

Dr Dorota Nowak

**Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski**

Autoreferat

Wrocław, 2014

SPIS TREŚCI

2. Imię i nazwisko_____	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe_____	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu , staże zagraniczne_____	3
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art.16 ust.2	
ustawy z dnia 14 .03.2003 o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki_____	4
4.1. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny_____	6
4.1.1. Istniejący stan wiedzy w zakresie tematu badań_____	6
4.1.2. Zmiany jakościowe i ilościowe aktyny w aspekcie inwazyjności	
komórek nowotworowych_____	8
4.1.3. Udział cytoplazmatycznych izoform aktyny	
w procesie migracji komórek nowotworowych_____	10
4.1.4. Rola wybranych białek regulujących polimeryzację aktyny	
w procesie migracji komórek nowotworowych_____	12
4.1.5. Leki stosowane w terapii antynowotworowej wpływające	
na organizację cytoszkieletu aktynowego_____	15
4.1.6. Podsumowanie_____	17
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych_____	17
5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed	
uzyskaniem stopnia doktora_____	17
5.2. Osiągnięcia w pracy badawczej po	
uzyskaniu stopnia doktora_____	20
6. Plany badawcze na przyszłość_____	23
7. Piśmiennictwo_____	25
8. Podsumowanie dorobku publikacyjnego _____	28

1. IMIĘ I NAZWISKO

Dorota Nowak

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 1986** magister biologii, ze specjalnością biologia molekularna, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, 1986;
- 1998** doktor nauk biologicznych z zakresu biochemii, Pracownia Białek Cytoszkieletu, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, 1998;
tytuł rozprawy doktorskiej: „Zmiany poziomu aktywności i jej izoform w procesie wzrostu guza *hepatoma Morris 5123*”

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

- 1989-1991** samodzielny biolog,
Instytut Biochemii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski;
- 1991-1998** asystent,
Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Wrocławski;
- 1998-** adiunkt,
Zakład Patologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski;

Staż zagraniczne

Austria - Akademie der Wissenschaften, Salzburg:- visiting scientist-1991 (6 tygodni)

Niemcy - Ruhr University, Bochum:- visiting scientist - 2004, 2005, 2006, 2007 (stypendia 6 tygodniowe w ramach współpracy z laboratorium Prof. Mannherza z Dept. of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine)

Francja - Uniwersytet w Reims (program Polonium) - grudzień 2005

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

Dziewięć prac oryginalnych oraz trzy przeglądowe zostały wyszczególnione jako wiodące osiągnięcie naukowe dr Doroty Nowak i wymienione poniżej. Obejmują one wyniki prac badawczych autorki, które w streszczeniu objęto wspólnym tytułem:

„Udział aktyny i białek z nią oddziałujących w procesie migracji komórek nowotworowych, z uwzględnieniem wpływu wybranych leków na ten proces”.

- 1. Nowak D., Krawczenko A., Duś D., Malicka-Błaszkiwicz M.(2002) Actin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. Acta Biochim. Polon. 4, 823-828. 1,6 IF; 15 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 80%, pomysł i koncepcja badań, prowadzenie hodowli komórkowych, izolacja frakcji cytoplazmatycznych, wykonanie oznaczeń aktyny, opracowanie statystyczne wyników, pisanie manuskryptu i jego korekta.

- 2. Popow A., Nowak D., Malicka-Błaszkiwicz M. (2006) Actin cytoskeleton and beta-actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells; J. Physiol. Pharmacol., 57, 111-124. 2,9 IF; 20 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, pomysł i koncepcja badań, udział w dyskusji, pisanie manuskryptu i jego korekta. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy - doktorantką Agnieszką Popow-Woźniak.

- 3. Mazur A., Nowak D., Mannherz H.G., Malicka-Błaszkiwicz M.(2009) Methotrexate induces apoptosis in CaSki and NRK cells and influences organization of their actin cytoskeleton , Eur.J. Pharmacol., 613, 24-33 2,6 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, udział w koncepcji badań oraz dyskusji, częściowe wykonanie analiz mikroskopowych podczas mojego pobytu na Uniwersytecie Ruhr w Bochum (Ryc. 4,6,7), testów żywotności i proliferacji komórek, opracowanie statystyczne wyników, pisanie manuskryptu .

- 4. Litwin M., Mazur A.J, Nowak D., Mannherz H.G., Malicka-Błaszkiwicz M. (2009) Gelsolin In human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. Acta Biochim. Polon, 56(4), 739-743. 1,3 IF; 15 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 20%, udział w dyskusji nad wynikami oraz korekta manuskryptu.

- 5. Nowak D., Mazur A., Popow-Woźniak A., Radwańska A., Mannherz H.G., Malicka-Błaszkiwicz M. (2010) Subcellular distribution and expression of cofilin and ezrin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. Eur J Histochem, 54(2), 59-66 1,9 IF; 15 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 80%, pomysł i koncepcja badań, prowadzenie hodowli komórkowych, wykonanie analiz mikroskopowych, analiz metodą Western Blotting oraz densytometrycznych (Ryc 2-6), opracowanie statystyczne wyników, przygotowanie wszystkich rycin, pisanie manuskryptu i jego korekta.

6. Popow-Woźniak A., Woźniakowska A., Kaczmarek Ł., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.** (2011) Apoptotic effect of imatinib on human colon adenocarcinoma cells: influence on actin cytoskeleton organization and cells migration. *Eur.J. Pharmacol.*, 667, 66-73 **2,5 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, pomysł i koncepcja badań, udział w przygotowaniu rycin, pisanie manuskryptu i jego korekta. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy - doktorantką Agnieszką Popow-Woźniak oraz ówczesną magistrantką Aleksandrą Woźniakowską (Simiczyjew).

7. Litwin M.*, **Nowak D.***, Mazur A.J., Baczyńska D., Mannherz H.G., Malicka-Błaszkiwicz M. (2012) Gelsolin affects the migratory ability of human colon adenocarcinoma and melanoma cells. *Life Sci* 90, 851-61. **2,6 IF; 30 pkt** *autorzy mają równe prawa do publikacji

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, udział w koncepcji badań oraz dyskusji, wykonanie badań ilościowych aktywności w komórkach z wywołaną nadekspresją i wyciszeniem genu dla żelsoliny, opracowanie statystyczne wyników, pisanie manuskryptu oraz udział jego w korekcie zgodnie z uwagami recenzentów.

8. Popow-Woźniak A., Mazur A.J., Mannherz H.G., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.** (2012) Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells - *Histochem Cell Biol* 138, 725-736 **2,6 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, udział w koncepcji badań, planowaniu eksperymentów oraz dyskusji, wykonanie badań ilościowych aktywności w komórkach z wywołaną ekspresją mutantów kofiliny, opracowanie statystyczne wyników, udział w tworzeniu rycin, pisanie manuskryptu oraz jego korekta zgodnie z uwagami recenzentów. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy - doktorantką Agnieszką Popow-Woźniak.

9. Simiczyjew A., Mazur A.J., Popow-Woźniak A., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.** (2014) Effect of cytoplasmic actin isoforms overexpression on actin cytoskeleton organization and migration of human colon cancer cells. *Histochem Cell Biol*; DOI: 10.1007/s00418-014-1199-9 **2,6 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 60%, udział w koncepcji badań (praca stanowi ważny element rozliczenia projektu KBN, którego byłam kierownikiem, była ona całkowicie finansowana z tego projektu), udział w planowaniu eksperymentów oraz dyskusji, wykonanie badań ilościowych aktywności w komórkach z wywołaną nadekspresją genów dla izoformy β i γ aktywności, opracowanie statystyczne wyników, udział w tworzeniu rycin, pisanie manuskryptu oraz jego korekta zgodnie z uwagami recenzentów. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy – doktorantką Aleksandrą Simiczyjew.

Sumaryczny Impact factor 20,6; 215 pkt ministerialnych

Prace przeglądowe (24 punkty ministerialne)

10. **Nowak D.**, Malicka-Błaszkiwicz M. (1999) Izoformy aktywności – zróżnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych. *Postępy Biochemii* 45 (4): 261-269. review 8 pkt

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 80%, zebranie i selekcja piśmiennictwa, skonstruowanie rycin, napisanie manuskryptu i jego korekta.

11. Popow-Woźniak A., **Nowak D.**, Malicka-Błaszkiwicz M.(2009) Sposoby migracji komórek nowotworowych. Postępy Biochemii, 55(2), 113-120. review 8 pkt

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, zebranie i selekcja piśmiennictwa, udział w dyskusji, napisanie manuskryptu i jego korekta. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy - doktorantką Agnieszką Popow-Woźniak.

12. Simiczyjew A., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.** (2013), Zróżnicowanie funkcjonalne cytoplazmatycznych izoform aktyny. Postępy Biochemii, 59, 285-294. review 8 pkt

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, zebranie i selekcja piśmiennictwa, skonstruowanie rycin, napisanie manuskryptu i jego korekta. Sprawowałam opiekę naukową nad pierwszym autorem pracy – doktorantką Aleksandrą Simiczyjew.

***Publikacje będące podstawą postępowania habilitacyjnego są w tekście cytowane pogrubionym drukiem, pozostałe publikacje z udziałem habilitantki są cytowane przy użyciu kursywy.**

4.1. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny

4.1.1. Istniejący stan wiedzy w zakresie tematu badań

Migracja komórkowa jest niezmiernie ważnym aspektem prawidłowego funkcjonowania każdego organizmu. Jest podstawą takich procesów jak gojenie ran, różnicowanie komórek czy rozwój organizmu, a poznanie jej molekularnych podstaw stanowi ważną część badań biologii nowotworów i procesu ich rozprzestrzeniania [Lambrechts ,2004; *Mannherz, 2007*, Gritsenko, 2012]].

Tworzenie przerzutów nowotworowych jest jedną z najtrudniejszych barier w skuteczności leczenia nowotworów. Jest to złożony, wieloetapowy proces, na który składa się szereg połączonych i następujących po sobie etapów [Kassis i inni, 2001]. Przed utworzeniem odległego przerzutu komórka lub grupa komórek musi oderwać się od guza pierwotnego, dokonać „inwazji” sąsiedniej tkanki, dostać się do układu krążenia, a następnie musi być zdolna do skutecznego „zagnieżdżenia” się i proliferacji w nowym miejscu [Wyckhoff, 2000]. Z tego właśnie powodu pojęcie inwazyjności nowotworów nierozdzielnie wiąże się ze zwiększonymi zdolnościami migracyjnymi komórek nowotworowych.

Badania ostatnich lat, dzięki wykorzystaniu nowoczesnych technik, pozwalają na śledzenie migracji komórek nowotworowych w przestrzeni dwu- i trójwymiarowej zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Analiza tych wyników dostarcza cennych informacji dotyczących mechanizmu poruszania się komórek i wykazała, że istnieją dwa główne typy ruchu komórek nowotworowych - ameboidalny i mezenchymalny, pomiędzy którymi istnieją formy pośrednie komórek [Sahai E, 2003; *Mannherz, 2007*; **Popow-Woźniak, 2009**; Friedl, 2010; Sanz-Moreno,2010].

Komórki przemieszczające się ruchem ameboidalnym charakteryzują się zaokrąglonym kształtem komórek, brakiem lamellipodiów oraz występowaniem raczej niewielkich pseudopodiów o charakterze

pęcherzykowatym. Kaskady przekazywania sygnałów w trakcie tego procesu zależne są od kinaz Rho i ROCK, a sama migracja nie zależy od wydzielania enzymów proteolitycznych [Sanz-Moreno, 2008]. Ruch mezenchymalny natomiast, odznacza się wydłużonym, płaskim kształtem komórek, istnieniem wypustek o charakterze lamellipodiów, tworzeniem miejsc adhezji w postaci płytki kontaktowej, retrakcją dystalnej części komórki oraz wydzielaniem proteaz [Friedl, 2009]. Ten rodzaj ruchu komórki jest kontrolowany głównie przez kinazę Cdc42, która koordynuje polimeryzację aktyny we frontalnej części komórki, zapewniając regularne ułożenie mikrofilamentów i ich interakcje z mikrotubulami [Sahai, 2003; Sahai, 2005; Lämmermann, 2009; **Popow-Woźniak, 2009**; Sanz-Moreno, 2010].

Bez względu na rodzaj migracji komórkowej, fundamentalną rolę w tym procesie odgrywają mikrofilamenty aktynowe, których rearanżacja odpowiada m.in. za zmiany kształtu komórek oraz tworzenie wypustek niezbędnych w trakcie ruchu. U podstaw zmian architektury filamentów aktynowych leżą białka oddziałujące z aktyną, jak np. kofilina, żelsolina czy kompleks białek Arp2/3, regulujące proces polimeryzacji aktyny w sposób niezwykle dynamiczny [Sheterline, 1995; Dos Remedios, 2003].

Cytoskielet aktynowy komórek niemięśniowych zbudowany jest z dwóch cytoplazmatycznych izoform aktyny β i γ , różniących się jedynie czterema aminokwasami o podobnym charakterze w obrębie N-końca, a co za tym idzie punktem izoelektrycznym [Vandekerckhove, 1987; **Nowak, 1999**]. Różnicowanie funkcji izoaktyn cytoplazmatycznych, podobnie jak ich subkomórkowe rozmieszczenie pozostają ciągle w sferze badań. Uzyskane początkowo wyniki wskazywały na podbłonową lokalizację aktyny β oraz jej udział w aktywnym ruchu komórki – tworzeniu lamelli i pseudopodiów oraz gojeniu ran, natomiast izoformie γ przypisywano funkcję strukturalną - udział w tworzeniu włókien naprężeniowych oraz rolę w procesie różnicowania [Khatilina, 2001, 2007; Savage, 2002; Rommeleare, 2004, Ruan, 2007]. W latach późniejszych zostały opublikowane jednak przeciwstawne dane [Dos Remedios, 2003; Dugina, 2009].

Wiele dowodów wskazuje na to, że izoformy β i γ aktyny zajmują odrębne regiony cytoplazmy [Rubenstein, 1990; Bulinski, 2006], co przemawia za pełnieniem przez nie różnych funkcji [Rubenstein, 1990; Watanabe, 1998; Bulinski, 2006]. Badania ostatnich lat pokazały, że potranslacyjna arginylna N-końca jedynie izoaktyny β ma istotne znaczenie nie tylko dla subkomórkowej lokalizacji tego białka, lecz również dla tworzenia wypustek w migrującej komórce [Karakozova, 2006].

Sporadycznie pojawiają się informacje wskazujące na to, że u podstaw rearanżacji filamentów aktynowych w komórkach nowotworowych leżą zmiany w ekspresji poszczególnych izoform aktyny [Leavitt, 1980; Le, 1998; Sahai, 2005]. Stwierdzono, że wzrost ekspresji genów aktyn cytoplazmatycznych towarzyszy indukowanemu chemicznie nowotworom skóry, wątroby, węzłów chłonnych oraz nerek, jak również ludzkim nowotworom piersi i skóry [podsumowanie efektów tych działań zebrano w pracy przeglądowej **Nowak, 1999**]. Trwa poszukiwanie związku tych zmian z inwazyjnością komórek

nowotworowych. Uzyskiwane dane są często niejednoznaczne. Istnieją doniesienia, że limfocyty T syntetyzują aktynę β w znacznym nadmiarze w stosunku do aktyny γ , podczas gdy ich białaczkowe odpowiedniki zawierają obydwie formy w równych proporcjach [Rubenstein, 1990]. Dla kontrastu, komórki białaczki mieloblastycznej M1 zawierają przede wszystkim izoformę β i dopiero po indukcji procesów różnicowania tych komórek stwierdza się wzrost zawartości całkowitej aktyny i wzmożoną syntezę aktyny γ [Nagata, 1984].

4.1.2. Zmiany jakościowe i ilościowe aktyny w aspekcie inwazyjności komórek nowotworowych

Mając na względzie moje wcześniejsze doświadczenia (opisane w punkcie 5.1.) dotyczące badań nad aktyną, zainteresowałam się udziałem tego białka w procesie migracji komórek nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem inwazji tych komórek w odległe rejony, co ma miejsce w czasie przerzutowania nowotworów. Moim celem, poprzedzającym wykonanie doświadczeń, był wybór modeli eksperymentalnych. Badania potoczyły się dwoma drogami.

Pierwszym modelem zastosowanym w badaniach były komórki ludzkiego raka jelita grubego. Podjęłam wówczas współpracę z zespołem Prof. Danuty Duś z Instytutu immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, dzięki której udostępniono mi cztery warianty linii ludzkiego raka jelita grubego selekcjonowane pod względem ich zdolności migracyjnych i inwazyjnych. Punktem wyjścia do selekcji komórek przeprowadzonej przez Opolskiego [Opolski, 1998] i Kiedę [Kieda, 2002] była linia LS180. Z niej, w warunkach *in vitro* z zastosowaniem kamer Boydena i filtrów pokrytych Marigelem (substancją imitująca macierz zewnątrzkomórkową, ang. extracellular matrix – ECM) wyizolowano sublinię EB3, odznaczającą się większymi zdolnościami migracyjnymi. Następnie komórki EB3 były selekcjonowane *in vivo* w organizmach myszy bezgrasiczych poprzez podawanie komórek dwoma drogami, co poskutkowało uzyskaniem dwu kolejnych wariantów komórkowych – sublinii 3LNLN, przerzutującej do węzłów chłonnych oraz 5W, dającej dalsze przerzuty do wątroby myszy. Tak uzyskane cztery warianty komórkowe były przeze mnie używane przez szereg lat, a wyniki badań opublikowane zostały w pracach 1 oraz 4-8 z listy, będącej podstawą postępowania habilitacyjnego. W pierwszym podejściu interesowało mnie ustalenie, czy istnieje związek pomiędzy zdolnościami inwazyjnymi komórek nowotworowych a organizacją cytoszkieletu aktynowego i poziomem aktyny. W badaniach ilościowych poziom aktyny oraz stopień jej spolimeryzowania oceniałam poprzez oznaczanie tego białka jako inhibitora DNazy I we frakcjach cytoplazmatycznych izolowanych z badanych komórek. Podstawy teoretyczne takich oznaczeń opisałam w części 5.1..

Ustaliłam, że w wariantach komórkowych, odznaczających się większymi zdolnościami inwazyjnymi w porównaniu do linii rodzicielskiej LS180, obserwuje się istotny statystycznie, obniżony poziom aktyny

monomerycznej oraz podwyższony stan spolimeryzowania aktyny (mierzony stosunkiem aktyny filamentarnej do monomerycznej, F:G) [Nowak, 2002]. Badania te utwierdziły mnie w przekonaniu, że istnieje zależność pomiędzy inwazyjnością komórek nowotworowych a poziomem spolimeryzowania aktyny w komórce. Stąd w dalszym etapie badań (wspólnie z moją magistrantką – Anetą Skwarek-Maruszewską) skupiłam się nad porównaniem wyselekcjonowanych wariantów komórkowych ludzkiego raka jelita grubego pod względem organizacji cytoszkieletu aktynowego [Nowak, 2005]. Do realizacji postawionego celu zastosowałam różne techniki mikroskopowe. Morfologię komórek obserwowałam za pomocą kontrastowo-fazowego mikroskopu świetlnego, zaś organizację struktur aktynowych analizowałam z użyciem skaningowego fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Olympus IX-70 FluoView500. Prowadząc badania mikroskopowe, zwróciłam szczególną uwagę na organizację i poziom cytoplazmatycznej aktyny β , której przypisywano wówczas preferencyjny udział w procesie migracji. Analizy w mikroskopie fluorescencyjnym prowadziłam, stosując fluorescencyjny znacznik filamentów aktynowych falloidyna-TRITC (ang. Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate) oraz monoklonalne przeciwciała połączone z fluorochromem FITC (ang. Fluorescein Isothiocyanate) w przypadku aktyny β . Wymienione przeciwciała posłużyły mi również do badań ilościowych poprzez immunodetekcję wymienionej izoaktyny metodą Western Blotting i analizę densytometryczną blotów z zastosowaniem systemu Gel Doc (BioRad). Prowadzone doświadczenia pokazały, że wyselekcjonowane warianty komórkowe raka jelita grubego cechuje podwyższona ilość aktyny β w porównaniu do linii wyjściowej LS180. Różnią się one ponadto morfologią i organizacją β aktyny. W przypadku wrzecionowatych komórek (wyjściowych LS180 i 3LNLN – dających bliższe przerzuty) izoforma ta jest rozproszona w ciele komórki, koncentruje się w obrębie pseudopodium i krawędzi wiodącej komórki. W przypadku komórek o zaokrąglonym kształcie (EB3 –selekcjonowane *in vitro* i 5W – dające dalsze przerzuty) β aktyna tworzy wyraźny pierścień zlokalizowany podbłonowo [Nowak, 2005].

Celem potwierdzenia uzyskanych obserwacji analogiczne badania przeprowadziłam na drugim modelu doświadczalnym. Wybrałam do nich „własny” model komórek nowotworowych *hepatoma Morris* 5123 opisany w publikacji Otrocka i wsp, 1999 (opisane w części 5.2.). Stosując techniki oparte na migracji komórek przez bariery - filtr typu Transwell (\varnothing 8 μ m) oraz Matrigel imitujący ECM, opracowałam (wspólnie z moją współpracownicą, doktorantką mgr Agnieszką Popow-Woźniak) metodę frakcjonowania komórek *hepatoma Morris* 5123. Poprzez trzykrotną selekcję udało nam się wyodrębnić subpopulację komórek znacząco (5-krotnie) różniących się zdolnością do migracji w stosunku do komórek wyjściowych. Podobnie jak poprzednio, warianty szybciej migrujące odznaczały się zaokrągloną morfologią i istotnie podwyższonym poziomem izoformy β , w stosunku do komórek wyjściowych o kształtach wrzecionowatych [Popow, 2006], co potwierdziło tezę o aktywnym udziale tej izoformy w ruchu komórki.

- Reasumując, omawiane powyżej badania pokazują, że własności inwazyjne komórek nowotworowych są skorelowane z podwyższonym stanem spolimeryzowania aktyny w komórce i poziomem izoformy β .

4.1.3. Udział cytoplazmatycznych izoform aktyny w procesie migracji komórek nowotworowych

Moje zainteresowania zróżnicowaniem funkcjonalnym cytoplazmatycznych aktyn towarzyszyły mi w badaniach w następnych latach. Ze względu na pojawienie się komercyjnych przeciwciał monoklonalnych rozpoznających aktynę γ (dotychczas dostępne były jedynie przeciwciała na izoaktynę β), w literaturze nieco więcej uwagi poświęcono tej właśnie aktynie. Jak dotąd nie wyjaśniona została jednak zależność pomiędzy poziomem ekspresji β i γ aktyny, a potencjałem inwazyjnym komórek nowotworowych, w których te izoformy występują. Odnotowano różne ich poziomy w odmiennych typach nowotworów [zebrane w pracy **Nowak, 1999**]. Ponadto istnieją doniesienia, iż zawartość β aktyny jest wyższa w komórkach o większych zdolnościach inwazyjnych w porównaniu do komórek mniej inwazyjnych [Le, 1998; *Nowak, 2005*; **Popow, 2006**]. Wątpliwości te usiłowano rozwiązać poprzez pojedyncze próby wywołania nadekspresji lub wyciszenia genów obydwu izoaktyn [Schevzov, 1995; Brault, 1999; Peckham, 2001; Dugina, 2009; Shum, 2011]. Eksperymenty te nie przyniosły odpowiedzi na pytanie związane z funkcjonalnym zróżnicowaniem cytoplazmatycznych izoform aktyny. Wiązało się to z faktem, iż przeprowadzone badania dotyczą bardzo podobnych strukturalnie i funkcjonalnie białek, o podstawowym dla komórki znaczeniu. Ponadto opierały się zazwyczaj na obserwacjach efektu zmian ekspresji genu tylko jednej z izoform, co sprawia, że porównanie wyników poszczególnych badań ze sobą staje się niemożliwe. Wyjątek stanowiły eksperymenty prowadzone przez zespoły Duginy i wsp. [Dugina, 2009] i Schevzov i wsp. [Schevzov, 1995]. Opisują one odpowiednio wyciszenie i nadekspresję genów obu izoform na tym samym modelu komórkowym. Jednak operacje te były prowadzone na komórkach prawidłowych, co nadal wyklucza wnioskowanie o funkcjonowaniu β i γ aktyny w procesie migracji komórek nowotworowych, a tym samym w rozprzestrzenianiu nowotworów. W związku z tym zdecydowałam się na wywołanie nadekspresji genów izoform β i γ aktyny w komórkach nowotworu jelita grubego różniących się typem ruchu. Do badań realizowanych z doktorantką mgr Aleksandrą Simiczyjew zastosowałyśmy dwie linie inwazyjnego ludzkiego raka jelita grubego: BE oraz LS174T. Komórki te zostały przetestowane w aspekcie ich zdolności migracyjnych przez Sahai i Marshalla [Sahai, 2003]. Z badań tych wiadomo, że komórki linii LS174T odznaczają się morfologicznie zaokrągloną formą oraz ameboidalnym typem ruchu, zaś komórki linii BE cechuje wydłużony kształt i mezenchymalny typ migracji. Podjęte przeze mnie zagadnienie było realizowane w ramach projektu badawczego finansowanego przez MNiSW (nr NN303337535), którego byłam kierownikiem. W pierwszej kolejności, stosując metody biologii molekularnej, stworzyłyśmy konstrukty, w których fragmenty cDNA dla β lub γ aktyny połączone z cDNA dla zielonego fluorescencyjnego białka (pAcGFP, gen wyizolowany z organizmu *Aequorea coerulea*) wbudowano w plazmid, co pozwala na ekspresję w komórkach eukariotycznych konstruktów β lub γ -aktyna-

AcGFP-C1. Użyliśmy AcGFP zamiast EGFP, ponieważ białko to występuje zawsze w postaci monomerów i w odróżnieniu od EGFP nie tworzy agregatów [Gurskaya, 2003]. Następnie udało nam się uzyskać warianty komórek BE i LS174T z podwyższonym poziomem β lub γ aktyny. Wyniki doświadczeń prowadzonych na komórkach BE zostały zawarte w publikacji Simiczyjew i współpracowników [Simiczyjew, 2014]. Eksperymenty dotyczące komórek LS174T są właśnie finalizowane. Do wytworzenia populacji komórek cechujących się nadekspresją genów obydwu aktyn przeprowadziłyśmy stabilne i przejściowe transfekcje komórek BE. W uzyskanych wariantach komórkowych izoformy aktyny były połączone poprzez N-koniec łańcucha polipeptydowego z fluorescencyjnym zielonym białkiem. Z literatury wiadomo, że zablokowanie C-końca izoaktyn jest powodem zaburzeń w polimeryzacji aktyny [Brault,1999; Rommeleare,2004]. Poziom nadekspresji genów obydwu aktyn był monitorowany na poziomie RNA poprzez zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym oraz na poziomie białka – techniką Western Blotting, stosując odpowiednie przeciwciała. Uzyskane wyniki na każdym etapie porównywałam do uzyskanych dla komórek transfekowanych plazmidem zawierającym jedynie cDNA dla AcGFP. Badania dotyczące funkcjonalnego zróżnicowania obydwu cytoplazmatycznych aktyn oraz ich udziału w migracji komórek nowotworowych były prowadzone na kilku płaszczyznach. Po pierwsze – interesującym było ustalenie, czy podwyższenie poziomu β lub γ aktyny skutkuje zmianą stopnia spolimeryzowania aktyny w wariantach komórek BE oraz czy istnieją różnice w subkomórkowej lokalizacji tych aktyn. Po drugie – należało sprawdzić, czy przeprowadzone zabiegi molekularne mają wpływ na zdolności migracyjne, inwazyjne oraz prędkość migracji komórek raka jelita grubego. Migrację komórek badałam z zastosowaniem filtrów typu Transwell o średnicy 8 μm , zaś w przypadku inwazji komórki wędrowały dodatkowo przez barierę Matrigelu. Prędkość migracji była mierzona w Laboratorium Prof. Wegrowskiego z Uniwersytetu w Reims (Francja) z zastosowaniem mikroskopu odwróconego (Axiovert 200 M; Zeiss) wyposażonego w kasetę do obserwacji przyżyciowych i oprogramowanie (Metamorph) niezbędne do wyliczania prędkości migracji.

Analiza uzyskanych wariantów komórkowych doprowadziła do następujących wniosków:

- podwyższenie ilości mRNA zarówno β jak i γ aktyny skutkuje nieznacznym wzrostem stopnia spolimeryzowania aktyny w cytoplazmie komórek BE, szczególnie w przypadku izoformy γ ;
- egzogenna aktyna (β i γ) skoniugowana z AcGFP kolokalizuje z aktyną endogenną, skupiając się głównie w regionie podbłonowym. W komórkach z wywołaną nadekspresją genów obydwu aktyn obserwuje się wzmożoną zdolność komórek do tworzenia wypustek i struktur o charakterze pseudopodiów;
- warianty komórek z wywołaną nadekspresją genów izoform β i γ cechują podwyższone zdolności migracyjne i inwazyjne oraz większą prędkość migracji, zwłaszcza w przypadku aktyny γ .

Aktualne podsumowanie poglądów na temat zróżnicowania funkcjonalnego aktyn cytoplazmatycznych zostało zawarte w pracy przeglądowej Simiczyjew i współpracowników [Simiczyjew, 2013].

4.1.4. Rola wybranych białek regulujących polimeryzację aktyny w procesie migracji komórek nowotworowych

U podstaw zmian architektury cytoszkieletu aktynowego oraz kontroli równowagi pomiędzy pulą aktyny monomerycznej i filamentarnej, leżą białka wiążące się z aktyną (ang. Actin Binding Proteins, ABPs). Białka te decydują o dynamice polimeryzacji aktyny poprzez:

- udostępnianie jej monomerów z kompleksów - aktyna/profilina, aktyna/ -tymozyna β ,
- nakrywanie ("zapeczkowanie") filamentów - **żelsolina**,
- nukleację filamentów i tworzenie ich rozgałęzień - kompleks Arp2/3,
- tworzenie nowych miejsc polimeryzacji i regulację „obrotu” monomerami aktyny - rodzina białek **ADF/kofilina**,
- tworzenie wiązek filamentów -fascyna, fimbryna, aktynina,
- stabilizację sieci aktynowych - filamina,
- tworzenie kabli filamentów aktyny - forminy [Dos Remedios, 2003; Chhabra, 2008].

Z dużej puli tych białek, odznaczających się różną specyficnością oddziaływania z aktyną, wybrałam kilka najbardziej mnie interesujących, takich jak ezryna, kofilina i żelsolina. Badałam ich udział w organizacji cytoszkieletu aktynowego komórek nowotworowych i związek z ich inwazyjnością.

Pierwszym białkiem była ezryna, należąca wraz z radyksyną i moezyną do rodziny białek ERM, zaangażowanych w organizację cytoszkieletu aktynowego w regionie podbłonowym, określonych mianem „łączników” pomiędzy błoną cytoplazmatyczną a filamentami aktynowymi. Białko to uczestniczy w tworzeniu wypustek komórkowych takich jak filopodia i mikrowilli - niezbędnych w procesach adhezji i migracji. Istnieją dane literaturowe wskazujące ezrynę jako marker inwazyjności niektórych nowotworów [Mannherz, 2007; Dugina, 2009].

Drugim, interesującym mnie, przedstawicielem ABPs jest kofilina, oddziałująca zarówno z monomeryczną, jak i filamentarną aktyną. Białko to jest m.in. odpowiedzialne za dynamikę polimeryzacji filamentów, zwłaszcza w obszarze podbłonowym – najbardziej zaangażowanym w ruch komórki. Aktywność biologiczna kofiliny jest regulowana przez odwracalną fosforylację seryny-3 w łańcuchu polipeptydowym, przy czym ufosforylowana forma nie wykazuje powinowactwa do aktyny [Mizuno, 1994; Okano, 1995].

W doświadczeniach dotyczących białek regulujących polimeryzację aktyny stosowałam zazwyczaj opisany powyżej model czterech wariantów ludzkiego raka jelita grubego porównywanych do prawidłowych komórek fibroblastycznych. Prace te były prowadzone we współpracy z Prof. Hansem G. Mannherzem z Zakładu Anatomii i Embriologii Uniwersytetu Ruhr-Bochum (Niemcy), stąd moje wizyty w Bochum w tym okresie. Początkowo ustaliłam, posługując się ilościową densytometrią blotów oraz mikroskopią konfokalną, że w wyselekcjonowanych komórkach o podwyższonych zdolnościach inwazyjnych (EB3,

3LNLN, 5W) ezryna ulega translokacji w kierunku błony cytoplazmatycznej, co potwierdza rolę tego białka w inwazyjności nowotworów. Ponadto w obszarach podbłonowych komórek nowotworowych raka jelita grubego gromadzi się kofilina. Jej poziom jest znacząco wyższy w porównaniu do komórek prawidłowych, przy czym białko to występuje głównie w nieufosforylowanej, aktywnej postaci, regulując tym samym dynamikę polimeryzacji aktyny w badanych komórkach nowotworowych. [Nowak, 2010].

Wstępne wyniki zawarte w publikacji [Nowak, 2010] skupiły uwagę na roli kofiliny w organizacji cytoszkieletu aktynowego komórek nowotworowych. Moim dalszym celem było poszukiwanie korelacji pomiędzy aktywnością biologiczną kofiliny a zdolnościami migracyjnymi komórek. Dlatego też, posługując się metodami biologii molekularnej, stworzyliśmy (wspólnie z doktorantką mgr Agnieszką Popow-Woźniak) warianty komórkowe ludzkiego raka jelita grubego LS180 z nadekspresją genu kofiliny. Aby ustalić, w jaki sposób regulacja aktywności biologicznej tego białka poprzez fosforylację ma wpływ na komórki, użyliśmy trzech różnych konstruktów uzyskanych przez prof. Mannherza. Początkowo przeprowadziliśmy transfekcje komórek LS180, przy użyciu wektora plazmidowego zawierającego cDNA kofiliny typu dzikiego skoniugowanej z EGFP (pEGFP-C1-hu-wt-cofilin). Zabieg ten wywołał w komórkach produkcję białka fuzyjnego EGFP-kofilina i wzrost komórkowego poziomu kofiliny. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy efekty te zależą nie tylko od poziomu, ale i od aktywności kofiliny przeprowadziliśmy modyfikacje powyżej opisanego doświadczenia. Komórki LS180 poddałyśmy zatem transfekcjom przy użyciu wektora plazmidowego pEGFP-C2-hu-S3A-kofilina lub pEGFP-C2-hu-S3D-kofilina. Wektory te zawierały zmodyfikowane sekwencje kodujące serynę w pozycji 3 łańcucha polipeptydowego kofiliny, kluczową w procesie fosforylacji tego białka. Kodon dla seryny w wektorze plazmidowym pEGFP-C2-hu-S3A-kofilina został zastąpiony kodonem dla alaniny. Ta ukierunkowana mutacja zablokowała możliwość regulacji aktywności kofiliny przez fosforylację tej pozycji, czego skutkiem była synteza przez komórki kofiliny konstytutywnie aktywnej. Natomiast w wektorze plazmidowym pEGFP-C1-hu-S3D-kofilina, kodon dla seryny został zastąpiony kodonem dla kwasu asparaginowego. Ta ukierunkowana mutacja spowodowała syntezę kofiliny konstytutywnie nieaktywnej. W uzyskanych przez nas wariantach komórek LS180 zaobserwowałyśmy zmiany morfologiczne, tendencje do tworzenia wypustek o charakterze lamellipodiów i pseudopodiów oraz zmniejszenie zdolności komórek do wzrostu w skupiskach. W przypadku wariantów syntetyzujących kofilinę typu dzikiego oraz konstytutywnie aktywną komórki odznaczały się dużym rozplaszczaniem i kolokalizacją kofiliny z aktyną filamentarną w regionie podbłonowym. W komórkach LS180 ekspresjonujących cDNA kofiliny konstytutywnie nieaktywnej komórki wykazywały wrzecionowaty kształt, mniejszą powierzchnię, z kofiliną rozproszona w całym cieple komórki. Opisanym powyżej zmianom w subkomórkowej lokalizacji kofiliny towarzyszyły różnice w ilości aktyny we frakcjach

cytoplazmatycznych badanych komórek. Główną naszą obserwacją było nagromadzenie aktywny w formie spolimeryzowanej w cytoplazmie komórek LS180 syntetyzujących kofilinę konstytutywnie nieaktywną. Brak takiego efektu w pozostałych dwóch wariantach był prawdopodobnie związany z peryferyjną lokalizacją kofiliny i jej aktywnością w stosunku do aktywny w tym, najbardziej dynamicznie uczestniczącym w ruchu, regionie komórki. Stąd kolejnym naszym krokiem było porównywanie wpływu nadekspresji genu kofiliny na zdolności migracyjne komórek LS180. Stwierdziłyśmy znaczący (4-krotny) wzrost migracji w przypadku komórek z podwyższonym poziomem kofiliny typu dzikiego i prawie całkowitą inhibicję zdolności migracyjnych komórek w przypadku komórek produkujących kofilinę konstytutywnie nieaktywną [Popow-Woźniak, 2012].

- Podsumowując, nasze badania dotyczące kofiliny pokazały, że białko to jest istotnym czynnikiem regulującym dynamikę cytoskieletu aktynowego niezbędną w procesie migracji komórek nowotworowych. Wskazują one, że „status” ufosforylowania kofiliny jest bardzo znaczącym parametrem w tym procesie determinującym stan spolimeryzowania aktywny w komórce.

Kolejnym białkiem z grupy ABPs, które skupiło moją uwagę, była żelsolina, wykazująca w stosunku do aktywny zarówno aktywność „czapeczkującą”, jak i rozrywającą filamenty aktynowe. Wstępne eksperymenty przeprowadziłyśmy na opisywanym już modelu czterech sublinii ludzkiego raka jelita grubego, analizując związek pomiędzy poziomem i subkomórkową lokalizacją żelsoliny a inwazyjnością komórek nowotworowych. Stosując techniki immunocytochemiczne, ustaliliśmy, że w komórkach sublinii 5W o największym potencjale metastatycznym (dającej najdalsze przerzuty) zauważa się wyraźną, podbłonową koncentrację tego białka [Litwin, 2009]. Wyniki te zainspirowały nas do bardziej zaawansowanych badań, zmierzających do ustalenia roli żelsoliny w procesie migracji poprzez zmianę ekspresji jej genu (wyciszenie i nadekspresję). W pierwszym etapie badań dokonaliśmy wyboru modeli komórkowych. Metodą PCR w czasie rzeczywistym sprawdziliśmy ekspresję genu żelsoliny w szeregu linii komórek nowotworowych. Do doświadczeń mających na celu wyciszenie genu wybrałyśmy linię czerniaka A375 o najwyższym poziomie ekspresji, zaś do wywołania nadekspresji – używaną wcześniej, linię raka jelita grubego LS180 cechującą się najniższym poziomem ekspresji.

Poziom żelsoliny w komórkach A375 obniżyłyśmy za pomocą siRNA, uzyskując poziom wyciszenia w granicach od 67 do 88%. Eksperymenty te pokazały, że wraz z obniżeniem ekspresji genu żelsoliny wzrasta ilość aktywny filamentarnej i ulegają redukcji zdolności migracyjne bardzo inwazyjnych komórek czerniaka A375.

Z kolei stabilna nadekspresją genu żelsoliny w komórkach LS180 spowodowała obniżenie poziomu aktywny filamentarnej i stopnia spolimeryzowania aktywny (mierzonego stosunkiem F:G). Zaobserwowałyśmy wyraźną kolokalizację żelsoliny z filamentami aktywny w części podbłonowej komórki oraz wzrost ilości punktów adhezyjnych bogatych w winkulinę (ang. vinculin spots). Wywołana nadekspresja genu żelsoliny

powodowała ponadto wzrost zdolności migracyjnych komórek, prawdopodobnie poprzez tworzenie podosomów [Litwin, 2012]. Są to struktury, uczestniczące w procesie adhezji i migracji, wykrywane poprzez kolokalizację filamentarnej aktyny, winkuliny i żelsoliny [Albiges-Rizo, 2009].

- Podsumowując, nasze badania pokazały, że aktywność depolimeryzująca żelsoliny regulowana na poziomie ekspresji genu jest ważnym elementem w procesie migracji komórek nowotworowych. Ponadto wzrost poziomu tego białka stymuluje tworzenie pseudopodiów – struktur uczestniczących w inwazji nowotworów.

Badania prezentowane w części 4.4. zwracają uwagę na białka wpływające na polimeryzację aktyny, takie jak kofilina czy żelsolina. Regulacja ekspresji genów tych białek może stanowić, moim zdaniem, potencjalny cel terapii nowotworów.

4.1.5. Leki stosowane w terapii antynowotworowej wpływające na organizację cytoszkieletu aktynowego

Badania wcześniej przeze mnie prowadzone opisane w częściach 4.1-4.4 oraz 5 pokazały, że stan spolimeryzowania aktyny w komórce jest ważnym parametrem związanym z inwazyjnością komórek nowotworowych i ich zdolnością do migracji. Ponadto wyniki doświadczeń prezentowanych w części 5.2. wskazały na czynniki – leki stosowane lub potencjalne, wpływające na polimeryzację aktyny. Stąd podjęty przeze mnie nurt tematyczny, mający na celu charakterystykę działania tych związków. Pierwszym z ich był metotreksat, wytypowany wcześniej przez nas jako lek wpływający na polimeryzację aktyny [Otrocka, 1999]. Metotreksat (MTX) jest cytostatykiem szeroko stosowanym w chemioterapii nowotworów, jak również w alternatywnej terapii chorób nienowotworowych, takich jak: łuszczyce, przewlekły gościec stawowy oraz choroby autoimmunologiczne [Genestier, 2000]. MTX, jest antymetabolitem (analogiem kwasu foliowego), wykazującym aktywność inhibitorową w stosunku do wielu enzymów szlaku metabolicznego kwasu foliowego [Genestier, 2000]. Badania nad wpływem metotreksatu na organizację cytoszkieletu aktynowego były prowadzone na modelu inwazyjnych komórek ludzkiego raka szyjki macicy (CaSki) i porównywane do prawidłowych komórek fibroblastycznych (NRK). Pokazały one, że MTX wywołuje apoptozę w badanych komórkach, przy czym większą wrażliwość na ten czynnik wykazują testowane komórki nowotworowe. Apoptoza była przez nas wykazywana jakościowymi metodami mikroskopowymi (pomiarzy żywotności komórek, badanie integralności DNA jądrowego, analiza asymetrii błon - poprzez śledzenie lokalizacji fosfatydyloseryny, wykrywanie aktywności kaspazy-3) oraz biochemicznymi (pomiarzy cytotoksyczności leku mierzone testem MTT, elektroforetyczna analiza degradacji DNA, ilościowy pomiar aktywności kaspazy-3 metodą chemiluminescencyjną). Nasze badania ustaliły ponadto, że oznakom typowym dla apoptozy towarzyszą zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego. Mogą one wynikać z faktu, że aktyna jest substratem dla kaspaz [Mashima, 1999] i

uczestniczy w tworzeniu wypustek błonowych, przekształcających się w tzw. ciała apoptotyczne [Mazur, 2009].

Badania o podobnym charakterze oraz stosowanej metodyce prowadziłam nieco później i dotyczyły one wpływu imatinibu na organizację struktur aktynowych. Lek używany w eksperymentach otrzymałam dzięki uprzejmości Prof. Łukasza Kaczmarka z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie. Imatinib (Gleevec, CGP57148B lub STI571) to pierwszy czynnik należący do nowej klasy leków przeciwnowotworowych, zaprojektowany celem hamowania aktywności konkretnej kinazy tyrozynowej. Należy on do grupy pochodnych 2-fenylaminopirymidyny i hamuje aktywność tyrozynowej kinazy Abl, a konkretnie jej zmutowanej formy - białka fuzyjnego Bcr-abl oraz receptora dla c-Kit [Suzuki, 1998; Savage, 2002; Ali, 2007].

Niereceptorowa kinaza Abl jest białkiem niezmiernie ważnym z klinicznego punktu widzenia. Postuluje się jej ważną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak tworzenie wypustek komórkowych, wydłużanie neurytów, rozplaszczanie, adhezja, a także ruch komórek. Pokazano, iż rola Abl w tych procesach wynika zwłaszcza z jej zdolności do oddziaływania z białkami wchodzącymi w skład płytki adhezyjnej. Ostatnio udowodniono także, że kinaza Abl jest białkiem oddziałującym z aktywną filamentarną, która zwrótnie hamuje aktywność tej kinazy [Woodring, 2001]. Receptor c-Kit z kolei kontroluje takie procesy jak proliferacja, różnicowanie i ruch komórek. Wzmoczoną syntezę tego receptora obserwuje się w wielu ludzkich nowotworach takich jak rak jelita grubego, drobnokomórkowy rak płuc czy rak piersi. Stąd podjęte badania były prowadzone na linii komórkowej ludzkiego raka jelita grubego LS180, ekspresjonującej gen dla receptora c-Kit. Uzyskane przez nas wyniki pokazały, zależny od dawki i czasu ekspozycji na lek, apoptotyczny efekt imatinibu na badane komórki. Jednocześnie ustaliliśmy, że apoptozie towarzyszą zmiany w organizacji mikrofilamentów, pojawianie się agregatów aktyny w ciele komórki. Ponadto, zachodzą zmiany ilościowe w puli aktyny – w cytoplazmie komórek LS180 obserwuje się spadek poziomu aktyny filamentarnej, co pociąga za sobą obniżenie stanu spolimeryzowania aktyny. Wymienione wyżej zaburzenia powodowane przez lek powodują również dramatyczny spadek zdolności migracyjnych testowanych komórek nowotworowych [Popow-Woźniak, 2011].

- Reasumując, leki antynowotworowe – metotreksat i imatinib, wywołują apoptozę w komórkach nowotworowych. Są one czynnikami zmieniającymi organizację cytoszkieletu i polimeryzację aktyny w tych komórkach, przez co obniżają (w przypadku imatinibu) zdolności migracyjne tych komórek, a tym samym, ich zdolność do rozprzestrzeniania.

4.1.6. Podsumowanie

Prezentowane przez mnie badania dotyczące molekularnych podstaw migracji komórek nowotworowych, pozwoliły na ustalenie, że:

- organizacja i stan spolimeryzowania aktyny w komórce jest cennym parametrem określającym inwazyjność komórek nowotworowych. Stan spolimeryzowania oraz poziom aktyny β jest wyższy w szybciej migrujących komórkach o zaokrąglonym kształcie (ameboidalny typ ruchu), w porównaniu do wolniej migrujących komórek wrzecionowatych (mezenchymalny typ ruchu),
- podwyższenie ekspresji genów aktyn cytoplazmatycznych β i γ zwiększa zdolności migracyjne i inwazyjne komórek nowotworowych, prawdopodobnie przez wykazywaną przez te komórki skłonność do tworzenia wypustek o charakterze pseudopodiów,
- podwyższenie ekspresji genu aktyny γ wywiera wpływ na zwiększenie prędkości migracji komórek nowotworowych,
- podwyższenie ekspresji genów kofiliny i żelsoliny stymuluje zdolności migracyjne komórek nowotworowych. Ważnym czynnikiem regulującym aktywność kofiliny jest status jej ufosforylowania. Podwyższenie poziomu żelsoliny w komórkach nowotworowych powoduje pojawianie się większej ilości podosomów - struktur zaangażowanych w procesy migracji i inwazji,
- metotreksat i imatinib są lekami wywołującymi apoptozę komórek nowotworowych, które zaburzają organizację aktyny w tych komórkach, obniżając ich zdolności migracyjne (imatinib).

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIAGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Malicka-Błaszkiwicz M., Majcher I., **Nowak D.**, (1993) DNase I like enzyme from the carp liver - inhibition by muscle and endogenous actin. *Int. J. Biochem.*, 26, (9), 1147-1155. **4,8 IF; 35 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 30%, wykonanie części eksperymentów z zastosowaniem technik elektroforetycznych, zymogramów aktywności DNazowej, analiz metodą Western blotting, przygotowanie rycin 3 i 6.

2. Malicka-Błaszkiwicz M., Styczeń I., **Nowak D.**, Hańczycowa H., Ponikowski P., Sebzda T. (1995) Actin content and polymerization in tumour, liver and serum of the hepatoma Morris 5123 tumour bearing rats. *Mat. Med. Pol.*, 27, 115-118.

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 50%, udział w przygotowaniu frakcji cytoplazmatycznych z guzów hepatoma Morris 5123 oraz wątrób chorych zwierząt, wykonanie wszystkich eksperymentów, wykonanie analiz statystycznych, przygotowanie rycin, udział w pisaniu manuskryptu.

3. **Nowak D.**, Majcher I., Kochman A., Malicka-Błaszkiwicz M. (1995) The changes in actin content and polymerization during hepatoma Morris 5123 tumor development. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, 14, 37-40. **1,3 IF; 25 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 70%, udział w preparacji guzów i wątrób chorych zwierząt oraz surowicy, izolacja frakcji cytoplazmatycznych, wykonanie wszystkich eksperymentów, wykonanie analiz statystycznych, przygotowanie rycin, udział w pisaniu manuskryptu.

Przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora były:

- **Oddziaływanie DNazy z aktyną**

W początkowych etapach mojej pracy zawodowej pracowałam jako asystent w Zakładzie Biochemii Porównawczej, a od 1992 roku w Pracowni Białek Cytoszkieletu Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Nauk Przyrodniczych UW, współpracując z Prof. dr hab. Marią Malicką-Błaszkiwicz, która była moim przełożonym aż do 2011 roku. Interesowały nas wówczas oddziaływanie DNazy z aktyną i jego rola biologiczna w komórkach eukariotów. Wcześniejsze badania modelowe z zastosowaniem DNazy I z trzustki wołu i aktyny z mięśni szkieletowych królika skupiały uwagę badaczy z uwagi na możliwość udziału DNazy w regulacji polimeryzacji aktyny tak istotnej dla funkcjonowania komórki. Moje zainteresowania dotyczyły ustalenia, czy jedną z tak wielu funkcji aktyny jest regulacja wewnątrzkomórkowej aktywności DNazowej w stosunku do komórkowego DNA, i czy naturalny kompleks DNaza-aktyna (typu enzym-inhibitor) odgrywa istotną rolę w procesie różnicowania i dojrzewania komórki, a szczególnie w jej transformacji w komórkę nowotworową.

DNaza I wyizolowana z trzustki wołu jest jedną z najlepiej poznanych DNaz [Moore, 1981]. Enzym ten rozszczepia DNA endonukleolitycznie tworząc 5'-fosfodwu- i oligonukleotydy. Wcześniej ustalono [Lazarides, 1974], że aktyna jest jedynym znanym białkowym inhibitorem DNazy I. W ówczesnych badaniach wykazałam obecność DNaz podobnych do DNazy I w różnych komórkach eukariotycznych w formie utajonej. Skupiłam swoją uwagę na DNazie obecnej w wątrobie karpia. Enzym ten został przez nas wyizolowany za pomocą technik chromatografii kolumnowej i częściowo scharakteryzowany w zakresie masy cząsteczkowej, wymagań jonowych, optimum działania i sposobu degradacji DNA. Wykazałyśmy ponadto, że DNaza ta występuje w postaci kilku form molekularnych. Ponadto enzym ten, podobnie jak DNaza I, jest hamowany przez aktynę – zarówno endogenną, jak i mięśniową. Występowanie DNazy z wątroby karpia w postaci utajonej było właśnie spowodowane pozostawaniem w kompleksie z endogenną aktyną [Malicka-Błaszkiwicz, 1993]. Ówczesne zainteresowania DNazami różnego pochodzenia były realizowane we współpracy z dr Apolinarem Sobieszkim z Akademii der Wissenschaften w Salzburgu (Austria). Nasze wspólne badania były prowadzone m.in. dzięki obustronnym wizytom. Stąd mój staż w laboratorium dr Apolinarego Sobieszki w 1991 roku, podczas którego zajmowałam się izolacją DNazy mięśniowej (z żołądka indyka).

- **Zmiany aktywny w procesie nowotworzenia**

Kolejnym i zasadniczym etapem mojej pracy eksperymentalnej wynikającym z wcześniejszych badań nad DNazami były zainteresowania aktyną – białkiem wchodzącym w skład cytoszkieletu komórkowego, o którym szerzej pisałam opisując podstawę postępowania habilitacyjnego. Przedmiotem moich eksperymentów było scharakteryzowanie zmian poziomu i stopnia spolimeryzowania aktywny w procesie wzrostu nowotworu eksperymentalnego *hepatoma Morris 5123* hodowanego w organizmach szczurów rasy Buffalo. W badaniach ilościowych poziom aktywny oraz stopień jej spolimeryzowania oceniałam poprzez oznaczanie tego białka jako inhibitora DNazy I. Wykazałam korelacje zmian ilościowych aktywny ze zdolnością nowotworu do tworzenia przerzutów i odpowiedzi na leczenie, polegającą na istotnym statystycznie wzroście poziomu aktywny całkowitej oraz stopnia jej spolimeryzowania w cytoplazmie komórek nowotworowych izolowanych z guza. Obserwowane w wielu niezależnych cyklach doświadczalnych zmiany prowadzone w okresie intensywnego wzrostu nowotworu wykazywały korelację w czasie z tworzeniem pierwszych przerzutów nowotworu do płuc i z wzrostem poziomu aktywny monomerycznej w surowicy chorych zwierząt. Zmiany obserwowane w surowicy mogą mieć znaczenie diagnostyczne w ocenie przebiegu choroby i odpowiedzi organizmu na leczenie [Malicka-Błaszkiwicz, 1995; Nowak, 1995]. Kontynuacją tych badań prowadzonych na zwierzęcym modelu nowotworu eksperymentalnego *hepatoma Morris 5123* były doświadczenia mające na celu identyfikację izoform aktywny za pomocą technik immunochemicznych oraz elektroforezy dwukierunkowej. Pozwoliły one na sformułowanie wniosków, że we frakcji cytoplazmatycznej izolowanej z nowotworu *hepatoma Morris 5123* dominuje izoforma β . Oprócz ilościowych i jakościowych badań aktywny prowadziłam wówczas, dzięki współpracy z prof. Antonim Ogorzałkiem z Instytutu Zoologicznego UW, analizy skrawków guza z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego dotyczące rozmieszczenia filamentów aktywny w komórkach nowotworowych. Zaobserwowałam dezorganizację cytoszkieletu aktywny w trakcie rozwoju nowotworu – pojawianie się struktur nieuporządkowanych w postaci „łatek” i agregatów w obrębie zdeorganizowanej „tkanki” nowotworowej. Opisane wyżej wyniki zostały opublikowane w publikacjach Malickiej-Błaszkiwicz i współpracowników oraz Nowak i współpracowników [Malicka-Błaszkiwicz, 1995; Nowak, 1999] oraz znalazły wyraz w mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Zmiany poziomu aktywny i jej izoform w procesie wzrostu guza *hepatoma Morris 5123*” pod promotorstwem prof. dr hab. Marii Malickiej-Błaszkiwicz, której obrona odbyła się w 1998 roku. Badania te były finansowane wówczas przez KBN (w okresie 1995-98) z grantu, którego byłam głównym wykonawcą - zat. „Rozwój nowotworu eksperymentalnego *hepatoma Morris 5123* w aspekcie zmian molekularnych, poziomu i stopnia spolimeryzowania aktywny” (grant no 6P2O3 04407).

5.2. Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Prace oryginalne:

1. Otrocka M., **Nowak D.**, Sobczak I., Malicka-Błaszkiwicz M. (1999) The effect of methotrexate on actin content and polymerization during hepatoma Morris 5123 growth process. *Diag. Lab.*, 35: 399-407. **3 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 20%, udział w dyskusji wyników do publikacji oraz pisaniu manuskryptu.

2. **Nowak D.**, Kochman A., Malicka-Błaszkiwicz M., (1999) Identification of actin from the hepatoma Morris 5123. *Acta Biochim. Polon.*, 46 (4) 949-959. **1,6 IF; 15 pkt.**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 80%, izolacja frakcji cytoplazmatycznych z guza hepatoma Morris 5123, wykonanie wszystkich eksperymentów - oczyszczanie aktywy metodą chromatografii powinowactwa, identyfikacja aktywy technikami elektroforetycznymi, w tym elektroforezą dwukierunkową oraz metodą Western blotting, przygotowanie rycin, udział w pisaniu manuskryptu.

3. Osińska-Królicka I., Podsiadły H., Bukietyńska K., Zemanek-Zboch M., **Nowak D.**, Suchoszek-Łukaniuk K., Malicka-Błaszkiwicz M. (2004) Vanadium(III) complexes with L-Cysteine – stability, speciation and the effect on actin in hepatoma Morris 5123 cells. *J. Inorg.Biochem.*, 98, 2087-2098. **3.9 IF; 35 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 20%, udział w dyskusji wyników do publikacji oraz pisaniu manuskryptu.

4. **Nowak D.**, Skwarek-Maruszewska A., Zemanek-Zboch M., Malicka-Błaszkiwicz M. (2005) Beta actin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim. Polon.* 52, 461-468. **1,6 IF; 15 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 70%, pomysł i koncepcja badań, współwykonawstwo doświadczeń przy pomocy mojej ówczesnej magistrantki –Anety Skwarek-Maruszewskiej, przygotowanie rycin, pisanie manuskryptu i jego korekta. Praca dotyczy zagadnień poruszanych w opisie osiągnięcia naukowego na stronie 10. Nie została włączona w skład publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego ze względu na brak kontaktu z moją ówczesną magistrantką panią Anetą Skwarek-Maruszewską.

5. Sebzda T., Saleh Y., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.**, Siewiński M., Ziółkowski P., Kopeć W. (2005) Actin content and actin polymerization in hepatoma Morris 5123 tumor bearing tars after treatment with cysteine protease inhibitor and vitamin E. *J. Exp. Therapeutics and Oncol.*, 5, 23-29.

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 70%, udział w przygotowaniu frakcji cytoplazmatycznych z guzów hepatoma Morris 5123 oraz wątrób chorych zwierząt, wykonanie wszystkich eksperymentów, wykonanie analiz statystycznych, przygotowanie rycin, udział w pisaniu manuskryptu.

6. Radwańska A., Baczyńska D., **Nowak D.**, Brezillon S., Popow A., Macquart F.X., Wegrowski Y., Malicka-Błaszkiwicz M. (2008) Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells. *Life Sciences*, 83, 651-660. **2,6 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 20%, udział dyskusji na wynikami, wykonanie badań ilościowych aktyny w komórkach melanomy A375 rosnących na lumikanie oraz innych podłożach, opracowanie statystyczne wyników, pisanie manuskryptu oraz udział jego w korekcie zgodnie z uwagami recenzentów.

7. Radwańska A., Litwin M., **Nowak D.**, Baczyńska D., Wegrowski Y., Maquart F.X., Malicka-Błaszkiwicz M. (2012) Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization, *Exp Cell Res* 318, 2312-2323 **3,6 IF; 30 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 25%, udział w koncepcji badań oraz dyskusji nad wynikami, wykonanie badań ilościowych aktyny w komórkach ludzkiego raka jelita grubego z wywołaną nadekspresją genu dla lumikanu, opracowanie statystyczne wyników, pisanie manuskryptu oraz udział jego w korekcie zgodnie z uwagami recenzentów.

Pozostałe prace:

przeglądowe:

8. Mannherz H.G., Mach M., **Nowak D.**, Malicka-Błaszkiwicz M., Mazur A. (2007) Lamellipodial and ameboid cell locomotion: the role of actin-cycling and bleb formation. *Biophys. Rev. Lett.*, 2, no 1, 1-18.

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 20%, udział w pisaniu manuskryptu.

9. **Nowak D.**, Popow-Woźniak A., Raźnikiewicz L., Malicka-Błaszkiwicz M. (2009) Aktyna w procesie gojenia ran. *Postępy Biochemii*, 55(2), 138-144. Review **8 pkt**

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 60%, zebranie i selekcja piśmiennictwa, skonstruowanie rycin, napisanie manuskryptu i jego korekta. Publikacja jest zwieńczeniem pracy magisterskiej Lindy Raźnikiewicz, której byłam opiekunem.

skrypt:

10. Bartoszewski R., Gubernator J., Kowalska J., Króliczewski J., Lorenc-Kubis I., **Nowak D.**, Olczak M., Olczak T., Polanowski A., Rzepecki R., Sokołowska A., Stachowiak D., Stasiuk M., Szalewicz A., Wilimowska-Pelc H., Wiśniowska J., Wołoszyńska M., Wróblewski Z., (2004) *Laboratorium z Biochemii*

Indywidualny wkład pracy habilitanta: 10%, udział w pisaniu rozdziałów: białka i cukry.

Ważnym momentem w przebiegu mojej dalszej pracy badawczej po doktoracie było przekształcenie w 1999 roku Instytutowej Pracowni Białek Cytoszkieletu w Zakład Patologii Komórki kierowany przez prof. dr hab. Marię Malicką-Błaszkiwicz. Stopniowo zaplecze badawcze nowopowstałego Zakładu wzbogaciło się o nowoczesne laboratorium hodowli komórkowych, a następnie o pracownię mikroskopii fluorescencyjnej wyposażoną w mikroskop fluorescencyjny Olympus IX70, z czasem rozbudowany o system skaningowej mikroskopii konfokalnej Fluoview 500.

W tym okresie nadal interesowała mnie rola zarówno zmian ilościowych, jak w układzie filamentów aktynowych w procesie nowotworzenia. Pokazaliśmy już wcześniej, że polimeryzacja aktyny odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia odległych przerzutów nowotworowych. Dlatego też filamenty aktynowe mogą stanowić cel dla ukierunkowanego działania leków antynowotworowych. Początkowo badania były prowadzone na eksperymentalnym modelu zwierzęcym, jednak w związku z nowym zapleczem aparaturowym wyizolowaliśmy z biopsji guza i przenieśliśmy do hodowli *in vitro* - komórki *hepatoma Morris* 5123. Uzyskaliśmy w ten sposób stały, łatwo dostępny „własny” model komórek nowotworowych. Stworzyło to możliwości rozszerzenia badań o charakterze biomedycznym np. ułatwiło w naszym wypadku badanie wpływu różnych stężeń leków znanych lub potencjalnych na „zachowanie się” komórek, zmiany ilości aktyny i architektury budowanych przez nią mikrofilamentów. Badania przeprowadzone przez nas na komórkach *hepatoma Morris* 5123 w hodowli *in vitro* potwierdziły wyniki uzyskane wcześniej przy wykorzystaniu zwierząt. Posługując się wymienionymi komórkami poszukiwaliśmy czynników mających wpływ na polimeryzację aktyny zarówno w układzie *in vivo* jak i *in vitro*. Ustaliśmy, że taką aktywność biologiczną posiadają inhibitory proteaz cysteinowych w połączeniu z witaminą E [Sebzda, 2005] oraz niektóre leki, takie jak metotreksat – cytostatyk stosowany w terapii antynowotworowej [Otrocka, 1999].

Kontynuując poszukiwania czynników mających wpływ na polimeryzację aktyny – białka niezbędnego do ruchu, zwróciliśmy uwagę na działanie kompleksów wanadu z aminokwasami: V-(III)-L-Ala i V-(III)-L-Cys, rozważanych jako potencjalne leki antynowotworowe. Wymienione pochodne były otrzymywane dzięki współpracy z Zespołem Prof. Krystyny Bukietyńskiej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego i zaowocowały publikacją, w której po raz pierwszy oprócz badań prowadzonych na hodowanych w warunkach *in vitro* komórkach *hepatoma Morris* 5123 zastosowaliśmy kontrolę w postaci I-rzędowych hepatocytów izolowanych z wątroby zdrowych szczurów [Osińska-Królicka, 2004].

Na przestrzeni lat 2005-2012, równoległe z badaniami dotyczącymi udziału aktyny i białek z nią oddziałującymi w procesie migracji i inwazji komórek nowotworowych opisanych w punkcie 4, moje zainteresowania naukowe skupiły się na badaniu udziału lumikanu – małego bogatego w leucynę proteoglikanu macierzy zewnątrzkomórkowej w rozprzestrzenianiu nowotworów. Badania te były prowadzone w ramach projektu KBN oraz trzech projektów Polonium ukierunkowanych na współpracę polsko-francuską. Te ostatnie były realizowane we współpracy z grupą Prof. Yanusza Wegrowskiego z Laboratorium Biochemii Medycznej i Molekularnej Uniwersytetu w Reims.

Badania ostatniego dziesięciolecia jednoznacznie wskazały na rolę składników macierzy pozakomórkowej w regulacji kluczowych procesów komórkowych, takich jak migracja, proliferacja, adhezja, wzrost, różnicowanie, apoptoza i komunikacja międzykomórkowa [Kim, 2011]. Inwazja nowotworu do sąsiednich tkanek i naczyń krwionośnych oraz proces tworzenia przerzutów nowotworowych przebiegają w

środowisku trójwymiarowym, którego składowe pozakomórkowe w istotny sposób wpływają na zachowanie się komórek. Stąd celem naszych działań było ustalenie aktywności biologicznej rekombinowanego lumikanu, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w migracji komórek nowotworowych, hamowaniu wzrostu guza oraz tworzeniu przerzutów nowotworowych. Nasze badania prowadzone na modelu komórkowym ludzkiego czerniaka A375 wykazały, że w obecności rekombinowanego lumikanu będącego podstawą podłoża, na którym rosną komórki, następuje zależna od jego stężenia reorganizacja cytoszkieletu aktynowego. Zmieniają się zdolności adhezyjne i migracyjne komórek nowotworowych oraz rozmieszczenie i poziom białek oddziaływujących z aktyną, takich jak winkulina czy talina [Radwańska, 2008]. Zainspirowani uzyskanymi rezultatami kontynuowaliśmy badania nad rolą lumikanu w procesie migracji. W tym celu stworzyliśmy warianty komórek ludzkiego raka jelita grubego LS180 odznaczające się stabilną nadekspresją genu kodującego lumikan. Komórki te wydzielają do ECM zwiększoną ilość lumikanu, co pociągało za sobą reorganizację cytoszkieletu aktynowego oraz wzrost stopnia spolimeryzowania aktyny. Ponadto komórki LS180 z nadekspresją wymienionego genu odznaczały się podwyższonym poziomem i zmienioną lokalizacją żelsoliny (białka regulującego polimeryzację aktyny) oraz zwiększoną liczbą punktów adhezyjnych tworzących struktury podobne do podosomów. Wymienione zmiany w konsekwencji powodowały, że stworzone przez nas warianty komórkowe syntetyzujące zwiększone ilości lumikanu wykazywały tendencje do rozplaszczania i odznaczały się podwyższonymi zdolnościami migracyjnymi [Radwańska, 2012].

Reasumując, uzyskane rezultaty wskazują, że lumikan może być istotnym elementem ECM przekazującym prawdopodobnie przez integrynę β [Zeltz, 2011] sygnał o przebudowie architektury cytoszkieletu aktynowego niezbędnej w procesie migracji i inwazji komórek nowotworowych.

Wyrazem moich zainteresowań naukowych w latach 2008-2009 były również dwie prace przeglądowe związane z zagadnieniem migracji komórkowej. Pierwsza dotyczyła udziału cytoszkieletu aktynowego w tym procesie ze szczególnym uwzględnieniem migracji ameboidalnej i lamellipodialnej [Mannherz, 2007]. Powstała ona we współpracy z Prof. Hansem Mannherzem z Uniwersytetu w Bochum. Druga publikacja koncentrowała się na ruchu komórek w procesie gojenia ran – prawidłowym i zaburzonym. Praca ta opisuje zdarzenia molekularne zachodzące w czasie zablizniania ran, zwraca uwagę na zmiany w ekspresji genów aktynowych w migrujących komórkach i w czasie przekształcania fibroblastów w miofibroblasty [Nowak, 2009]. Wymienionej pracy przeglądowej towarzyszył szereg prac licencjackich i magisterskich realizowanych pod moją opieką, których wyniki nie były jeszcze publikowane.

6. Plany badawcze na przyszłość

W najbliższej perspektywie czasowej zamierzam skupić się analizie udziału cytoplazmatycznych aktyn w tworzeniu podosomów i inwadopodiów. Są to struktury adhezyjne wykazujące aktywność proteolityczną [Sanz-Moreno, 2010]. Komórki prawidłowe, takie jak makrofagi [Linder, 1999], komórki

dendrytyczne [Burns, 2001] czy osteoklasty [Destaing, 2003] tworzą podosomy, podczas gdy w komórkach nowotworowych, prezentujących mezenchymalny typ ruchu, powstają inwadopodia [Yamaguchi, 2005; Linder, 2007]. Oba typy struktur wspomagają proces migracji, ponieważ odpowiadają nie tylko za kontakt komórki z podłożem, ale biorą też udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), ułatwiając komórkom inwazję przez tkanki [Yamaguchi, 2005]. Komórki prawidłowe takie jak makrofagi wykorzystują podosomy uczestnicząc w eliminacji stanów zapalnych. Z kolei powstałe w komórkach nowotworowych inwadopodia biorą udział w tworzeniu przerzutów. Współczesne badania koncentrują się na ustaleniu składu molekularnego obydwu tych struktur, ich szczegółowej roli i wykryciu występujących pomiędzy nimi różnic. Jak dotąd nie ustalono czy jedna z izoform aktyny – β lub γ są preferowane przy ich tworzeniu.

Kolejnym zagadnieniem, na którym zamierzam skupić się w najbliższej przyszłości są mechanizmy regulacyjne prowadzące do powstania wymienionych struktur adhezyjnych. Uzyskane informacje pozwoliłyby na określenie, które elementy budujące inwadopodia lub szlaki sygnałowe prowadzące do ich powstania - mogą zostać selektywnie zablokowane. Jedną z takich potencjalnych dróg jest szlak przekazywania sygnału z udziałem receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGF (EGFR). Udowodniono, iż pod wpływem działania tego czynnika w komórkach nowotworowych powstają inwadopodia, natomiast nie odnotowano aby stymulował on tworzenie podosomów w komórkach prawidłowych [Mader, 2011]. Dlatego też czynniki blokujące działanie receptora tego czynnika mogłyby wybiórczo eliminować powstawanie inwadopodiów, nie wpływając na tworzenie podosomów.

Chciałabym zatem zbadać wpływ inhibitorów EGFR i inhibitora deacetylazy histonu HDAC (zmniejsza ekspresję EGFR) na migrację komórek nowotworowych i komórek prawidłowych takich jak makrofagi. Przeprowadzone badania umożliwią pełniejsze poznanie molekularnych podstaw migracji komórek nowotworowych i prawidłowych. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości posłużyć do opracowania odpowiedniej terapii, której celem byłoby selektywne hamowanie tworzenia inwadopodiów - struktur służących komórkom nowotworowym do inwazji oraz stymulacja własności chemotaktycznych makrofagów, niezbędnych w procesach zapalnych. Potencjalny cel terapii mogłyby stanowić czynniki EGFR i HDAC oraz ich inhibitory, poprzez wpływ hamujący na skuteczność rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych oraz stymulację komórek układu immunologicznego. Do realizacji opisanego projektu niezbędne jest rozszerzenie metodyki służącej do badania migracji w warunkach 3D. W tym celu nawiązałam kontakt z Zespołem Prof. Ampe z Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Actin Cytoskeleton, Ghent University, który posiada wieloletnie doświadczenie w badaniach migracji komórkowej. Pierwszym etapem naszej współpracy był trzymiesięczny staż w wymienionym laboratorium doktorantki, z którą współpracuję, mgr Aleksandry Simicyjew. Rezultaty tego pobytu zaowocują wspólną publikacją. Kolejnym zadaniem, ułatwiającym realizację opisanych celów badawczych

będą moje starania o doposażenie pracowni mikroskopowej, będącej częścią Zakładu Patologii Komórki, o nowy system super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej. Zakup ten umożliwi m.in. obrazowanie komórek w super rozdzielczości i umożliwi prowadzenie obserwacji przyżyciowych.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block MR. (2009) Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* 122:3037–3049.
2. Ali S, Ali S (2007) Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal tumors (GIST). *Gene*, 401 (1–2), 38–45.
3. Brault V, Sauder U, Reedy MC, Aebi U, Schoenenberger C-A (1999) Differential epitope tagging of actin in transformed *Drosophila* produces distinct effects on myofibril assembly and function of the indirect flight muscle. *Mol Cell Biol* 10, 135-149.
4. Bulinski JC (2006) Actin discrimination. *Science*, 313, 180-181.
5. Burns S, Thrasher A, Blundell M, Machesky L, Jones G (2001) Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98, 1142-1149.
6. Chhabra D, Dos Remedios CG (2008) Actin: An overview of its structure and function. *Protein Reviews Vol.8, Actin-Binding Proteins and Disease*, Springer Science, NY, USA.
7. Destaing O, Saltel F, Geminard J, Jurdic P, Bard F (2003) Podosomes display actin turnover and dynamic self organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* 14, 407-416.
8. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin Binding Proteins: regulation of cytoskeleton microfilaments. *Physiol Rev*, 83, 433-473.
9. Dugina V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clement S, Chaponnier C (2009), β and γ cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity, *J Cell Sci*, 122, 2980–2988.
10. Friedl, P., & Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Reviews*, 28(1-2), 129–35.
11. Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning mode. *J Cell Biol.* 188,11–19.
12. Genestier L, Paillet R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000) Mechanism of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47, 247–257.
13. Gritsenko, P. G., Ilina, O., & Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of Pathology*, 226(2), 185–99.
14. Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Pounkova, N. I., Staroverov, D. B., Bulina, M. E., Yanushevich, Y. G., ... Lukyanov, K. a. (2003). A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. *The Biochemical Journal*, 373(Pt 2), 403–8.
15. Karakozova M, Kozak M, Wong CCI, Bailey AO, Yates JR, Mogilner A, Zebroski H, Kashina A (2006) Arginylation of beta actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Trends Cell Biol*, 16,(12), 610-615.
16. Kassis J, Lauffenburger DA, Turner T, Wells A (2001) Tumour invasion as dysregulated cell motility. *Cancer Biol* 11, 105-117.
17. Khatilina S (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Inter Rev Cyt*, 202, 35-98.
18. Khatilina S (2007) Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Cell and Tissue Biol*, 1, no 4, 293-304.
19. Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A, Załęski P, Dupuis P, Monsigny M, Radzikowski C, Duś D (2002) New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium*, 9, 247-61.
20. Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor, *J Endocrinol* 209, 139–151.
21. Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C (2004) The actin cytoskeleton in normal and pathological motility. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1890-1909.
22. Lazarides E, Lindberg U (1974) Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natn Acad Sci USA*, 71, 4742-4746.
23. Leavitt J, Kakunaga T (1980) Expression of a variant form of actin and additional polypeptide changes following chemical-induced in vitro neoplastic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem*, 25, 1650-1661.

24. Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P, Leclerc N, Nabi LR (1998) Increased beta-actin expression in an invasive Moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res*, 58, 1631-1635.
25. Lämmermann T, Six M (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 636–644.
26. Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9648-9653.
27. Linder S (2007) The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17, 107-117.
28. Litwin M, Mazur AJ, **Nowak D**, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M (2009) Gelsolin In human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim. Polon*, 56(4), 739-743.
29. Litwin M, **Nowak D**, Mazur AJ, Baczyńska D, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M (2012) Gelsolin affects the migratory ability of human colon adenocarcinoma and melanoma cells. *Life Sci* 90, 851-61.
30. Mader, C. C., Oser, M., Magalhaes, M. a O., Bravo-Cordero, J. J., Condeelis, J., Koleske, A. J., & Gil-Henn, H. (2011). An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Research*, 71(5), 1730–41.
31. Malicka-Błaszkiwicz M., Majcher I., **Nowak D.**, (1993) DNase I like enzyme from the carp liver - inhibition by muscle and endogenous actin. *Int. J. Biochem.*, 26, (9), 1147-1155.
32. Malicka-Błaszkiwicz M., Styczeń I., **Nowak D.**, Hańczykowa H., Ponikowski P., Sebzda T. (1995) Actin content and polymerization in tumour, liver and serum of the hepatoma Morris 5123 tumour bearing rats. *Mat. Med. Pol.*, 27, 115-118.
33. Mannherz HG., Mach M, **Nowak D**, Malicka-Błaszkiwicz M, Mazur A (2007) Lamellipodial and ameboid cell locomotion: the role of actin-cycling and bleb formation. *Biophys. Rev. Lett.*, 2, no 1, 1-18.
34. Mashima T, Naito M, Tsuruo T (1999) Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18, 2423–2430.
35. Mazur A, **Nowak D**, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M (2009) Methotrexate induces apoptosis
36. in CaSki and NRK cells and influences organization of their actin cytoskeleton, *Eur.J. Pharmacol.*, 613, 24-33
37. Mizuno K, Okano I, Ohashi K, Nunoue K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T (1994) Identification of human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene*, 9, 1605-1612.
38. Moore S (1981) *The Enzymes* (edited by boyer P.D.), 14, 281-296 Academic Press, New York.
39. Nagata K, Ichikawa Y (1984) Changes in actin during differentiation, *Cell Muscle Motil* 5 171–193.
40. **Nowak D**, Majcher I, Kochman A, Malicka-Błaszkiwicz M (1995) The changes in actin content and polymerization during hepatoma Morris 5123 tumor development. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, 14, 37-40.
41. **Nowak D**, Malicka-Błaszkiwicz M. (1999) Izoformy aktyny – zróżnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych. *Postępy Biochemii* 45 (4): 261-269.
42. **Nowak D**, Kochman A, Malicka-Błaszkiwicz M, (1999) Identification of actin from the hepatoma Morris 5123. *Acta Biochim. Polon.*, 46 (4) 949-959.
43. **Nowak D**, Krawczenko A, Duś D, Malicka-Błaszkiwicz M (2002) Actin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim. Polon.* 4, 823-828.
44. **Nowak D**, Skwarek-Maruszewska A, Zemanek-Zboch M, Malicka-Błaszkiwicz M (2005) Beta actin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochim. Polon.* 52, 461-468.
45. **Nowak D**, Popow-Woźniak A, Raźnikiewicz L, Malicka-Błaszkiwicz M (2009) Aktyna w procesie gojenia ran. *Postępy Biochemii*, 55(2), 138-144.
46. **Nowak D**, Mazur A, Popow-Woźniak A, Radwańska A, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M (2010) Subcellular distribution and expression of cofilin and ezrin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Eur J Histochem*, 54(2), 59-66.
47. Okano I, Hiraoka J, Otera H, Nunoue K, Ohashi K, Iwashita S, Hirai M, Mizuno K (1995) Identification and characterization of novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J Biol Chem* 270,31321-30.
48. Opolski A, Wietrzyk J, Duś D, Kieda C, Matejuk A, Makowska A, Wojdat E, Ugorski M, Laskowska A, Kłopotcki A, Rygaard j, Radzikowski C (1998) Metastatic potential and saccharide antigens expression of human colon cancer cells xenotransplanted into athymic nude mice. *Folia Microbiol*, 43,507-510.
49. Otrócka M, **Nowak D.**, Sobczak I., Malicka-Błaszkiwicz M (1999) The effect of methotrexate on actin content and polymerization during hepatoma Morris 5123 growth process. *Diag Lab*, 35, 399-407.

50. Osińska-Królicka I., Podsiadły H., Bukietyńska K., Zemanek-Zboch M., **Nowak D.**, Suchoszek-Łukaniuk K., Malicka-Błaszkiwicz M. (2004) Vanadium(III) complexes with L-Cysteine – stability, speciation and the effect on actin in hepatoma Morris 5123 cells. *J. Inorg.Biochem* 98, 2087-2098.
51. Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA (2001) Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta actin. *J Cell Sci*, 114, 1367-1377.
52. Popow A, **Nowak D**, Malicka-Błaszkiwicz M (2006) Actin cytoskeleton and beta-actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells; *J Physiol Pharmacol*, 57, 111-124.
53. Popow-Woźniak A, **Nowak D**, Malicka-Błaszkiwicz M(2009) Sposoby migracji komórek nowotworowych. *Postępy Biochemii*, 55(2), 113-120.
54. Popow-Woźniak A, Woźniakowska A., Kaczmarek Ł, Malicka-Błaszkiwicz M, **Nowak D.** (2011) Apoptotic effect of imatinib on human colon adenocarcinoma cells: influence on actin cytoskeleton organization and cells migration. *Eur.J. Pharmacol*, 667, 66-73.
55. Popow-Woźniak, A, Mazur A.J., Mannherz HG., Malicka-Błaszkiwicz M, **Nowak D.** (2012) Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells - *Histochem Cell Biol* 138, 725-736.
56. Radwanska A, Baczynska D, **Nowak D**, Brezillon S, Popow A, Macquart FX, Wegrowski Y, Malicka-Błaszkiwicz M (2008) Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells. *Life Sciences*, 83, 651-660.
57. Radwanska A, Litwin M, **Nowak D**, Baczynska D, Wegrowski Y, Maquart FX, Malicka-Błaszkiwicz M (2012) Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization, *Exp Cell Res* 318, 2312-2323.
58. Rommeleare H, Waterschoot D, Neiryck K, Vandekerckhove J, Ampe C (2004) A method for rapidly screening functionality of actin mutants and tagged actins. *Biol. Proced. Online*. 6, 235-249.
59. Ruan W, Lai M (2007) Actin a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta*, 385 (1-2), 1-6.
60. Rubenstein PA (1990), The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioassays* 12, 309-315.
61. Sahai E, Marshall CJ (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5, 711-719.
62. Sahai E (2005) Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin in Gen&Develop* 15, 87:96.
63. Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Marshall, C. J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135(3), 510–23.
64. Sanz-Moreno V, Marshall C (2010) The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *.Curr Opin Cell Biol*, 22, 690-696.
65. Savage DG, Antman KH, (2002) Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. *N. Engl. J. Med.* 346 (9), 683–693.
66. Schevzov G, Lloyd C, Gunning P (1995) High level expression of transfected β - and γ -actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *J Cell Biol* 117, 775-785.
67. Sebzda T, Saleh Y, Malicka-Błaszkiwicz M, **Nowak D**, Siewiński M, Ziółkowski P, Kopec W (2005) Actin content and actin polymerization in hepatoma Morris 5123 tumor bearing rats after treatment with cysteine protease inhibitor and vitamin E *J Exp Therapeutics and Oncol*, 5, 23-29.
68. Sheterline P, Clayton J, Sparrow JC (1995) Protein Profile. Actin, Academic Press Ltd., London.
69. Shum MS, Pasquier E, Po'uha ST, O'Neill GM, Chaponnier C, Gunning PW, Kavallaris M (2011) γ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway, *FASEB J* 25, 4423-44.
70. Simiczjzew A., Mazur A.J., Popow-Woźniak A., Malicka-Błaszkiwicz M., **Nowak D.**(2014) Effect of cytoplasmic actin isoforms overexpression on actin cytoskeleton organization and migration of human colon cancer cells. *Histochem Cell Biol* DOI: 10.1007/s00418-014-1199-9
71. Simiczjzew A, Malicka-Błaszkiwicz M, **Nowak D** (2013) Zróżnicowanie funkcjonalne cytoplazmatycznych izoform aktyny. *Postępy Biochemii*, 59, 285-294.
72. Suzuki H, Nagata H, Shimada Y, Konno A (1998) Decrease in γ -actin expression, disruption of actin filaments and alterations in cell adhesion in human salivary gland adenocarcinoma cell clones. *Inter J Oncol* 12, 1079-1084.
73. Vandekerckhove J (1987) The vertebrate isoactins : their characterization and possible functional differences. *International Meeting Actin'87* , 89-98.
74. Watanabe, H., Kislauskis, E. H., Mackay, C. a, Mason-Savas, a, & Marks, S. C. (1998). Actin mRNA isoforms are differentially sorted in normal osteoblasts and sorting is altered in osteoblasts from a skeletal mutation in the rat. *Journal of Cell Science*, 111 (Pt 9, 1287–92.

75. Woodring PJ, Hunter T, Wang JY (2001) Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J Biol Chem* 276 (29), 27104-10.
76. Wyckhoff JB, Jones JG, Condeelis J, Segall JE (2000) A critical step in metastasis: in vitro analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60, 2504-2511.
77. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J (2005) Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP.Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol*, 168,441-452.
78. Zeltz C, Brezillon S, Kapyla J, Eble JA, Bobichon H, Terryn C, Perreau C, Franz CM, Heino J, Maquart FX, Wegrowski Y (2011) Lumican inhibits cell migration through $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Exp Cell Res* 316, 2922–2931.

8. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

a. Zestawienie publikacji

	Liczba publikacji	Punkty MNiSW*	Impact Factor**
Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	3	60	6,1
Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora (nie dotyczące postępowania habilitacyjnego)	10	136	13,3
Publikacje dotyczące postępowania habilitacyjnego	9 prac oryginalnych	215	20,6
	3 przeglądowe	24	-
RAZEM	25 (19 oryginalnych, 5 przeglądowych, 1 skrypt)	435	40

*punkty ministerialne liczone wg wskazań z dnia 17.12.2013

**Impact Factor z roku opublikowania pracy

b. LICZBA CYTOWAŃ PUBLIKACJI WEDŁUG BAZY WEB OF SCIENCE (WoS): 138

c. INDEKS HIRSCHA OPUBLIKOWANYCH PUBLIKACJI: 7

dr Dorota Nowak