. 2004). Związek ten hamował poziom ekspresji genu *Axin2*, który jest typowym genem docelowym kanonicznej ścieżki Wnt. Wśród związków wyizolowanych z porostów, największą zdolność do redukcji zależnej od β -kateniny ekspresji genów po 48-godzinnej inkubacji wykazywały kwasy fizodowy i kaperatowy. Podobnie jak PKF118-310, kwas kaperatowy i kwas fizodowy obniżały ekspresję genów *Axin2*, *MMP7* i *BIRC5* także po 24-godzinnej inkubacji w linii komórkowej HCT116, lecz znacznie słabiej w linii DLD-1. PKF118-310 i kwas fizodowy obniżały także białkowy poziom aksyny 2. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji oraz poziomu fosforylacji β -kateniny nie wykazała wpływu żadnej z badanych substancji na te parametry, wskazując, że modulacja aktywności szlaku dokonuje się najprawdopodobniej przez mechanizmy wewnątrzjądrowe. Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypowano kwas kaperatowy i kwas fizodowy jako potencjalne inhibitory szlaku Wnt i dalej charakteryzowano ich aktywność biologiczną. Ze względu na zdolność do modulacji poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i apoptozy, postanowiono zweryfikować wpływ tych związków na zdolność indukowania apoptozy oraz dystrybucję komórek w zależności od fazy cyklu komórkowego. W tym celu wykorzystano analizę cytometryczną z użyciem urządzenia Muse Cell Analyzer. W obu oznaczeniach jako pozytywną kontrolę używano kamptotecyny – znany inhibitor topoizomazy I o działaniu przeciwnowotworowym. Inkubacja 24-godzinna była niewystarczająca do zaobserwowania wyraźnych zmian w nasileniu apoptozy. Tylko

kamptotecyna i kwas fizodowy łagodnie podwyższały odsetek komórek apoptotycznych. Efekty były bardziej wyraźne przy zastosowaniu 48-godzinnej inkubacji z tymi związkami. Komórki linii HCT116 były mniej wrażliwe na proapoptotyczne działanie badanych związków, w przeciwieństwie do komórek linii DLD-1, w których zarówno kwas kaperatowy, jak i kwas fizodowy stymulowały proces apoptozy na poziomie porównywalnym z kamptotecyną. Co ciekawe, komórki nienowotworowych keratynocytów linii HaCaT były znacznie bardziej odporne na proapoptotyczne działanie kwasu kaperatowego. Sugerować to może do pewnego stopnia specyficzność jego działania względem komórek nowotworowych. Analiza żywotności komórek również wykazała mniejszą podatność komórek linii HaCaT do redukcji ich liczby pod wpływem związków z porostów, z wyjątkiem kwasu fizodowego. W przeciwieństwie do kamptotecyny, która zgodnie z oczekiwaniami indukowała zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, pozostałe związki nie wpływały na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu. Oceniono również testem zarastania szczeliny wpływ PKF118-310, kwasu kaperatowego i kwasu fizodowego na zdolność komórek HCT116 i DLD-1 do migracji. Kwas kaperatowy wykazywał podobny do PKF118-310 poziom redukcji migracji komórek w obu badanych liniach komórkowych. Kwas fizodowy z kolei nie wykazywał zmian istotnych statystycznie. Ocena wpływu związków na inwazyjność komórek HCT116 nie wykazała w tym względzie ich istotnej aktywności, choć zaznaczyła się tendencja do obniżenia liczby inwazyjnych komórek pod wpływem kwasów kaperatowego i fizodowego. Efekty działania tych dwóch najbardziej aktywnych związków z porostów do pewnego stopnia imitowały działanie inhibitora β -kateniny – PKF118-310. Zapewne jednak plejotropowe efekty tych naturalnych związków wynikają z bardziej złożonego molekularnego mechanizmu działania, którego rozumienie należałoby pogłębić w dalszych badaniach. Opisane właściwości kwasu kaperatowego, którego działanie biologiczne nie było do tej pory nigdy badane, są jednak bardzo obiecujące. Obserwowana niska cytotoksyczność, bardziej zaznaczona wobec komórek nowotworowych sugeruje, że ta substancja mogłaby znaleźć zastosowanie także w chemoprewencji, szczególnie tam, gdzie etiopatogenetycznie kancerogeneza ściśle związana jest z aktywacją szlaku Wnt, jak w nowotworach okrężnicy. Wymaga to oczywiście dalszej weryfikacji eksperymentalnej. Ze względu na obiecujące działanie kwasu kaperatowego i kwasu fizodowego w liniach nowotworu okrężnicy, postanowiono sprawdzić, czy zdolność hamowania szlaku Wnt pojawi się także w przypadku linii komórkowych raka głowy i szyi (dane niepublikowane). Analizowano wpływ substancji w liniach CAL27 i FaDu na ekspresję genów docelowych szlaku Wnt. Stwierdzono, że kwas kaperatowy nie zmieniał poziomu ekspresji genu *Axin2* w linii FaDu, zaś nieznacznie ją zmniejszał w komórkach CAL27 (o ok. 10%), łagodnie obniżał ekspresję *CCND1* i *BICR5* (spadek o ~10%), ale znacznie redukował ekspresję *MMP7* (o około 50%) w obu liniach. Kwas fizodowy wywoływał słabsze efekty, ale również obniżał najsilniej poziom ekspresji *MMP7*. Wyniki te potwierdzają, że kwas kaperatowy można traktować jako nowy obiecujący inhibitor szlaku Wnt, a dalsze badania muszą skupić się na dokładniejszym wyjaśnieniu jego mechanizmu działania.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego zaliczyć można:

1. Wskazanie na częstą metylację genów *DKK1*, *PPP2R2B*, *SFRP1*, *SFRP2*, *WIF1* w rakach krtani
2. Scharakteryzowanie profilu metylacji nie badanych do tej pory w HNSCC inhibitorów szlaku Wnt: *CXXC4*, *FBXW11* i *DACH1*
3. Wykazanie, że metylacja genu *PPP2R2B* różnicuje raki krtani od raków jamy ustnej
4. Wykazanie, że ocena metylacji *WIF1* i *ZIC4* ma wartość prognostyczną w rakach głowy i szyi
5. Wykazanie zdolności kwasu kaperatowego i kwasu fizodowego do hamowania aktywności szlaku Wnt w liniach komórkowych nowotworu jelita grubego
6. Wykazanie właściwości proapoptotycznych kwasu kaperatowego oraz jego zdolności do obniżania zdolności komórek nowotworowych linii HCT116 do migracji

Piśmiennictwo

Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M et al. Nuclear translocation of beta-catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology*. 2011;59:283-91.

Basile JR, Czerninski R. The role of CIP2A in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2010;10:700-702.

Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. *Exp Cell Res*. 2007;313:1652-66.

Cavicchioli Buim ME, Gurgel CA, Goncalves Ramos EA, Lourenco SV, Soares FA. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. *Human pathology*. 2011;42:1484-90.

Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101:125-132.

Chang HW, Lee YS, Nam HY, et al. Knockdown of β -catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Signal* 2013;25:839-47

Duan Y, Fan M. Lentivirus-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human tongue cancer cells. *J Oral Pathol Med* 2011;40:643-50

Dimitrova K, Stoeher M, Dehghani F et al. Overexpression of the Hedgehog signalling pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Onkologie* 2013;36:279-86.

Ghosh A, Ghosh S, Maiti GP et al. Association of FANCC and PTCH1 with the development of early dysplastic lesions of the head and neck. *Annals of surgical oncology*. 2012;19 Suppl 3:S528-38.

Gotze S, Coersmeyer M, Muller O, Sievers S. Histone deacetylase inhibitors induce attenuation of Wnt signaling and TCF7L2 depletion in colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2014;45:1715-23.

Garcia-Pedrero JM, Garcia-Cabo P, Angeles Villaronga M, et al. Prognostic significance of E-cadherin and beta-catenin expression in HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2017;39:2293-300.

Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L et al. Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics* 2014;9(7).

Hannigan A, Smith P, Kalna G, et al. Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter, *The Journal of clinical investigation*, 2010;120:2842-2857.

He X, Hu Y, Winter J, Young GP. Anti-mutagenic lichen extract has double-edged effect on azoxymethane-induced colorectal oncogenesis in C57BL/6J mice. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2010;20:31-35.

Lea IA, Jackson MA, Li X et al. Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis* 2007;28:1851-58

Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 2000;19:3220-24

Lepourcelet M, Chen YN, France DS, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer cell* 2004;5:91-102

Li K, Hu C, Mei C, Ren Z, Vera JC, Zhuang Z et al. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J Transl Med*. 2014;12:167.

Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res*. 2010;89:318-30

Liu J, Pan S, Hsieh MH, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:20224-29

McMillan R, Matsui W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research*. 2012;18:4883-8.

Mohan M, Jagannathan N. Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncology reviews*. 2014;8:244.

Morris LG, Kaufman AM, Gong Y, et al. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet* 2013;45:253-61

Novellademunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309:C511-521.

Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, et al. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum Pathol.* 2005;36:234-41.

Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer – the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet.* 2006;47:365-75

Pannone G, Bufo P, Santoro A, et al. WNT pathway in oral cancer: Epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncology reports.* 2010;24:1035-41.

Ravindran G, Devaraj H. Aberrant expression of β -catenin and its association with Δ Np63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest* 2012;16:1275-88

Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X et al. The way Wnt works: Components and mechanisms. *Growth Fact* 2013;31:1-31

Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2005;24:4232-42.

Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008;32:1253-61

Tang J, Bai W, Ji W, Gao H, Liu J. Relationship between hypermethylation of Runx3 gene and the development and metastasis of laryngeal carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010;24:834-37.

Towle R, Truong D, Hogg K et al. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol* 2013;49:1033-42

Vuilleminot BR, Pulling LC, Palmisano WA, Hutt JA, Belinsky SA. Carcinogen exposure differentially modulates RAR-beta promoter hypermethylation, an early and frequent event in mouse lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004;25:623-629.

Yeh KT, Chang JG, Lin TH, et al. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathway-related genes in oral cancer. *Int J Oncol* 2003;23:1001-7

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

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

Aktywność naukową w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej rozpocząłem już w trakcie studiów farmaceutycznych angażując się w latach 2001-2003 w działalność Studenckiego Koła Naukowego Biochemii Farmaceutycznej. W jego ramach prowadzone były prace dotyczące charakterystyki wpływu wybranych roślinnych związków fenolowych na aktywność szlaku sygnałowego NF- κ B *in vivo* w modelu skórnej kancerogenezy u myszy. Tego dotyczyła też moja praca magisterska wykonana pod kierunkiem prof. Wandy Baer-Dubowskiej i pod opieką dr. Michała Cichockiego. Aktywację ścieżki NF- κ B uzyskiwano poprzez działanie na skórę myszy estrem forbolu – TPA, a następnie aplikowano roztwory badanych substancji. Badane związki roślinne zmniejszały poziom aktywacji szlaku poprzez zwiększenie poziomu cytoplazmatycznego białka inhibitorowego I κ B, które utrzymuje czynniki NF- κ B w stanie nieaktywnym. Co za tym idzie, obniżał się także wewnątrzjądrowy poziom podjednostek p65 i p50 czynnika NF- κ B. Biorąc pod uwagę znaczenie szlaku NF- κ B nie tylko w regulacji procesów zapalnych, ale także w indukcji kancerogenezy, jego hamowanie przez testowane substancje może wskazywać, że ich potencjał chemoprewencyjny może wynikać m.in. z oddziaływania na tę ścieżkę sygnalizacyjną. Wyniki zostały ujęte w publikacji w *Molecular Nutrition and Food Research* (pozycja II/A/1 wg załącznika 4).

We wrześniu 2004 roku rozpocząłem pracę w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zainteresowany znaczeniem procesów związanych z regulacją ekspresji genów w kancerogenezie, skupiłem swoją uwagę na zjawiskach epigenetycznych. W tamtym okresie epigenetyka nowotworów była nową dziedziną badań budzącą entuzjazm ze względu na pojawiające się możliwości jej wykorzystania w terapii i diagnostyce nowotworów. Ówczesny stan wiedzy na ten temat opisałem obszernie w artykule poglądowym opublikowanym w czasopiśmie *Postępy Biochemii* (pozycja II/D/1 wg załącznika 4). Ze względu na dużą rolę przypisywaną metylacji DNA, zdecydowałem się na podjęcie badań eksperymentalnych w tym obszarze. Prace przebiegały dwutorowo.

Modyfikacje epigenetyczne cechuje odwracalność, co jest kluczowe z punktu widzenia terapii nowotworów. Obserwacje, że geny supresorowe nierzadko ulegają w komórkach nowotworowych wyciszeniu na drodze epigenetycznej dały impuls do poszukiwania związków, które mogłyby przywrócić ich ekspresję poprzez wpływ na informację epigenetyczną. Metylacja DNA katalizowana jest przez metylotransferazy DNA (DNMT). Pochodne nukleozydowe cytozyny (5-azacytydyna i decytabina) będące inhibitorami DNMT stosowane są w chemioterapii białaczek. Wykazano też, że ich stosowanie obniżało ryzyko rozwoju nowotworu w zwierzęcych modelach eksperymentalnych. Związki te jednak nie nadają się do stosowania w chemoprewencji ze względu na zbyt wysoką

toksyczność. Podjęte przeze mnie prace miały na celu poszukiwanie inhibitorów DNMT wśród roślinnych polifenoli. Wraz z prof. Wandą Baer-Dubowską oraz dr Violetą Krajką-Kuźniak przygotowałem projekt badawczy, który uzyskał finansowanie z MNiSW. Analizowano najpierw wpływ związków o zróżnicowanej budowie chemicznej (proste i złożone kwasy fenolowe oraz flawonoidy) na aktywność DNMT w teście bezkomórkowym i stwierdzono, że silna inhibicja aktywności enzymatycznej zachodzi pod wpływem kwasu elagowego, kwasu protokatechowego, kwasu rozmarynowego, kwasu synapinowego, kwasu syrynginowego, bajkaleiny i cyjanidyny. Następnie weryfikowano działanie biologiczne związków pod kątem indukcji demetylacji genów supresorowych w komórkach linii nowotworu piersi MCF7 oraz raka krtani UT-SCC-42B. Jedynie zastosowana jako pozytywna kontrola decytabina wykazywała zdolność indukcji demetylacji *RASSF1A*, *GSTP1* i *HIN-1* w komórkach MCF7, zaś testowane roślinne polifenole nie wykazywały takiego działania. Najprawdopodobniej obecność ugrupowania katecholowego warunkuje aktywność hamującą DNMT w testach bezkomórkowych bazujących na użyciu ekstraktu białek z jądra komórkowego jako źródła enzymu, poprzez zmniejszanie puli S-adenozylometioniny (SAM), będącej donorem grupy metylowej w reakcji metylacji katalizowanej zarówno przez DNMT, jak i COMT, która metabolizuje związki katecholowe. Z kolei taki efekt nie pojawia się *in vitro* ze względu na możliwość regeneracji puli SAM. Wyniki te zaprezentowałem m.in. na konferencji EACR w Lyonie w 2008 roku (pozycja III/B/3 wg załącznika 4) oraz w ramach wystąpienia ustnego na Zjeździe PTBioch w Łodzi w roku 2009 (pozycja III/B/4 wg załącznika 4).

Analiza profilu metylacji genów supresorowych umożliwia opracowanie markerów molekularnych, które mogą znaleźć zastosowanie w wykrywaniu nowotworów, a także ustalaniu prognozy i przewidywaniu stopnia wrażliwości na leczenie. Wiedzę na temat wykorzystania analizy metylacji DNA w diagnostyce onkologicznej przedstawiłem w pracy pogładowej opublikowanej w *Journal of Applied Genetics* (pozycja II/D/2 wg załącznika 4). Ze względu na specyficzność tkankową oraz względem podtypu nowotworu, każdorazowo należy ustalić charakterystyczny profil metylacji genów. Z uwagi na niewielką ilość danych odnośnie profilu metylacji DNA w nowotworach głowy i szyi, postanowiono zbadać to zagadnienie. Dzięki współpracy z dr hab. Małgorzatą Wierzbicką z Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej UMP zgromadzono materiał kliniczny pochodzący od pacjentów z pierwotnym nowotworem krtani, którzy poddawani byli całkowitej laryngektomii. Od każdego z pacjentów pobierano wycinek guza, a także fragmenty niezmienionej nowotworowo błony śluzowej nagłośni i tchawicy. Po izolacji DNA, określano profil metylacji genów *RARB*, *RASSF1A*, *FHIT*, *GSTP1*, *MGMT*, *VHL* i *DAPK* dla każdej z próbek. Stwierdzono wysoką częstość metylacji *DAPK*, *RARB*, *MGMT*, umiarkowaną częstość metylacji *RASSF1A*, *FHIT* oraz praktycznie brak metylacji *GSTP1* i *VHL*. Metylacja genu *MGMT* wykazywała związek z występowaniem przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. Ponadto, w przypadku niemal połowy guzów wykrywano metylację trzech lub czterech genów. Częstość metylacji genów była tylko nieznacznie niższa w błonie śluzowej nagłośni i tchawicy, wskazując na istnienie pola zmienionego epigenetycznie

nabłonka. Było to pierwsze doniesienie dotyczące występowania epigenetycznego defektu pola w rakach krtani. Równolegle przeprowadzono analizę profilu metylacji genów w liniach komórkowych wyprowadzonych z raków krtani. W większości wyniki pokrywały się między materiałem klinicznym i liniami komórkowymi, wskazując, że linie komórkowe są dobrym wstępnym modelem do badania zmian w profilu metylacji DNA. Wyniki te zaprezentowałem m.in. na konferencji tematycznej AACR dotyczącej epigenetyki nowotworów w Bostonie w roku 2008 (pozycja III/B/24 wg załącznika 4) oraz na konferencji EACR w Oslo w 2010 roku (pozycja III/B/5 wg załącznika 4).

Na podstawie wyników tych badań przygotowałem rozprawę doktorską, której obrona miała miejsce 1 marca 2010 roku. Rezultaty zostały opisane w trzech publikacjach, które ukazały się w *Toxicology Letters*, *Toxicology In Vitro* oraz *Oral Oncology* (pozycje II/A/2, II/A/3 oraz II/A/4 wg załącznika 4).

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

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałem pracę w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej UMP. Moje zainteresowania naukowe w dalszym ciągu skupiały się głównie wokół biologii molekularnej i epigenetyki nowotworów, szczególnie w aspekcie wykorzystania tej wiedzy w celach diagnostyki i terapii, a także prewencji nowotworów.

Wiele uwagi poświęciłem badaniom związanym z poszukiwaniem markerów epigenetycznych opartych na analizie metylacji DNA w nowotworach. Prace dotyczyły raków głowy i szyi oraz guzów mózgu. Jako wykonawca w projekcie MNiSW „Wartość prognostyczna marginesu resekcyjnego w nowotworach głowy i szyi w oparciu o wieloczynnikową analizę uwzględniającą badania morfologiczne, zmiany epigenetyczne oraz utratę heterozygotyczności genów. Próba ustalenia algorytmów postępowania” kierowanego przez dr Danielę Mielcarek-Kuchtę z Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej UMP przeprowadziłem ocenę profilu metylacji pięciu genów: *RARBeta*, *CDKN2A*, *CDH1*, *FHIT* i *ATM* w rakach jamy ustnej. Od pacjentów pobierano wycinki centralnej i peryferyjnej części guza oraz fragment prawidłowego nabłonka marginesu operacyjnego. Częstość metylacji genów była bardzo zróżnicowana. Najwyższy odsetek metylacji zaobserwowano dla *CDH1* i *CDKN2A*. Częstość metylacji *RARBeta* i *FHIT* była marginalnie niska, zaś gen *ATM* nie wykazywał metylacji w żadnej z badanych próbek. W przypadku genów *CDH1* i *CDKN2A* peryferyjna część guza wykazywała częściej obecność ich metylacji. Dla obu tych genów zaobserwowano także występowanie ich metylacji w niezmienionej makroskopowo błonie śluzowej marginesu operacyjnego. Wskazało to ponownie na istnienie epigenetycznego defektu pola w rakach głowy i szyi oraz zwróciło uwagę na fakt heterogenności profilu metylacji genów w komórkach nowotworowych różnych obszarów guza. Część peryferyjna tworząca tzw. inwazyjny front może posiadać nieco inny zestaw zmian molekularnych, które mogą zwiększać inwazyjny charakter komórek. Wśród zbadanych genów nie udało się jednak zidentyfikować dobrego markera prognostycznego, choć geny te zostały

dobrane na podstawie istniejących przesłanek o ich możliwym znaczeniu dla prognozy chorych na nowotwór. W tym względzie większą wartość okazała się mieć analiza mikroskopowa pobranych wycinków tkanek. Rezultaty badań zostały opublikowane w *Tumour Biology* (pozycja II/A/10 wg załącznika 4).

W latach 2011-2014 byłem kierownikiem projektu NCN „Ocena wartości prognostycznej potencjalnych markerów epigenetycznych w optymalizacji terapii guzów mózgu”, którego głównym celem była identyfikacja epigenetycznych markerów umożliwiających predykcję odpowiedzi na leczenie. Badaniu poddano szeroki zestaw genów: *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *CDKN2B* (*p15INK4B*), *p14ARF*, *CDKN2A* (*p16INK4A*), *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN* i *RARβ*. Stwierdzono, że w guzach pochodzenia glejowego najczęściej metylacji ulegają *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *MGMT*, zaś nie wykryto metylacji *ERCC1*, *hMLH1*, *NDRG2* w żadnej z analizowanych próbek. Zarówno obecność metylacji *RUNX3* jak i wartość indeksu metylacji dla wszystkich genów miały związek ze skalą klasyfikacji WHO, sugerując, że ocena profilu metylacji całego panelu genów wskazuje na stopień agresywności nowotworu. W grupie oponiaków profil metylacji genów był odmienny – odnotowano najwyższy odsetek metylacji genów *CDKN2B* (*p15INK4B*), *p14ARF*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, przy czym ogólnie częstość metylacji genów mierzona jako indeks metylacji była istotnie niższa w tej grupie nowotworów OUN. Ponownie, metylacja *RUNX3* wykazywała związek z klasyfikacją WHO, sugerując, że jest to dobry wskaźnik agresywności nowotworu. Dodatkowo stwierdzono, że metylacja *RASSF1A* różnicuje pierwotne guzy pochodzenia glejowego od guzów metastatycznych. Ponieważ w przypadku części pacjentów poza wycinkami guzów dysponowano także próbkami krwi, wyizolowano wolnokrążący DNA z osocza i określono profil metylacji genów. Obecność fragmentów wolnokrążącego DNA (cfDNA) w krwi jest fizjologiczna, jednak w chorobach nowotworowych obserwuje się często wzrost jego ilości w krwi, a jego najczęstszym źródłem są prawdopodobnie obumierające komórki nowotworowe. Ta postać DNA obecna w krwi odzwierciedla zatem obraz zmian genetycznych i epigenetycznych, charakterystycznych dla komórek nowotworowych. Celem prac było określenie możliwości wykrycia metylacji w cfDNA chorych na nowotwory OUN oraz ocena stopnia zgodności profilu metylacji między próbkami DNA wyodrębnionymi z guzów i osocza tych samych pacjentów. Stwierdzono wysoką zgodność (globalnie ~80%) profilu metylacji genów *MGMT*, *CDKN2B* (*p15INK4B*), *p14ARF*, *RASSF1A* w wycinkach guzów i osoczu chorych. Wyniki niezgodne były najczęściej wynikami fałszywie negatywnymi, tzn. nie wykrywano metylacji genu, kiedy była ona obecna w wycinku guza. Rezultaty tych badań opublikowano w *Journal of Applied Genetics*, *Tumour Biology* i *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (pozycje II/A/6, II/A/12 oraz II/A/13 wg załącznika 4).

Uczestniczyłem także w badaniach aktywności związków (pół)syntetycznych i pochodzenia naturalnego o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i/lub chemoprewencyjnym.

Szlak Nrf2 jest ważnym wewnątrzkomórkowym szlakiem cytoprotekcyjnym, który reguluje poziom ekspresji wielu enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków oraz białek antyoksydacyjnych. W ramach grantu MNiSW kierowanego przez dr hab. Violetę Krajkę-Kuźniak brałem udział w określeniu wpływu betaniny, ksantohumolu, floretamidu, procyanidyn zawartych w wyciągu z kory głogu (*Crataegus oxyacantha* L.), kwasu protokatechowego oraz kwasu taninowego na funkcję szlaku Nrf2 w immortalizowanych hepatocytach THLE-2 oraz komórkach raka wątroby HepG2. Betanina indukowała translokację Nrf2 do jądra komórkowego oraz wiązanie do DNA w linii THLE-2. Towarzyszyła temu stymulacja ekspresji transferaz glutationowych GSTM, GSTP i GSTT, a także oksydoreduktazy NAD(P)H:chinon (NQO1). Określano także wpływ betaniny na status metylacji promotora genu *GSTP1*, który w komórkach HepG2 ulega epigenetycznemu wyciszeniu. W przeciwieństwie do referencyjnego inhibitora metylotransferaz DNA – decytabiny, betanina nie redukowała metylacji *GSTP1*. Podobny profil działania wykazywały procyanidyny zawarte w wyciągu z głogu, a także floretamid. Ich aktywność również ograniczała się do komórek linii THLE-2 i związana była ze stymulacją translokacji Nrf2 do jądra komórkowego oraz nasileniem ekspresji GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, NQO1 i HO-1. Tak betanina, jak i procyanidyny czy floretamid mogą indukować ekspresję białek cytoprotekcyjnych poprzez aktywację szlaku Nrf2 w komórkach nienowotworowych hepatocytów, co może mieć znaczenie w hepatoprotekcji oraz chemoprewencji nowotworów, nasilając ochronę przed toksynami i chemicznymi kancerogenami. W porównaniu z tymi związkami, ksantohumol – prenylowany chalkon obecny w szyszkach chmielu, wykazywał silniejszą cytotoksyczność zarówno wobec prawidłowych, jak i nowotworowych hepatocytów, choć komórki THLE-2 wykazywały mniejszą podatność na obniżenie żywotności, wskazując na większą selektywność wobec komórek HepG2 w pewnym zakresie stężeń (10<30 μM). Ksantohumol nasilał ekspresję czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz stymulował jego translokację do jądra komórek THLE-2 i HepG2. Wiązało się to z nasileniem ekspresji GSTP, GSTT, NQO1 i HO-1 w komórkach THLE-2 oraz GSTA i GSTP w komórkach HepG2. Najsilniejszą z odnotowanych zmian była indukcja oksygenazy hemu (HO-1) w komórkach THLE-2, co wskazuje, że ksantohumol może istotnie nasilać obronę antyoksydacyjną. Jego działanie może być zatem niezwykle korzystne w aspekcie hepatoprotekcji i chemoprewencji, ale z drugiej strony niepożądane w chemioterapii, ponieważ mogłoby obniżyć skuteczność stosowanych metod leczenia.

Działanie kwasu protokatechowego i kwasu taninowego w komórkach nowotworu wątroby linii HepG2 porównywano z efektami działania lepiej scharakteryzowanych induktorów enzymów II fazy – izotiocyjanianu fenetylu oraz indolo-3-karbinolu. Najsilniejszym induktorem Nrf2 był izotiocyjanian fenetylu, jednak wszystkie związki stymulowały translokację Nrf2 do jądra komórkowego i zwiększały poziom aktywnej, ufosforylowanej postaci Nrf2. Towarzyszyła temu stymulacja ekspresji GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, NQO1, UGT1A (izoforma 1A transferazy UDP-glukuronianowej), a także ważnych białek antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy, reduktazy glutationu oraz peroksydazy glutationu. Badane substancje zatem nie tylko nasilają reakcje sprzęgania

ksenobiotyków z glutationem czy kwasem glukuronowym, ale także zwiększają zdolność komórek do neutralizacji związków chinonowych oraz reaktywnych form tlenu.

Wszystkie te rezultaty wskazują, że spożywanie produktów zawierających badane fitozwiązki może chronić przed uszkodzeniami wątroby wywołanymi działaniem chemicznych kancerogenów, ale także przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego, a przez to – stanów zapalnych. Wyniki badań zostały przedstawione w artykułach, które ukazały się w *British Journal of Nutrition*, *Toxicology In Vitro*, *Food and Chemical Toxicology*, *Phytotherapy Research*, *Journal of Physiology and Biochemistry*, *Journal of Medical Science* (pozycje II/A/5, II/A/7, II/A/8, II/A/9, II/A/11 oraz II/D/3 wg załącznika 4).

Rola Nrf2 w chemoprewencji nowotworów została opisana w artykule poglądowym opublikowanym w czasopiśmie *Pharmacological Reports* (pozycja II/A/15 wg załącznika 4).

W ostatnim czasie charakteryzowano wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na aktywność szlaków Nrf2 i NFkappaB w komórkach nowotworu wątroby, wskazując na zależność efektów od modyfikacji struktury chemicznej. Wyniki jak do tej pory przedstawiono w formie doniesień konferencyjnych (pozycje III/B/21 i III/B/22 wg załącznika 4).

Porosty stanowią bogate źródło substancji biologicznie czynnych. Jednym z interesujących związków jest kwas usninowy, który występuje w postaci dwóch izomerów optycznych. Źródłem kwasu usninowego jest na przykład *Cladonia uncialis*. We współpracy z dr Elżbietą Studzińską-Sroką z Katedry Farmakognozji UMP dokonano porównania działania cytotoksycznego wyciągu acetonowego z *C. uncialis* oraz izomerów optycznych kwasu usninowego względem immortalizowanych keratynocytów linii HaCaT. Izomer prawoskrętny okazał się silniej obniżać żywotność komórek HaCaT niż izomer lewoskrętny. Ponadto, zaobserwowano słabsze działanie wyciągu niż oczyszczonych związków: wartość IC₅₀ dla wyciągu *C. uncialis* wyniosła 11,81 µg/ml, a w przypadku kwasów, odpowiednio 7,08 µg/ml dla kwasu (-)-usninowego oraz 4,77 µg/ml dla kwasu (+)-usninowego. Niższa toksyczność wyciągu, przy porównywalnym działaniu przeciwbakteryjnym, sugeruje, że będzie on bezpieczniejszym składnikiem maści do stosowania na skórę.

Działanie biologiczne kwasu (+)-usninowego oceniano także w komórkach raka gardła linii FaDu. O ile związek ten nie miał wpływu na ekspresję genów zależnych od szlaku Wnt, to wykazywał zdolność modulacji ścieżki Nrf2 w tej linii komórkowej. Pod jego wpływem obserwowano nasilenie translokacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 do jądra komórkowego oraz wzrost ekspresji genów GSTP, NQO1 oraz SOD zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Sugeruje to, że związek ten może indukować mechanizmy cytoprotekcyjne w tym typie komórek. Wyniki zaprezentowano w formie doniesienia konferencyjnego (pozycja III/B/17 wg załącznika 4).

Również inne związki z porostów wykazują zdolność modulacji ścieżki Nrf2. Aktywność taką stwierdzono w przypadku depsydów (atranoryna, kwas lekanorowy, kwas skwamatowy) i depsydonów (kwas fyzodowy, kwas salazynowy) w komórkach nowotworu jelita grubego linii DLD-1

i HCT116. Związki te wpływały także na poziom aktywności szlaku NF- κ B. Wyniki zaprezentowano w formie doniesienia konferencyjnego (pozycja III/B/37 wg załącznika 4).

Wszystkie te rezultaty sugerują, że ze względu na zdolność do modulowania kilku istotnych ścieżek sygnalizacyjnych związanych z regulacją proliferacji komórek, odpowiedzi zapalnej czy apoptozy, związki z porostów mogą mieć potencjał chemoprewencyjny i przeciwnowotworowy.

Brałem także udział w badaniach zleconych przez przedsiębiorstwo Phytopharm Kłęka S.A., których celem była ocena aktywności przeciwzapalnej ekstraktu etanolowego z liści bluszczu (*Hedera helix*). Badania wykonywano na hodowli ludzkich makrofagów zróżnicowanych z monocytów linii THP-1 pod wpływem PMA. Odpowiedź zapalną wywoływano poprzez traktowanie komórek LPS przez 3-24 godz. i sprawdzano, jak na ten proces wpływa badany wyciąg. Kontrolę pozytywną stanowił budesonid. Badany wyciąg podwyższał poziom przeciwzapalnej interleukiny 10, bez istotnego wpływu na poziom innych oznaczanych cytokin. Przeprowadzono także ocenę ekspresji genów COX-2 oraz iNOS techniką qPCR. Stwierdzono, że krótki czas ekspozycji związany był z obniżeniem poziomu ekspresji COX2 w komórkach traktowanych LPS. Z kolei budesonid obniżał poziom ekspresji COX2 zarówno w komórkach stymulowanych, jak i niestymulowanych LPS. Ekspresja iNOS pozostawała na bardzo niskim poziomie. Uzyskane wyniki wskazały, że badany wyciąg z bluszczu posiada umiarkowane właściwości przeciwzapalne/immunomodulacyjne.

W roku 2011 realizowałem badania w ramach grantu Iuventus Plus, którego byłem kierownikiem. Wstępne rezultaty z pracy doktorskiej wskazywały, że niektóre roślinne polifenole mają zdolność hamowania aktywności glikohydrolazy poli(ADP-rybozy). Wskazuje się, że enzym ten może z kolei regulować aktywność metylotransferaz DNA, a przez to wpływać na stopień metylacji DNA. Ponadto, innym enzymem regulowanym pod wpływem PARG jest sirtuina 1 (SIRT1), która również wpływa na ekspresję genów m.in. poprzez deacetylację histonów. Celem prowadzonych badań było określenie, czy zahamowanie aktywności PARG może zmieniać profil ekspresji wybranych genów supresorowych w komórkach linii raka piersi MDA-MB-231. Zastosowano dwie strategie badawcze. Z jednej strony obniżano poziom PARG na drodze interferencji RNA uzyskując obniżenie poziomu białka o około 60%, a z drugiej – hamowano aktywność PARG przez inkubację komórek w obecności mirycetyny, kwasu elagowego i kwasu rozmarynowego. Stosując technikę immunoprecypitacji chromatyny określano poziom wybranych kowalencyjnych modyfikacji histonów: H3K9ac, H3K9me3, H3K27me3, H4K16ac w obrębie sekwencji promotorowych genów *CDH1*, *SFRP* lub *TMS1* w wyodrębnionych po IP frakcjach DNA. Na skutek zahamowania ekspresji PARG w obrębie promotorów genów *CDH1* i *SFRP* zaobserwowano wyraźny wzrost poziomu acetylacji H3K9 oraz trimetylacji H3K27, a także wzrost acetylacji H4K16 w przypadku genu *CDH1*. Celem badań było określenie, czy inhibicja PARG może wpływać pośrednio na poziom kowalencyjnych modyfikacji histonów kontrolowanych przez SIRT1. Dla porównania efektów siRNA anty-PARG wykonano zatem

eksperymenty z zastosowaniem inhibitora SIRT1 – związku EX-527. Wyniki wskazują na wyraźny wzrost acetylacji H4K16, a ponadto, co ciekawe, wzrost trimetylacji H3K27 w obrębie promotorów genów *SFRP* i *CDH1*. Porównanie wyników badań z zastosowaniem siRNA anty-PARG oraz syntetycznego inhibitora SIRT1 – EX527 wskazywać może, że przynajmniej w części obserwowane efekty są bardziej wynikiem zmian na poziomie oddziaływań białko-białko między SIRT1 a innymi białkami regulatorowymi, niż na skutek zmian aktywności enzymatycznej białka. Wykorzystując technikę immunoprecypitacji zmetylowanego DNA (meDIP) określono także wpływ siRNA anty-PARG na metylację promotora genu *CDH1*, jednak otrzymane wyniki wskazują na jedynie nieznaczne obniżenie stopnia metylacji docelowej sekwencji, bez statystycznej istotności.

Analiza działania mirycetyny, kwasu elagowego i kwasu rozmarynowego wykazała, że wszystkie te związki zwiększały poziom poli(ADP-rybozyl)owanych białek w obrębie trzech analizowanych subfrakcji: 113 kDa (PARP), 37 kDa (histon H1), 12 kDa (białka z rodziny HMG), co może potwierdzać wewnątrzkomórkowe zahamowanie aktywności PARG pod ich wpływem. Ponadto, mirycetyna wykazywała podobny profil zmian do tych indukowanych pod wpływem inhibitora SIRT1 – EX-527, zwiększając poziom acetylacji H4K16, ale także trimetylacji H3K27 w sekwencjach promotorów *SFRP* oraz *TMS1*. Kwas elagowy zmniejszał acetylację H4K16 przy wzroście trimetylacji H3K27, zaś kwas rozmarynowy nie wpływał istotnie na profil badanych modyfikacji histonów. Na tej podstawie stwierdzono, że spośród badanych substancji to mirycetyna może być obiecującym związkiem zdolnym do reaktywacji wyciszonych epigenetycznie genów supresorowych co może znaleźć zastosowanie w epigenetycznej chemoprewencji.

Potwierdzono, że inhibicja PARG może znacząco wpływać na profil kowalencyjnych modyfikacji histonów, a możliwym wyjaśnieniem mechanizmu takiego działania jest modulacja funkcji SIRT1, potencjalnie zarówno na poziomie aktywności enzymatycznej, jak i interakcji z innymi białkami regulatorowymi.

Ostatnia dekada związana jest z intensyfikacją badań nad zmianami metabolizmu energetycznego w komórkach nowotworowych. Wskazuje się tu nie tylko na znaczenie efektu Warburga związanego z nasileniem tlenowej glikolizy, ale również na rolę zaburzeń metabolizmu glutaminy. Mechanizmy prowadzące do zmian w metabolizmie komórek nowotworowych nie są do końca jasne, jednak postuluje się, że istotny udział mają procesy epigenetyczne. Sirtuiny są grupą białek, które mogą odgrywać dużą rolę w indukcji takich zmian metabolicznych, co zostało opisane w artykule poglądowym opublikowanym w *Pharmacological Reports* (pozycja II/A/14 wg załącznika 4). Niezwykle istotne znaczenie przypisuje się również czynnikom transkrypcyjnym c-MYC i Hif1 α , które wpływają na poziom ekspresji m.in. enzymów szlaku glikolizy i glutaminolizy. Komórki raka głowy i szyi również prezentują wspomniane zmiany metaboliczne. Ich przeżycie zależy głównie od dostępu glukozy, choć obecność glutaminy maksymalizuje tempo proliferacji. W związku z tym przeprowadzono badania, których celem było określenie jak substancje o różnych punktach uchwytu

wpływają na procesy metaboliczne w komórkach raka głowy i szyi. Porównywano działanie inhibitora c-MYC – 10058-F4, inhibitora Hif1 – KG-548, deoksyglukozy, która blokuje przebieg glikolizy oraz kwasu aminooksyoctowego – nieselektywnego inhibitora aminotransferaz. Stwierdzono, że deoksyglukoza oraz 10058-F4 zależnie od stężenia zmniejszają żywotność komórek linii FaDu. Ponadto, 10058-F4 obniżał wydzielanie końcowych produktów glikolizy i glutaminolizy – mleczanu i amoniaku, zaś KG-548 i deoksyglukoza obniżały produkcję wyłącznie mleczanu. Mechanizm działania związany był z wpływem na ekspresję dwóch białek enzymatycznych, które są kluczowymi regulatorami tlenowej glikolizy. Inhibitor c-MYC obniżał ekspresję kinazy pirogronianowej PKM2, a także dehydrogenazy mleczanowej, zaś deoksyglukoza zmniejszała poziom ekspresji heksokinazy. Ze względu na postulowane związki między aktywnością szlaku Wnt a nasileniem zmian metabolicznych w komórkach nowotworu jelita grubego, oceniano także, czy modulacja tej ścieżki ma zdolność modyfikowania metabolizmu w komórkach raka głowy i szyi. W tym celu porównywano działanie chlorku litu – induktora kanonicznej ścieżki Wnt oraz inhibitora aktywności transkrypcyjnej β -kateniny – PKF118-310 w komórkach nowotworowych linii BICR6, BICR18, CAL27, FaDu i SCC-25 w porównaniu z nienowotworowymi keratynocytami OKF4/TET-1. LiCl zwiększał produkcję mleczanu w komórkach linii BICR18 i SCC-25, zaś PKF118-310 obniżał wydzielanie mleczanu wyłącznie w linii SCC-25. Ograniczone efekty sugerują, że w komórkach raka głowy i szyi związek pomiędzy aktywnością szlaku Wnt i regulacją glikolizy jest mniej wyraźny, niż w nowotworach okrężnicy. Wyniki jak do tej pory przedstawiono w formie doniesień konferencyjnych (pozycje III/B/16 i III/B/20 wg załącznika 4).

Od stycznia 2015 roku pod moim kierownictwem realizowany jest grant NCN w ramach programu Sonata, którego celem jest poszukiwanie skutecznych inhibitorów kanonicznej ścieżki Wnt w komórkach raka głowy i szyi, połączone z weryfikacją ich aktywności biologicznej. Projekt ten jest dopełnieniem i funkcjonalnym rozwinięciem badań związanych z charakterystyką profilu oraz znaczenia klinicznego metylacji antagonistów tej ścieżki w HNSCC. Aktywacja szlaku Wnt jest często obserwowana w nowotworach głowy i szyi, na co wskazuje podwyższony poziom ekspresji ligandów Wnt i receptorów Frizzled oraz obecność podwyższonego poziomu β -kateniny w jądrze komórek HNSCC, a zmiany te obserwuje się już w stadiach przednowotworowych. Hiperaktywację szlaku Wnt obserwowano częściej w bardziej zaawansowanych, inwazyjnych guzach. Nieliczne badania nakierowane były do tej pory na ocenę wpływu zahamowania tej ścieżki na zachowanie komórek raka głowy i szyi. Wiadomo jednak, że zablokowanie aktywności β -kateniny – końcowego efektora ścieżki Wnt, może hamować wzrost komórek raka głowy i szyi. Co istotne, blokada ścieżki Wnt poprzez wpływ na poziom β -kateniny może niestety zaburzać inną funkcję β -kateniny jako elementu układu warunkującego prawidłowe przyleganie międzykomórkowe, co może wtórnie nasilać zdolność komórek do migracji. Ważne jest więc poszukiwanie innych, specyficznych punktów uchwytu dla inhibicji onkogennej funkcji szlaku Wnt. Takie efekty można potencjalnie uzyskać

poprzez oddziaływanie na białka związane z dowolnym piętnem szlaku sygnałowego, począwszy od ligandów Wnt i białek zaangażowanych w ich wydzielanie poza komórkę (Porcupine), przez białka receptorowe Frizzled/LRP, białko pośredniczące Dishevelled i jego regulatory (PAR-1, PIP5KI β , CK1 ϵ), inhibitory kompleksu rozkładającego β -kateninę (np. CIP2A, SET, tankyryza), po białka współtworzące z β -kateniną kompleks aktywujący transkrypcję docelowych genów, takie jak czynniki transkrypcyjne TCF/LEF, białka regulatorowe Bcl9, Pygo, XIAP i TNIK, czy też szereg białek zaangażowanych w regulację informacji epigenetycznej zawartej w histonach, takich jak metylotransferazy (CARM1, hSETD1A, MLL1/2, NSD1), demetylasy (KDM1A, KDM4B/C, KDM6A/B), acetylotransferazy (CBP) czy epigenetyczne białka efektorowe (CHD4, TAF3). Blokada funkcji białek współdziałających w regulacji ekspresji genów z kluczowymi dla przeżycia komórki czynnikami transkrypcyjnymi stanowi nową, niezwykle obiecującą strategię terapii epigenetycznej. Celem projektu jest wskazanie najbardziej optymalnych molekularnych punktów uchwytu dla efektywnej blokady szlaku sygnałowego Wnt, oraz określenie, czy ich modulacja zapewni zahamowanie proliferacji oraz zmniejszenie inwazyjności komórek HNSCC. Przeprowadzony wstępny skrining z użyciem testu reporterowego wykazał, że w komórkach linii HCT116 produkcja białka GFP znajdującego się pod kontrolą TCF/LEF była obniżana pod wpływem siRNA skierowanym przeciwko: *FZD2*, *LRP5*, *DVL1*, *PORCN*, *Wnt3a*, *CIP2A*, *TCF7*, *LEF1* oraz przeciwko epigenetycznym regulatorom: *KDM1A*, *KDM4C*, *KDM6A*, *CBP*, *CARM1*, *KMT2A*, *PYGO1*, *XIAP*. Weryfikacja przeprowadzona w komórkach raka głowy i szyi linii FaDu i CAL27 potwierdziła, że zahamowanie szlaku obserwuje się pod wpływem wyciszenia *KDM1A*, *KDM4C*, *KDM6A*, *CBP*, *PORCN*, *DVL1*, *CARM1*, *KMT2A*. Dalsza weryfikacja działania drobnocząsteczkowych inhibitorów białek kodowanych przez ww. geny wskazała, że inhibitory Porcupiny oraz CBP najefektywniej hamują ścieżkę Wnt także w innych liniach raka głowy i szyi (BICR6, SCC-25, UM-SCC-1). Wytypowane dwa inhibitory hamowały także migrację komórek nowotworowych mierzoną testem zarastania szczeliny. Wykazywały także zdolność do indukowania apoptozy na poziomie porównywalnym, lub wyższym od pozytywnej kontroli – topotekanu. Jednocześnie inhibitor CBP we wszystkich badanych liniach ze zmienną siłą redukował liczbę komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, prowadząc do zatrzymania cyklu w fazie G2/M. Wyniki badań wskazują, że białka CBP oraz Porcupine, które odgrywają istotną rolę w regulacji szlaku Wnt, stanowią nowy obiecujący cel oddziaływania terapii celowanych molekularnie w nowotworach głowy i szyi. Wyniki zaprezentowałem w trakcie Europejskiej Konferencji Epigenetyki Nowotworów w Heidelbergu w maju 2017 roku (pozycja III/B/35 wg załącznika 4).

Celowane molekularnie leki wykazują nierzadko ograniczoną skuteczność w monoterapii. Najnowsze prowadzone przeze mnie badania mają na celu wskazanie, które z połączeń substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym, obejmujących inhibitory EGFR czy szlaku PI3K, a także inhibitory modulatorowych białek epigenetycznych takich jak demetylasy histonów, wykazują najsilniejsze właściwości przeciwnowotworowe względem komórek raka głowy i szyi.

Janusz Paluszak