

Anna Lewińska

AUTOREFERAT

**Molekularne mechanizmy odpowiedzi
komórek nowotworowych na naturalne
substancje pochodzenia roślinnego
o charakterze nutraceutyków
– ocena potencjalnego zastosowania
w terapii przeciwnowotworowej**

Laboratorium Biologii Komórki
Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii
Uniwersytet Rzeszowski
2017

Anna Lewińska

1. Imię i Nazwisko.

Anna Lewińska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów, 2011. Tytuł rozprawy „Udział flawohemoglobiny w obronie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed reaktywnymi formami azotu i tlenu”. Promotor Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz.

Magister biologii w zakresie biologia eksperymentalna, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów, 2004.

Licencjat z biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów, 2002.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

3.1 Zatrudnienia na stanowisku naukowym

2017 - do chwili obecnej - Adiunkt, samodzielne Laboratorium Biologii Komórki, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

2012-2017 - Adiunkt, Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski.

2005-2012 - Asystent, Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski.

3.2 Mianowania na stanowiska funkcyjne

2017 - do chwili obecnej - Kierownik, samodzielne Laboratorium Biologii Komórki, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

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/artystycznego

Molekularne mechanizmy odpowiedzi komórek nowotworowych na naturalne substancje pochodzenia roślinnego o charakterze nutraceutyków – ocena potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy

1. **Lewińska A**, Adamczyk-Grochala J, Deręgowska A, Wnuk M. Sulforaphane-induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells. 2017. *Theranostics*. 7(14):3461-3477. IF₂₀₁₆ = 8.712. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 – autor korespondujący.
 2. **Lewińska A**, Bednarz D, Adamczyk-Grochala J, Wnuk M. Phytochemical-induced nucleolar stress results in the inhibition of breast cancer cell proliferation. 2017. *Redox Biol*. Aug;12:469-482. IF₂₀₁₆ = 6.337. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 - autor korespondujący.
 3. **Lewińska A**, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Deręgowska A, Wnuk M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. 2017. *Apoptosis*. Jun;22(6):800-815. IF₂₀₁₆ = 3.833. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 30 - autor korespondujący.
 4. **Lewińska A**, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Deręgowska A, Wnuk M. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. 2017. *Toxicol Lett*. Jan 4;265:117-130. IF₂₀₁₆ = 3.858. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 35 - autor korespondujący.
 5. **Lewińska A**, Siwak J, Rzeszutek I, Wnuk M. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. 2015. *Toxicol In Vitro*. Apr;29(3):417-25. IF₂₀₁₅ = 3.338. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30 - autor korespondujący.
 6. **Lewińska A**, Chochrek P, Smolağ K, Rawska E, Wnuk M. Oxidant-based anticancer activity of a novel synthetic analogue of capsaicin, capsaicin epoxide. 2015. *Redox Rep*. May;20(3):116-25. IF₂₀₁₅ = 2.606. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 20 - autor korespondujący.
 7. **Lewińska A**, Jarosz P, Czech J, Rzeszutek I, Bielak-Żmijewska A, Grabowska W, Wnuk M. Capsaicin-induced genotoxic stress does not promote apoptosis in A549 human lung and DU145 prostate cancer cells. 2015. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Feb;779:23-34. IF₂₀₁₅ = 2.254. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 25 - autor korespondujący.
- Łączny impact factor osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **30.938**.
 - Łączna liczba punktów MNiSW osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **220**.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Z uwagi na ogólnoustrojową toksyczność chemoterapeutyków i zjawisko oporności wielolekowej, istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych związków mogących potencjalnie wzmacniać ukierunkowane toksyczne działanie chemoterapeutyków względem komórek nowotworowych i jednocześnie chronić otaczające komórki

prawidłowe. Obiecującymi kandydatami do tego celu wydają się być roślinne substancje aktywnie czynne o właściwościach antyoksydacyjnych.

Naturalne substancje pochodzenia roślinnego o charakterze nutraceutyków, tj. polifenole, flawonoidy, alkaloidy czy terpeny, o zdolności do modulowania licznych szlaków sygnalizacyjnych w komórce, mogą być rozpatrywane jako obiecujące czynniki chemoprewencyjne oraz terapeutyczne w leczeniu nowotworów, a także innych chorób (Biochem. Pharmacol., 2006, 71, 1397-1421; Nutr. Rev., 2013, 71, 585-599; Epigenomics, 2016, 8, 1019-1037; J. Nutr. Gerontol Geriatr., 2012, 31, 206-238; Oxid. Med. Cell. Longevity, 2015, 2015, 504253). Fitozwiązki mogą wpływać na proces kancerogenezy na różnych jej etapach – inicjacji, promocji czy progresji – co jest osiąganę np. przez zahamowanie procesów zapalnych, proliferacji, angiogenezy czy zdolności do tworzenia przerzutów (Biochem. Pharmacol., 2006, 71, 1397-1421). Na poziomie molekularnym, nutraceutyki mogą zmieniać aktywność czynników transkrypcyjnych (np. NF- κ B, AP-1, STAT-3), białek anty-apoptotycznych (np. Bcl-2, Bcl-XL), białek pro-apoptotycznych (np. kaspazy, PARP), kinaz białkowych (np. Akt, EGFR, HER2, JNK, ERK, p38) czy białek regulujących przebieg cyklu komórkowego (np. cykliny, kinazy zależne od cyklin) (Biochem. Pharmacol., 2006, 71, 1397-1421; Antioxid. Redox Signal., 2013, 19, 163-180; Mini Rev. Med. Chem., 2016, 16, 596-604; Cancer Lett., 2015, 359, 155-164; Oxid. Med. Cell. Longevity, 2015, 2015, 504253). Fitozwiązki o właściwościach przeciwnowotworowych mogą zatem determinować los komórki nowotworowej na wiele sposobów, tj. promować apoptozę, autofagię, nekrozopodobną programowaną śmierć komórki, mitotyczną katastrofę czy starzenie komórkowe (Apoptosis, 2015, 20, 1531-1562). Niemniej jednak, zastosowania kliniczne fitozwiązków mogą mieć pewne ograniczenia z uwagi na ich stosunkowo niską/umiarkowaną ustrojową biodostępność (Biochem. Pharmacol., 2006, 71, 1397-1421; Mol. Pharm., 2007, 4, 807-818). Fitozwiązki są także często używane w badaniach *in vitro* w stężeniach, które nie są osiągalne w ludzkim organizmie, co sugeruje, iż obserwowane efekty *in vitro* mogą nie mieć przełożenia na biologiczne systemy *in vivo*. Istnieje zatem potrzeba identyfikacji i dalszych pogłębionych badań nad plejotropowymi efektami działania aktywnych substancji pochodzenia roślinnego wobec komórek nowotworowych, które mogłyby być obserwowane także w niskich dawkach nutraceutyków.

Stąd ogólnym celem badawczym siedmiu artykułów stanowiących „osiągnięcie naukowe” była identyfikacja oraz określenie molekularnych mechanizmów działania grupy nutraceutyków względem wybranych linii komórek nowotworowych jako nowotworowych modeli doświadczalnych *in vitro*. Z uwagi na dobrze udokumentowany plejotropizm działania fitozwiązków, rozważono liczne potencjalne efekty fitozwiązków na cytofizjologię komórki nowotworowej, m.in.:

- zaburzenie równowagi redoks komórki (indukowanie stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego),
- promowanie niestabilności genetycznej oraz indukowanie odpowiedzi na uszkodzenia DNA,
- modulowanie szlaku glikolitycznego – hamowanie efektu Warburga (glikolizy tlenowej),
- hamowanie syntezy białka i promowanie stresu jąderkowego,
- promowanie zmian epigenetycznych – zmian w poziomie ekspresji genów i białek zaangażowanych w metylację DNA i represję transkrypcji, zmian w globalnej metylacji DNA oraz zmian w poziomie ekspresji mikroRNA.

Obserwowane zmiany skorelowano z aktywnością cytostatyczną oraz cytotoksyczną nutraceutyków. W tym celu, monitorowano - zależną od dawki – odpowiedź komórki nowotworowej, tj. hamowanie proliferacji oraz indukowanie apoptozy, autofagii bądź starzenia komórkowego przez nutraceutyki.

Siedem prac oryginalnych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego jest wynikiem realizacji kierowanego przeze mnie projektu naukowego pt. „Poszukiwanie nowych mechanizmów hamowania proliferacji komórek nowotworowych przez naturalne substancje pochodzenia roślinnego o charakterze nutraceutyków” oraz finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (SONATA, 2013/11/D/NZ7/00939).

Celem pracy

Lewińska A, Jarosz P, Czech J, Rzeszutek I, Bielak-Żmijewska A, Grabowska W, Wnuk M. Capsaicin-induced genotoxic stress does not promote apoptosis in A549 human lung and DU145 prostate cancer cells. 2015. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Feb;779:23-34. IF₂₀₁₅ = 2.254. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 25 - autor korespondujący

była ocena genotoksycznego działania kapsaicyny, pochodnej kwasu homowanilinowego występującej w papryce chilli, wobec dwóch nowotworowych linii komórkowych raka prostaty DU145 oraz raka płuc A549 oraz ocena czy genotoksyczne działanie kapsaicyny wpisuje się w szeroko udokumentowane działanie przeciwnowotworowe kapsaicyny w postaci indukcji apoptotycznej śmierci komórki (J. Natl. Cancer Inst., 2002, 94, 1263–1265; Toxicol. Pathol., 2012, 40, 847–873). Aktywność pro-apoptyczna kapsaicyny była już szeroko badana wobec licznej grupy komórek nowotworowych (np. Cancer Res., 2004, 64, 1071–1078; J. Neurochem., 2007, 102, 977–990; Oncogene, 2010, 29, 285–296; J. Agric. Food Chem., 2010, 58, 12999–13005; Environ. Toxicol., 2012, 27, 332–341). Niemniej jednak, przeciwnowotworowe efekty kapsaicyny *in vitro* obserwuje się zazwyczaj w przedziale wysokich, nefizjologicznych stężeń, tj. pomiędzy 200 oraz 300 μM (Toxicol. Pathol., 2012, 40, 847–873). Co więcej, rola kapsaicyny jako karcynogenu, ko-karcynogenu czy anty-karcynogenu pozostaje ciągle niejasna (Food Chem. Toxicol., 1996, 34, 313–316).

Użyto stężeń kapsaicyny w przedziale od 5 μM do 250 μM i nie zaobserwowano zmian w aktywności metabolicznej komórek DU145 oraz A549 (test MTT) gdy zastosowano stężenia $\leq 50 \mu\text{M}$. Wartość IC₅₀ dla obu linii oszacowano na około 200 μM . Kapsaicyna (150 μM) promowała również umiarkowaną inhibicję proliferacji komórek, tj. hamowała wbudowywanie BrdU do DNA komórek nowotworowych o 30% oraz 50%, odpowiednio dla komórek DU145 oraz A549. Przeciwnie, kapsaicyna już w stosunkowo niskim stężeniu (10 μM) indukowała stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA oraz generowanie mikrojąder; wraz ze wzrostem stężenia efekty pro-oksydacyjne i genotoksyczne wzrastały się, czemu nie towarzyszyła apoptotyczna śmierć komórki. Apoptozy nie obserwowano nawet przy najwyższym użytym stężeniu kapsaicyny, tj. 250 μM .

Uzyskane wyniki sugerują, iż kapsaicyna nie może być rozpatrywana jako obiecujący czynnik terapeutyczny w leczeniu nowotworów, przynajmniej nowotworów prostaty i płuc. Co więcej, kapsaicyna, generując uszkodzenia DNA przy stosunkowo niskich niecytostatycznych i niecytotoksycznych stężeniach, może przyczyniać się do wzrostu niestabilności genomowej komórek nowotworowych, co z kolei może

promować oporność komórek nowotworowych na stosowane chemoterapeutyki. Niniejsza praca powstała w ramach współpracy z dr hab. Anną Bielak-Żmijewską (Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa).

Z uwagi na ograniczone działanie cytotoksyczne kapsaicyny, nawet gdy kapsaicyna była używana w wysokich stężeniach wobec komórek DU145 oraz A549, postanowiono zsyntetyzować pochodną kapsaicyny, tj. epoksyd kapsaicyny o potencjalnie silniejszych właściwościach utleniających w stosunku do kapsaicyny (Chem. Biol. Interact., 2011, 192, 161–176).

Zatem celem kolejnej pracy

Lewińska A, Chochrek P, Smolağ K, Rawska E, Wnuk M. Oxidant-based anticancer activity of a novel synthetic analogue of capsaicin, capsaicin epoxide. 2015. *Redox Rep.* May;20(3):116-25. IF₂₀₁₅ = 2.606. Punkty MNI_{SW2015} = 20 - **autor korespondujący**

było porównanie przeciwnowotworowego działania epoksydu kapsaicyny oraz kapsaicyny wobec komórek DU145 oraz A549, a także komórek raka piersi MCF-7, raka szyjki macicy HeLa oraz raka nerki ACHN. Epoksyd kapsaicyny promował większy spadek aktywności metabolicznej komórek nowotworowych w stosunku do kapsaicyny, a komórki MCF-7 okazały się najbardziej wrażliwe na stymulację epoksydem kapsaicyny (IC₅₀ dla epoksydu kapsaicyny = 50 μM oraz IC₅₀ dla kapsaicyny = 150 μM). Wykazano również selektywność działania kapsaicyny oraz jej epoksydu, gdyż prawidłowe fibroblasty skóry człowieka (HDFs) okazały się nie być podatne na działanie obu związków w stężeniach do 200 μM. Obniżeniu aktywności metabolicznej nie towarzyszyła jednak wzmożona apoptoza komórek nowotworowych, co może świadczyć o działaniu cytostatycznym, a nie cytotoksycznym użytych związków. Zwiększony efekt cytostatyczny epoksydu kapsaicyny względem kapsaicyny wynikał z generowania większych ilości reaktywnych form tlenu (całkowita pula reaktywnych form tlenu, pula anionorodnika ponadtlenkowego) przez epoksyd kapsaicyny. Preinkubacja z *N*-acetylocysteiną o właściwościach antyoksydacyjnych znosiła cytostatyczne działanie epoksydu kapsaicyny.

Podsumowując, epoksydacja kapsaicyny wzmacnia jej pro-oksydacyjne właściwości, co przekłada się na zwiększony efekt cytostatyczny, niemniej jednak IC₅₀ = 50 μM to stężenie nadal stosunkowo wysokie i niefizjologiczne. Przykładowo, po podaniu doustnym 5 g kapsaicyny w formie kapsułek żelatynowych, kapsaicyna jest wykrywana w osoczu po 10 minutach od podania osiągając maksymalne stężenie (C_{max}) po 47 minutach od podania równe 2.5 ng/ml, co odpowiada stężeniu 8.2 nM (J. Med. Assoc. Thai., 2009, 92,108–113). Co więcej, godzinę od podania miejscowego (8% kapsaicyna, pacjenci z bólem neuropatycznym), średnia C_{max} wynosiła 1.38 ng/ml, a najwyższe stężenie kapsaicyny w osoczu osiągnęło 17.8 ng/ml (58 nM) (Ther. Drug Monit., 2009, 31, 502–510). Biologiczne czasy półtrwania kapsaicyny zostały oszacowane jako stosunkowo krótkie, tj. 25 oraz 98 minut po odpowiednio podaniu doustnym i miejscowym (J. Med. Assoc. Thai., 2009, 92,108–113; Ther. Drug Monit., 2009, 31, 502–510).

Z uwagi na nieliczne informacje na temat aktywności genotoksycznej flawonoidów oraz jej potencjalnych konsekwencji w komórkach nowotworowych (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109, 5423-5428; Toxicol. In Vitro, 2013, 27, 1877-1887), a także na

fakt, iż wcześniej pokazano, iż wybrane glikozydy flawonoidów (np. naringina, diosmina czy hesperydyna) mogą potęgować toksyczność podchlorynu względem komórek raka szyjki macicy HeLa, nawet gdy są stosowane w stosunkowo niskich mikromolowych stężeniach (20 μM) (Food Chem., 2013, 141, 1227-1241),

celem kolejnej pracy

Lewińska A, Siwak J, Rzeszutek I, Wnuk M. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. 2015. *Toxicol In Vitro*. Apr;29(3):417-25. IF₂₀₁₅ = 3.338. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30 - **autor korespondujący**

było zbadanie potencjału genotoksycznego naringiny, diosminy oraz hesperydyny wobec komórek raka prostaty DU145, a także określenie związku pomiędzy genotoksycznością glikozydów flawonoidów a zdolnością do promowania apoptotycznej śmierci komórki, a tym samym eliminacji komórek nowotworowych z uszkodzonym DNA. Diosmina indukowała najwięcej uszkodzeń DNA oraz tworzenie największej ilości mikrojąder w stosunku do naringiny i hesperydyny, co korelowało z indukcją apoptozy po ekspozycji na diosminę. Przeciwnie, naringina i hesperydyna (150 - 250 μM) nie promowały apoptotycznej śmierci komórki. Naringina i hesperydyna indukowały również mniejszy stres oksydacyjny (produkcja całkowita reaktywnych form tlenu) niż diosmina, a także promowały powstawanie większej liczby ognisk 53BP1 (białka wiążącego p53), co może sugerować sprawniejszą odpowiedź na uszkodzenia DNA i mniejszą akumulację uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych naringiną i hesperydyną. Prezentowane dane są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi negatywnej korelacji pomiędzy generowaniem mikrojąder oraz formowaniem ognisk 53BP1 w fibroblastach ludzkich podanych działaniu czynników promujących uszkodzenia DNA (Aging (Albany NY), 2011, 3, 836-845). Trzy użyte glikozydy flawonoidów indukowały również obniżenie globalnej metylacji DNA (hipometylację DNA), co może mieć potencjalne zastosowanie w epigenetycznej terapii przeciwnowotworowej, niemniej jednak wymaga również dalszych pogłębionych badań.

Podsumowując, wykazano korelację pomiędzy genotoksycznością glikozydów flawonoidów a ich zdolnością do indukowania apoptotycznej śmierci komórki w komórkach raka prostaty DU145. Najbardziej obiecujące wydają się być wyniki dotyczące przeciwnowotworowego działania diosminy o stężeniu 150 μM . Należy jednak podkreślić fakt stosunkowo niskiej biodostępności ustrojowej glikozydów flawonoidów (Arch. Toxicol., 2014, 88, 1803-1853), co może ograniczać ich aplikacje w biologicznych systemach *in vivo*.

W dalszym etapie badań (publikacje 1-4 według listy publikacji osiągnięcia naukowego), skupiono się na poszukiwaniu związków działających na komórki nowotworowe *in vitro* wyłącznie w niskich mikromolowych stężeniach (5 – 20 μM). Rozważono 31 fitozwiązków, tj. apigeninę, luteolinę, diosminę, kwercetynę, rutynę, galanginę, myricetynę, fizetynę, taksyfolinę, hesperydynę, katechinę, galusan epigalokatechiny, naringinę, pelargonidynę, floretynę, genisteinę, kapsaicynę, emodynę, kwas elagowy, eugenol, sylibininę, 6-gingerol, kwas ursolowy, kwas betuliny, siarczek diallilu, sulforafan, wanilinę, morynę, bajkaleinę, kurkuminę oraz indolo-3-karbinol. Natomiast jako nowotworowy model doświadczalny *in vitro* wybrano komórki raka piersi o różnym statusie receptorów, tj. MCF-7 (ER⁺, PR⁺, HER2⁻), MDA-MB-231 (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) oraz SK-BR-3 (ER⁻, PR⁻, HER2⁺) (Breast

Cancer Res., 2011, 12;13(4), 215) w celu określenia zależności pomiędzy odpowiedzią komórki na fitozwiązki a fenotypem komórki, a także z uwagi na fakt, iż komórki MCF-7 okazały się już uprzednio najbardziej wrażliwe na stymulację kapsaicyną i epoksydem kapsaicyny w stosunku do innych użytych nowotworowych modeli doświadczalnych *in vitro* (publikacja 6 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Jako komórki kontrolne użyto komórki prawidłowe nabłonka gruczołu sutkowego (HMEC). Wytypowano cztery fitozwiązki działające na komórki raka piersi o różnym fenotypie w niskich mikromolowych stężeniach, tj. diosminę, sulforafan oraz dwa terpenoidy kwas ursolowy i kwas betulinowy i równocześnie nieaktywne wobec komórek prawidłowych HMEC.

Celem pracy

Lewińska A, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Deręgowska A, Wnuk M. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. 2017. *Toxicol Lett.* Jan 4;265:117-130. IF₂₀₁₆ = 3.858. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 35 - **autor korespondujący**

było określenie molekularnego mechanizmu odpowiedzi komórek raka piersi MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3 na niskie mikromolowe stężenia diosminy (5 – 20 μ M). Diosmina w stężeniach 5-10 μ M działała cytostatycznie powodując zatrzymanie komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego, wzrost ekspresji białek p53, p21 oraz p27, a także indukowała starzenie komórkowe. Jest to pierwsze doniesienie na temat promowania starzenia komórkowego w komórkach nowotworowych przez diosminę. Uważa się, iż starzenie komórkowe stanowi mechanizm adaptacyjny i ochronny przed nowotworzeniem (Trends Cell Biol., 2001, 11, 27–31; Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007, 8, 729-740). Starzenie komórkowe może być również indukowane w komórkach nowotworowych jako odpowiedź na stres wywołany chemoterapią czy radioterapią (Cancer Res., 1999, 59, 3761-3767). Indukcja starzenia komórkowego w komórkach nowotworowych może być rozpatrywana jako cel terapii przeciwnowotworowej tylko jeśli prowadzi do eliminacji starych komórek nowotworowych, np. przez komórki układu immunologicznego (Nat. Rev. Cancer., 2011, 11, 503-511; Trends Cell Biol., 2012, 22, 211-219). W przeciwnym razie, akumulacja starych komórek nowotworowych może skutkować opornością na stosowane chemoterapeutyki (Drug Resist. Updat., 2012, 15, 123-131). Co więcej, komórki stare charakteryzują się fenotypem sekrecyjnym związanym ze starzeniem (SASP), a wydzielane czynniki prozapalne, tj. cytokiny, chemokiny czy czynniki wzrostu (zwłaszcza IL-1, IL-6 czy IL-8) mogą promować proliferację i nowotworzenie sąsiadujących komórek nabłonkowych, stymulować angiogenezę oraz przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT), wzmacniać inwazję komórek nowotworowych czy promować wzrost guza *in vivo* (Cancer Metastasis Rev., 2010, 29, 273-283). Diosmina w stężeniu 20 μ M działała na komórki cytotoksycznie indukując apoptotyczną śmierć komórek raka piersi. Najbardziej wrażliwe na ekspozycję na diosminę (promowanie starzenia komórkowego oraz indukcja apoptozy) okazały się komórki MCF-7 charakteryzujące się dziką formą p53 w przeciwieństwie do komórek MDA-MB-231 oraz SK-BR-3 ze zmutowanym p53 (Endocr. Relat. Cancer, 2006, 13, 293-325). Apoptoza w komórkach MCF-7 była również skorelowana ze zwiększoną produkcją tlenu azotu w stosunku do pozostałych komórek raka piersi. Uzyskane wyniki wydają się o tyle cenne, iż uważa się, że komórki MCF-7 pozbawione kaspazy 3 (delecja w egzonie trzecim w genie CASP3) (J. Biol. Chem., 1998, 273, 9357-9360)

są bardziej odporne na działanie leków i indukcję apoptozy. Rekonstrukcja kaspazy 3 w komórkach MCF-7 uwrażliwia je na apoptozę indukowaną przez dokсорubicynę oraz etopozyd (Cancer Res., 2001, 61, 348-354). Niemniej jednak, niezmodyfikowane komórki MCF-7 są nadal wrażliwe na apoptozę indukowaną czynnikiem martwicy nowotworu (TNF), staurosporyną czy białkiem Bax (J. Biol. Chem., 1998, 273, 9357-9360; Clin. Cancer Res., 2001, 7, 1474-1480). W przypadku apoptozy mediowanej białkiem Bax, obserwowano wzrost aktywności wykonawczej kaspazy 6 oraz degradację polimerazy poli-ADP rybozy oraz degradację laminy B (Clin. Cancer Res., 2001, 7, 1474-1480). Zatem wykonawcza kaspaza 3 nie jest niezbędna do przebiegu apoptozy indukowanej białkiem Bax (Clin. Cancer Res., 2001, 7, 1474-1480) czy diosminą (publikacja 4 według listy publikacji osiągnięcia naukowego) w komórkach MCF-7.

Diosmina (5 – 20 μM) indukowała również autofagię w komórkach raka piersi będącą adaptacyjną odpowiedzią komórki na stres oraz promującą przetrwanie komórki bądź śmierć komórki w zależności od intensywności działania bodźca stresowego czy kontekstu komórkowego (Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007, 8, 741–752). Rola autofagii w odpowiedzi komórki nowotworowej na stres wywołany chemoterapią czy radioterapią jest dość złożona (Cancer Res., 2014, 74, 647–651). Generalnie, wyróżnia się cztery funkcjonalne formy autofagii, tj. autofagię promującą przeżycie komórki (autofagia cytoochronna), autofagię indukującą śmierć komórki (autofagia cytotoksyczna), autofagię powodującą zahamowanie wzrostu komórki (autofagia cytotatyczna) oraz autofagię pozostającą bez wpływu na śmierć czy przeżycie komórki (autofagia nieochronna) (Cancer Res., 2014, 74, 647–651). W przypadku ekspozycji na diosminę, obserwowano zarówno autofagię cytotatyczną promującą zahamowanie cyklu komórkowego oraz starzenie komórkowe oraz autofagię cytotoksyczną indukującą apoptozę. Komórki raka piersi o różnym statusie receptorów cechowały się różnym stanem fosforylacji kinazy MAPK ERK zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po stymulacji diosminą, co również może determinować odpowiedź komórki na fitozwiązek. Ścieżka Ras/Raf/MEK/ERK MAPK jest często nadmiernie aktywna w komórkach nowotworowych promując przeżycie komórek nowotworowych, jednocześnie będąc obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej (Cell Death Differ., 2009, 16, 368-377; Oncogene, 2007, 26, 3291-3310). Stopień aktywacji ERK, czas trwania aktywacji ERK czy wewnątrzkomórkowa lokalizacja ERK może modulować liczne procesy biologiczne, tj. proliferację, regulację cyklu komórkowego, przeżycie komórki, migrację, angiogenezę czy śmierć komórki (Int. J. Biochem. Cell Biol., 2008, 40, 2707-2719; Growth Factors, 2006, 24, 21-44). Co więcej, ERK może być zaangażowana we wzajemne oddziaływania pomiędzy apoptozą, autofagią a starzeniem komórkowym promując, w zależności od kontekstu komórkowego, śmierć komórki, apoptozę, autofagię bądź starzenie komórkowe (FEBS J., 2010, 277, 2-21). W przypadku ekspozycji na diosminę (5 – 20 μM), aktywacja ERK korelowała z indukcją autofagii, zarówno autofagii cytotatycznej, jak i autofagii cytotoksycznej w komórkach raka piersi.

Diosmina (5 – 20 μM) indukowała również stres oksydacyjny (wzrost produkcji reaktywnych form tlenu i karbonylacji białek) oraz uszkodzenia DNA (pęknięcia podwójnej nici DNA oraz w mniejszym stopniu pęknięcia pojedynczej nici DNA), co było najwyraźniej widoczne w komórkach MCF-7 i korelowało z największą wrażliwością komórek MCF-7 na ekspozycję na diosminę. Rola reaktywnych form tlenu (ROS) w biologii nowotworów jest dość skomplikowana (Antioxid. Redox Signal., 2012, 16, 1295-1322). W zależności od poziomu ROS, zarówno efekty

promujące, jak i hamujące proces nowotworzenia mogą być obserwowane (Antioxid. Redox Signal., 2012, 16, 1295-1322). Flawonoidy mogą działać zarówno jako antyoksydanty, jak i pro-oksydanty, co zależy np. od użytego stężenia (Cell Biol. Int., 2007, 31, 1245-1250). Przykładowo, niskie stężenia kwercetyny promowały proliferację komórek raka płuc A549, podczas gdy wyższe stężenia kwercetyny ograniczały przeżywalność komórek i indukowały stres oksydacyjny (Cell Biol. Int., 2007, 31, 1245-1250). Flawonoidy mogą również znosić lub potęgować efekty indukowane przez oksydanty (Eur. J. Nutr., 2006, 45, 19-28; J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 7220-7225). Wysoki poziom ROS może również wpływać na potencjał błony mitochondrialnej przyczyniając się do apoptotycznej śmierci komórki (Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1366, 151-165; J. Exp. Med., 1995, 181, 1661-1672). Wysoki poziom mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego promował również depolaryzację błony mitochondrialnej i apoptotyczną śmierć komórki w komórkach raka piersi, co było najbardziej widoczne w komórkach MCF-7 stymulowanych diosminą (publikacja 4 według listy publikacji osiągnięcia naukowego).

Podsumowując, wykazano, iż diosmina w niskich mikromolowych stężeniach może promować zarówno autofagię cytotatyczną oraz autofagię cytotoksyczną w komórkach raka piersi o różnym statusie receptorów, co może prowadzić do zahamowania cyklu komórkowego, starzenia komórkowego oraz apoptozy i eliminacji komórek nowotworowych. Stwierdzono, iż na odpowiedź komórki ma wpływ status p53 oraz poziom aktywacji ERK. Diosmina w stężeniu 20 μ M promująca selektywną apoptozę komórek raka piersi może być rozpatrywana jako obiecujący fitozwiązek do potencjalnego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej, przynajmniej dotyczącej leczenia raka gruczołu sutkowego.

Celem pracy

Lewińska A, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Deręgowska A, Wnuk M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. 2017. **Apoptosis**. Jun;22(6):800-815. IF₂₀₁₆ = 3.833. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 30 - **autor korespondujący**

było określenie molekularnego podłoża działania cytotatycznego oraz cytotoksycznego dwóch terpenoidów, tj. kwasu ursolowego oraz kwasu betulinowego (5 – 20 μ M) wobec komórek raka piersi MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3. Działanie kwasu ursolowego było silniejsze w stosunku do kwasu betulinowego. Wartości IC₅₀ dla kwasu ursolowego i komórek MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3 wyniosły odpowiednio 20.44, 22.9 oraz 14.58 μ M, a dla kwasu betulinowego - odpowiednio - 29.02, 30.58 oraz 24.47 μ M. Terpenoidy (5 – 10 μ M) powodowały zatrzymanie komórek w fazie G₀/G₁ cyklu komórkowego, wzrost poziomu inhibitora cyklu komórkowego p21 oraz zwiększoną aktywność beta-galaktozydazy związanej ze starzeniem, czemu towarzyszył stres oksydacyjny oraz uszkodzenia DNA. Jest to pierwsze doniesienie na temat promowania starzenia komórkowego w komórkach nowotworowych przez kwas ursolowy i betulinowy. Natomiast kwas ursolowy w stężeniu 20 μ M, ale nie kwas betulinowy, promował selektywną apoptozę w komórkach raka piersi. Stres oksydacyjny indukowany przez kwas ursolowy prowadził do zmian w aktywności kinaz zaangażowanych w regulację proliferacji i przeżycia komórek, tj. AKT, AMPK, ERK1/2 oraz ATM. Kwas ursolowy (20 μ M) promował inhibicję aktywności AKT, co skutkowało obniżeniem poziomu kluczowych enzymów glikolitycznych, tj. heksokinazy (HK2) oraz kinazy pirogronianowej (PKM2),

a w konsekwencji spadkiem stężenia ATP oraz mleczanu i indukcją cytotoksycznej autofagii oraz apoptozy w komórkach raka piersi. AKT jest często nadmiernie aktywna w komórkach nowotworowych stymulując glikolizę tlenową (efekt Warburga) poprzez zwiększenie ekspresji i translokację błonową transporterów glukozy, fosforylację heksokinazy i fosfofruktokinazy 2 i ostatecznie promując proliferację komórek (Cancer Res., 2004, 64, 3892–3899; Semin Cancer Biol., 2009, 19, 25–31). Obniżenie aktywności AKT przez kwas ursolowy może wiązać się z zahamowaniem proliferacji i indukcją apoptozy również w komórkach raka okrężnicy czy w komórkach białaczkowych (PLoS ONE, 2013, 8(5), e63872; Sci. Rep., 2016, 6:33358). Ostatnio wykazano, iż pochodne kwasu ursolowego skojarzone z 2-deoksy-d-glukozą (2-DG) efektywnie blokowały metabolizm glukozy komórek nowotworowych, co prowadziło do apoptozy różnych komórek nowotworowych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Sci. Rep., 2014, 4:5006; Biochem. Pharmacol., 2015, 93, 151–162). Obniżenie poziomu ATP wywołane przez kwas ursolowy indukowało również stres energetyczny i aktywację kinazy aktywowanej przez AMP (AMPK), co ostatecznie promowało cytotoksyczną autofagię i apoptozę w komórkach raka piersi (publikacja 3 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Aktywacja AMPK przez kwas ursolowy skutkowała również inhibicją wzrostu i apoptozą w komórkach raka pęcherza moczowego oraz raka wątroby (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2012, 419, 741–747; Phytother. Res., 2013, 27, 1714–1722; Mol. Cell Biochem., 2015, 402, 63–74), a także autofagią w komórkach glejaka (Chem. Biol. Interact., 2014, 218, 28–41). AMPK jest również rozpatrywana jako negatywny regulator glikolizy tlenowej oraz supresor wzrostu nowotworu *in vivo* (Cell Metab., 2013, 17, 113–124). Aktywacja AMPK przez kwas ursolowy może wynikać ze stresu oksydacyjnego oraz stresu nitrozacyjnego towarzyszących ekspozycji na kwas ursolowy w komórkach raka piersi (publikacja 3 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Reaktywne formy tlenu (ROS) oraz reaktywne formy azotu (RNS) mogą aktywować AMPK (J. Biol. Chem., 2010, 285, 33154–33164; J. Biol. Chem., 2008, 283, 20186–20197; Free Radic. Biol. Med., 2016, 101, 334–347). Co więcej, tlenek azotu może również indukować ATM, kinazę zaangażowaną w odpowiedź na uszkodzenia DNA (Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2013, 14, 197–210), co z kolei aktywuje AMPK i promuje cytotoksyczną autofagię w komórkach MCF-7 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2013, 110, E2950–E2957). ATM może być także aktywowana bezpośrednio poprzez reaktywne formy tlenu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2010, 107, 4153–4158). Traktowanie kwasem ursolowym indukowało uszkodzenia DNA w komórkach raka piersi, czemu towarzyszyła fosforylacja ATM, ale nie fosforylacja H2AX czy tworzenie ognisk 53BP1 (publikacja 3 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Zatem, aktywacja ATM przez kwas ursolowy nie stanowi klasycznej ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), a raczej jest częścią odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny i stres nitrozacyjny prowadzące do apoptotycznej śmierci komórki. Co więcej, apoptozie indukowanej przez kwas ursolowy towarzyszyła depolaryzacja błony mitochondrialnej oraz obniżenie fosforylacji kinaz ERK1/2 w komórkach raka piersi (publikacja 3 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Inhibicja ERK mediowana przez kwas ursolowy prowadzi także do apoptozy w komórkach raka okrężnicy (PLoS ONE, 2013, 8(5), e63872). Co więcej, ERK1/2 może promować efekt Warburga poprzez fosforylację kinazy pirogronianowej M2, co prowadzi do translokacji PKM2 do jądra komórkowego oraz do indukcji ekspresji GLUT1 oraz LDHA (Nat. Cell Biol., 2012, 14, 1295–1304).

Podsumowując, kwas ursolowy (20 μ M) indukował stres oksydacyjny w komórkach raka piersi, co prowadziło do obniżenia aktywności AKT i zmian w szlaku

glikolitycznym promując stres energetyczny i aktywację AMPK i ostatecznie przyczyniając się do indukcji cytotoksycznej autofagii i apoptozy. Apoptozie towarzyszyła również aktywacja ATM mediowana przez wzrost poziomu tlenu azotu, inhibicja kinaz ERK1/2 oraz depolaryzacja błony mitochondrialnej. Zatem, zmiany w szlaku glikolitycznym wywołane przez kwas ursolowy i prowadzące do cytotoksycznej autofagii i apoptozy mogą być rozpatrywane jako element obiecującej strategii przeciwnowotworowej w leczeniu raka gruczołu sutkowego.

Celem pracy

Lewińska A, Bednarz D, Adamczyk-Grochala J, Wnuk M. Phytochemical-induced nucleolar stress results in the inhibition of breast cancer cell proliferation. 2017. *Redox Biol.* Aug;12:469-482. IF₂₀₁₆ = 6.337. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 - **autor korespondujący**

była próba odpowiedzi na pytanie czy hamowanie proliferacji komórek przez terpenoidy kwas ursolowy i betulinowy oraz izotiocyjanian sulforafan może być promowane poprzez indukcję stresu jąderkowego w komórkach raka piersi o różnym statusie receptorów (MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3). Traktowanie komórek raka piersi trzema fitozwiązkami (5 – 10 μ M) indukowało oksydacyjne uszkodzenia białek komórkowych, zarówno cytozolowych, jak i jądrowych, tj. ich karbonylację. Karbonylacja białek to biomarker stresu oksydacyjnego (Clin. Chim. Acta, 2003, 329, 23–38), a aktyna jest uważana za białko cytoszkieletu najbardziej podatne na uszkodzenia oksydacyjne (Free Radic. Biol. Med., 2001, 31, 1075–1083; Free Radic. Biol. Med., 2012, 53, 916–925; J. Proteom., 2013, 92, 171–180). Aktyna jest zaangażowana w regulację licznych procesów komórkowych, tj. ruchliwości, przylegania do podłoża, ekspresji genów, wydzielania komórkowego oraz podziału komórkowego (Nat. Rev. Immunol., 2004, 4, 110–122; J. Cell Sci., 2001, 114, 3583–3590; Curr. Opin. Cell Biol., 2003, 15, 572–582; Adv. Enzym. Regul., 2005, 45, 52–62; Curr. Opin. Cell Biol., 2010, 22, 50–56), a karbonylacja aktyny może przyczyniać się do zaburzeń funkcjonowania cytoszkieletu i całej komórki, a także może prowadzić do chorób związanych z wiekiem (J. Proteom., 2013, 92, 171–180). Zaobserwowano karbonylację aktyny, przemieszczanie się kofiliny, białka wiążącego aktynę, do jądra komórkowego oraz karbonylację laminy A/C oraz zmiany w organizacji blaszki jądrowej i architekturze jądra, co skutkowało indukcją stresu jąderkowego (publikacja 2 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Odnotowano obniżenie ilości jąderek w jądrze komórkowym, przemieszczanie się czynnika transkrypcyjnego TIF-IA/RRN3 do nukleoplazmy, inhibicję syntezy rRNA oraz obniżenie poziomu białka jąderkowego związanego z proliferacją NOP2 (p120) (Cancer Res., 1994, 54, 1859–1864) oraz białka WDR12, wymaganego do dojrzewania 28S oraz 5.8S rRNA i formowania podjednostki rybosomalnej 60S (J. Cell Biol., 2005, 170, 367–378; Mol. Cell Biol., 2007, 27, 3682–3694) oraz obniżenie fosforylacji białka rybosomalnego S6, co ostatecznie prowadziło do inhibicji proliferacji komórek raka piersi mediowanej przez wzrost poziomu białka p21. Jest to pierwsze doniesienie na temat indukcji stresu jąderkowego przez fitozwiązki, co prowadzi do zahamowania transkrypcji oraz translacji, a w rezultacie do inhibicji proliferacji komórek nowotworowych, w tym przypadku raka piersi. Przemieszczanie się czynnika transkrypcyjnego TIF-IA/RRN3 do nukleoplazmy czy inhibicja syntezy rRNA uznawane są za klasyczne biomarkery stresu jąderkowego (Sci. STKE., 2004, 2004:pe 10; Genes Dev., 2005, 19, 933–941; Mol. Cell, 2005, 19, 77–87). Ostatnio,

zaproponowano jąderko jako nowy cel terapii przeciwnowotworowej (Biochim. Biophys. Acta, 2014, 1842, 802–816; Biochim. Biophys. Acta, 2015, 1849, 821–829). Tradycyjne leki przeciwnowotworowe, jak i inne związki, tj. dokсорubicyna, aktynomycyna D, cisplatyna, CX-5461 czy 5-fluorouracyl mogą modulować aktywność jąderka poprzez wpływ na transkrypcję genów rDNA z udziałem polimerazy RNA Pol I czy obróbkę pre-rRNA (Biochim. Biophys. Acta, 2015, 1849, 821–829). Przykładowo, CX-5461 promował inhibicję transkrypcji z udziałem polimerazy RNA Pol I w stosunku do transkrypcji z udziałem polimerazy RNA Pol II, replikacji DNA oraz translacji białek, co ograniczało syntezę rRNA i wzrost litych guzów (Cancer Res., 2011, 71, 1418–1430). CX-5461 indukował także starzenie komórkowe oraz autofagię, ale nie apoptozę, w liniach komórkowych wyprowadzonych z litych guzów z udziałem ścieżki niezależnej od p53 (Cancer Res., 2011, 71, 1418–1430). Co więcej, udokumentowano liczne odpowiedzi komórek na stres jąderkowy bez udziału p53 (Nucleus, 2014, 5, 402–426; J. Cell Sci., 2011, 124, 3017–3028; Oncogene, 2010, 29, 5490–5499; Cell Cycle, 2013, 12, 76–87; Leukemia., 2013, 27, 2366–2375). Z uwagi na fakt, iż więcej niż połowa nowotworów charakteryzuje się brakiem funkcjonalnego p53 (Hum. Mutat., 2000, 15, 105–113), ścieżki sygnalizacyjne niezależne od p53 mogą posłużyć do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych opartych na lekach wpływających na transkrypcję rDNA oraz indukujących stres jąderkowy.

Podsumowując, trzy fitozwiązki: kwas ursolowy, kwas betuliny oraz sulforafan indukowały stres jąderkowy, co prowadziło do zahamowania transkrypcji oraz translacji, a ostatecznie do inhibicji proliferacji w komórkach raka piersi. Stres jąderkowy był stymulowany zarówno w komórkach z dzikim p53 (MCF-7), jak i w komórkach ze zmutowanym p53 (MDA-MB-231 oraz SK-BR-3), co nie ogranicza potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

Celem pracy

Lewińska A, Adamczyk-Grochala J, Deręgowska A, Wnuk M. Sulforaphane-induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells. 2017. *Theranostics*. 7(14):3461-3477. IF₂₀₁₆ = 8.712. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 – autor korespondujący

było określenie roli sulforafanu jako epigenetycznego modulatora procesu proliferacji oraz starzenia komórkowego w komórkach raka piersi. Sulforafan powodował zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukował starzenie komórkowe, czemu towarzyszyły zmiany epigenetyczne, tj. globalna hipometylacja DNA, obniżenie poziomu metylotransferaz DNMT1 oraz DNMT3B oraz zmiany w profilu ekspresyjnym mikroRNA. Z uwagi na fakt, iż globalna hipometylacja DNA towarzyszy procesowi starzenia (Rejuvenation Res., 2012, 15, 483-94; Cell, 2013, 153, 1194-217), obniżenie poziomu 5-metylo-2'-deoksycytydyny (5-mdC) może być również związane z procesem starzenia komórkowego i niestabilnością genetyczną w komórkach traktowanych sulforafanem. Jak do tej pory, dobrze jest udokumentowana rola sulforafanu jako inhibitora deacetylaz histonów (HDACi), zarówno w nowotworowych modelach doświadczalnych *in vitro*, jak i *in vivo* (Cancer Res., 2004, 64, 5767-5774; Carcinogenesis, 2006, 27, 811-819; FASEB J., 2006, 20, 506-508; Exp. Biol. Med. (Maywood)., 2007, 232, 227-234). Co więcej, inhibicja deacetylaz histonów mediowana przez sulforafan była też widoczna w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka po 3 i 6 godzinach od

podania 68 g kiełków brokuła (co odpowiada 105 mg sulforafanu) (Exp. Biol. Med. (Maywood)., 2007, 232, 227-234) i co ważniejsze metabolity sulforafanu były wykrywane w tkance gruczoły sutkowego w komórkach nabłonkowych po podaniu doustnym (Carcinogenesis, 2007, 28, 1485-1490).

Po traktowaniu komórek raka piersi sulforafanem o stężeniu 10 μ M, przeanalizowano profil ekspresyjny 352 mikroRNA, który uważa się za zmieniony w komórkach nowotworowych. Jest to pierwsze tego typu opracowanie dotyczące sulforafanu jako potencjalnego modulatora ekspresji grupy kilkuset mikroRNA (publikacja 1 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Sulforafan promował zmiany w ekspresji 92 mikroRNA – sulforafan obniżał poziom 32 mikroRNA, a podwyższał poziom 60 mikroRNA. Biorąc pod uwagę wszystkie trzy użyte linie komórkowe raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3) łącznie, sulforafan powodował znaczące obniżenie poziomu czterech mikroRNA, tj. miR-23b-3p, miR-92b-3p, miR-381-3p oraz miR-382-5p. MikroRNA regulujące ekspresję genów poprzez supresję translacji mRNA mogą promować efekty onkogenne bądź efekty supresorów nowotworów w zależności od kontekstu komórkowego (J. Cell. Sci., 2007, 120, 1833-1840; Cancer Res., 2016, 76, 3666-3670). Onkogenne miR-23b oraz miR-27b są wysoce ekspresjonowane w komórkach raka piersi, co jest osiągane przez podwyższenie poziomu HER2/*neu* (ERBB2), EGF oraz TNF- α poprzez ścieżkę AKT/NF- κ B, co koreluje ze złym rokowaniem (Cancer Res., 2013, 73, 2884-2896). Obniżenie poziomu miR-23b oraz miR-27b metodami inżynierii genetycznej znacząco hamowało wzrost komórek raka piersi (Cancer Res., 2013, 73, 2884-2896). Podwyższenie poziomu miR-92b oraz delecje w genie kodującym białko PTEN modyfikują szlaki sygnalizacyjne regulujące cykl komórkowy, co przyczynia się do progresji raka piersi (Oncogenesis, 2016, 5:e194). MiR-92b jest rozpatrywany jako onkogen i jego poziom jest podwyższony w komórkach raka płuc A549, co skutkuje obniżeniem poziomu PTEN i promuje wzrost nowotworu (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, 440, 604-610). MiR-92b jest także podwyższony w komórkach i próbkach glejaka, a wyciszenie miR-92b ogranicza przeżycie komórek glejaka poprzez aktywację ścieżki TGF- β /Smad3/p21 (Brain Res., 2013, 1529,16-25). Analiza interakcji pomiędzy miR-23b-3p, miR-92b-3p, miR-381-3p oraz miR-382-5p a szlakami regulującymi cykl komórkowy ujawniła, iż miR-23b-3p, miR-92b-3p oraz miR-381-3p mogą modulować szlak TGF- β /Smad (publikacja 1 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Ekspresja genu *TGFB2* w komórkach traktowanych sulforafanem (MCF-7 oraz SK-BR-3) oraz ekspresja genu *TGFB3* w komórkach traktowanych sulforafanem (SK-BR-3) była podwyższona, co promowało wzrost ekspresji genu *CDKN1A* kodującego inhibitor cyklu komórkowego p21 w komórkach SK-BR-3 i ostatecznie hamowało proliferację.

Sulforafan (10 μ M) obniżał także poziom N⁶-metyloadenozyny (m⁶A) w całkowitej puli RNA w trzech użytych liniach komórkowych raka piersi (publikacja 1 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Zmiany w poziomie m⁶A uważane są za regulację epigenetyczną na poziomie RNA, co moduluje szereg procesów biologicznych, m.in. rozwój, odnawianie puli komórek macierzystych czy kancerogenezę (Genes Dev., 2015, 29, 1343-1355; Open Biol., 2016, 6, 160003). Ostatnio, została wykazana istotność m⁶A w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem UV (Nature, 2017, 543, 573-576). Metylacja w pozycji 6. adenozyny w RNA pojawia się bardzo szybko, bo po około dwóch minutach od ekspozycji na czynnik indukujący uszkodzenia DNA i ta modyfikacja post-transkrypcyjna odgrywa rolę sygnału naprowadzającego podczas rekrutacji kappa polimerazy DNA do miejsc uszkodzeń, co usprawnia naprawę DNA (Nature, 2017, 543, 573-576). Zatem obniżenie poziomu m⁶A w komórkach traktowanych sulforafanem może zaburzać odpowiedź na

uszkodzenia DNA, co przejawia się obserwowaną niestabilnością genetyczną i prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i starzenia komórkowego w komórkach raka piersi (publikacja 1 według listy publikacji osiągnięcia naukowego). Cytostatyczne działanie sulforafanu wynikało również z promowania stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego, a także z obniżenia aktywności AKT.

Podsumowując, sulforafan powodował zmiany epigenetyczne w trzech liniach komórkowych raka piersi, tj. globalną hipometylację DNA, obniżenie poziomu DNMT1 oraz DNMT3B, zmiany w profilu ekspresyjnym mikroRNA oraz obniżał poziom m⁶A w RNA, co promowało niestabilność genetyczną i skutkowało inhibicją proliferacji i indukcją starzenia komórkowego. Uzyskane wyniki sugerują, iż sulforafan może być rozpatrywany jako obiecujący modulator epigenetyczny w epigenetycznej terapii przeciwnowotworowej, zwłaszcza dotyczącej leczenia raka piersi.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe

1. Wskazanie na diosminę, kwas ursolowy, kwas betulinowy oraz sulforafan (spośród 31 przeanalizowanych fitozwiązków) jako naturalne substancje pochodzenia roślinnego działające w niskich mikromolowych stężeniach (5 - 20 μ M) na komórki raka piersi o różnym statusie receptorów (MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3) i promujące efekt cytostatyczny (5 -10 μ M, zahamowanie cyklu komórkowego i proliferacji oraz indukcja autofagii cytostatycznej i starzenia komórkowego) oraz efekt cytotoksyczny (20 μ M, indukcja autofagii cytotoksycznej i apoptozy), równocześnie będąc nieaktywnymi wobec prawidłowych komórek nabłonka gruczołu mlekowego (HMEC).
2. Określenie roli stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w odpowiedzi komórek raka piersi na stymulację diosminą, kwasem ursolowym, kwasem betulinowym oraz sulforafanem, a w szczególności pokazanie roli reaktywnych form tlenu i azotu w modulacji aktywności kinaz zaangażowanych w regulację proliferacji, przeżycia komórki, metabolizmu glukozy oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA (tj. AKT, AMPK, ATM, ERK1/2), a także pokazanie konsekwencji oksydacyjnych uszkodzeń białek (karbonylacja białek), zwłaszcza na terenie jądra i jąderka.
3. Wykazanie genotoksyczności diosminy, kwasu ursolowego, kwasu betulinowego oraz sulforafanu w komórkach raka piersi.
4. Poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzi komórek raka piersi na stymulację diosminą, kwasem ursolowym, kwasem betulinowym oraz sulforafanem, w a szczególności:
 - odpowiedzi komórek raka piersi na diosminę modulowanej przez status p53 i aktywność kinaz ERK1/2,
 - promowania zmian w szlaku glikolitycznym komórek raka piersi (tj. obniżenie poziomu HK2 oraz PKM2) przez kwas ursolowy przez obniżenie aktywności AKT, a także promowanie stresu energetycznego (obniżenie poziomu ATP oraz mleczanu, aktywacja AMPK),
 - indukowania stresu jąderkowego przez kwas ursolowy, kwas betulinowy oraz sulforafan w wyniku oksydacyjnych uszkodzeń białek cytozolowych i jądrowych (np. karbonylacja aktyny i laminy A/C) zmieniających organizację blaszki jądrowej i architekturę jądra komórkowego (obniżenie ilości jąderek w jądrze komórkowym, przemieszczanie się czynnika transkrypcyjnego TIF-IA/RRN3 do nukleoplazmy, inhibicja syntezy rRNA oraz obniżenie poziomu

białka jądrowego związanego z proliferacją NOP2 (p120) oraz białka WDR12, wymaganego do dojrzewania 28S oraz 5.8S rRNA i formowania podjednostki rybosomalnej 60S, oraz obniżenie fosforylacji białka rybosomalnego S6),

- promowania zmian epigenetycznych przez sulforafan (tj. globalna hipometylacja DNA, obniżenie poziomu DNMT1 oraz DNMT3B, zmiany w profilu ekspresyjnym mikroRNA oraz obniżenie poziomu m⁶A w RNA), a w szczególności promowania znaczącego obniżenia poziomu onkogennych mikroRNA, tj. miR-23b-3p, miR-92b-3p, miR-381-3p oraz miR-382-5p w trzech liniach komórkowych raka piersi.
5. Wskazanie na istnienie związku pomiędzy genotoksycznością a promowaniem apoptozy przez glikozydy flawonoidów (diosmina, naringina, hesperydyna) w komórkach raka prostaty DU145.
 6. Synteza epoksydu kapsaicyny i udokumentowanie, iż epoksyd kapsaicyny wykazuje się silniejszym działaniem w stosunku do niezmodyfikowanej kapsaicyny wobec szeregu nowotworowych modeli komórkowych *in vitro*, co wynika z generowania większej ilości reaktywnych form tlenu (zwiększonych właściwości utleniających) przez epoksyd kapsaicyny w stosunku do niezmodyfikowanej kapsaicyny.
 7. Wykazanie genotoksyczności kapsaicyny w komórkach raka prostaty DU145 oraz komórkach raka płuc A549.

Potencjalne zastosowania terapeutyczne

Uzyskane wyniki dotyczące molekularnego podłoża przeciwnowotworowego działania diosminy, kwasu ursolowego, kwasu betulinowego oraz sulforafanu w niskich mikromolowych stężeniach (5 – 20 μ M) wobec komórek raka piersi MCF-7, MDA-MB-231 oraz SK-BR-3 *in vitro*, sugerują potencjalne zastosowania w terapii przeciwnowotworowej dotyczącej leczenia raka gruczołu sutkowego, a w szczególności w terapiach opartych na indukowaniu apoptozy, cytotoksycznej autofagii, promowaniu stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego, indukcji uszkodzeń DNA, hamowaniu szlaku glikolitycznego, indukcji stresu jądrowego oraz promowaniu zmian epigenetycznych, zwłaszcza tych opartych na modulowaniu profilu ekspresyjnego mikroRNA.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Zakres moich zainteresowań naukowych jest dość szeroki i obejmuje biologię i biochemię reaktywnych form tlenu i azotu, zastosowania związków o charakterze antyoksydacyjnym w układach biologicznych, starzenie komórkowe i na poziomie całego organizmu, różnorakie aspekty niestabilności genetycznej (zarówno jej przyczyny, jak i konsekwencje), biokompatybilność nanomateriałów, biologię nowotworów oraz regulację epigenetyczną procesów biologicznych. W celu uzyskania odpowiedzi na interesujące mnie zagadnienia badawcze stosuję liczne metody mikrobiologiczne i biochemiczne, biologii molekularnej i genetyki molekularnej czy biologii komórki. Wykorzystuję również różne biologiczne modele doświadczalne, tj. komercyjnie dostępne ludzkie i zwierzęce linie komórkowe (prawidłowe, immortalizowane oraz nowotworowe), komórki krwi i fibroblasty izolowane od zwierząt i ludzi oraz mikroorganizmy – szczepy drożdży laboratoryjnych oraz przemysłowych. Interesujące i oryginalne wyniki powstałe z moim udziałem

zostały opublikowane w postaci 52 prac eksperymentalnych (wyłączając artykuły stanowiące główne osiągnięcie naukowe, n = 7), z czego 17 prac oryginalnych opublikowano przed doktoratem, a 35 prac oryginalnych opublikowano po doktoracie (szczegółowe zestawienie opublikowanych prac oryginalnych, przeglądowych i innych, z uwzględnieniem okresu przed i po doktoracie, jak również odpowiadający sumaryczny współczynnik oddziaływania impact factor umieszczono w dwóch tabelach poniżej).

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia doktora		Po uzyskaniu stopnia doktora*		Łącznie*
	autor	współautor	autor	współautor	
Oryginalne opublikowane prace twórcze (z IF)	0	17	0	35	52
Książki, monografie, podręczniki, inne prace oryginalne i przeglądowe	0	0	0	2	2
Doniesienia konferencyjne	0	12	0	26	38
Razem	0	29	0	63	92

*wyłączając artykuły stanowiące główne osiągnięcie naukowe (n = 7)

Sumaryczny impact factor (punkty MNiSW)	Bez uwzględnienia artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe	Z uwzględnieniem artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe
całkowity	165.46 (1507)	196.398 (1727)
po doktoracie	127.538 (1147)	158.476 (1367)
przed doktoratem	37.922 (360)	37.922 (360)

Moją aktywność naukową odzwierciedlającą moje zainteresowania naukowe oraz potwierdzoną dorobkiem naukowym (osiągnięcia naukowo-badawcze wyłączając artykuły stanowiące główne osiągnięcie naukowe) można pogrupować według następujących tematów/zagadnień badawczych:

5.1 Rola metylotransferazy DNMT2 w regulacji starzenia komórkowego na przykładzie fibroblastów mysich i ludzkich

Metylotransferaza DNMT2 jest uważana zarówno za metylotransferazę modyfikującą DNA, jak i RNA w różnych układach biologicznych (Chromosoma, 2010, 119, 35-40; RNA Biol., 2016, 1-16; J. Biol. Chem., 2003, 278, 31717-31721; Science, 2006, 311, 395-398). Niemniej jednak, pomimo licznych badań z udziałem homologów DNMT2, biologiczna rola DNMT2 pozostaje wciąż niejasna (Chromosoma, 2010, 119, 35-40; RNA Biol., 2016, 1-16). Z uwagi na fakt, iż postuluje się udział dDnmt2 (metylotransferaza muszki owocowej *Drosophila melanogaster*) w regulacji długości życia muszek owocowych (J. Biol. Chem., 2005, 280, 861-864), zasadnym wydaje się również określenie roli ludzkiej DNMT2 oraz mysiej Dnmt2 w regulacji potencjału replikacyjnego oraz starzenia komórkowego w układach ssaczy. Próba odpowiedzi na pytanie o rolę DNMT2 w regulacji starzenia komórkowego na przykładzie fibroblastów mysich i ludzkich stała się możliwa po otrzymaniu przeze mnie finansowania na realizację projektu naukowego zatytułowanego „Rola metylotransferazy DNMT2 w regulacji starzenia komórkowego” (IUVENTUS PLUS,

numer 0258/IP1/2015/73, MNiSW). Projekt realizowano w Pozawydziałowym Instytucie Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego w ramach ścisłej współpracy z dr hab. Maciejem Wnukiem kierownikiem Zakładu Genetyki. Badania dotyczące wpływu wyciszenia DNMT2 na stan metylacji promotora 18S rRNA w fibroblastach ludzkich prowadzone były również we współpracy z dr hab. Tomaszem Ząbkim (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice). Wyniki powstałe w ramach realizacji wspomnianego wyżej projektu stały się podstawą dwóch manuskryptów opublikowanych w *Redox Biology* oraz *Journal of Cellular Physiology*.

W pracy zatytułowanej „Reduced levels of methyltransferase DNMT2 sensitize human fibroblasts to oxidative stress and DNA damage that is accompanied by changes in proliferation-related miRNA expression” wykazano, iż obniżenie poziomu metylotransferazy DNMT2 (technologia siRNA) w fibroblastach ludzkich linii WI-38 oraz BJ powoduje uwrażliwienie komórek na stres oksydacyjny (podwyższona produkcja reaktywnych form tlenu), zwiększa podatność na uszkodzenia DNA, a także zmienia profil ekspresyjny regulatorów cyklu komórkowego, co skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek i indukuje starzenie komórkowe. Wyciszeniu DNMT2 towarzyszyły zmiany w ekspresji mikroRNA o potencjalnym antyproliferacyjnym charakterze, a mianowicie podwyższenie poziomu miR-28-3p, miR-34a-3p, miR-30b-5p, miR-29b-3p, miR-200c-3p, miR-28-5p, miR-379-5p, miR-382-5p, miR-194-5p, miR-193b-3p oraz miR-409-3p. Co więcej, poziom DNMT2 wzrastał w komórkach starych (starzenie replikacyjne). Zaobserwowano również wzrost puli cytozolowej DNMT2 w komórkach starych. Nadtlenek wodoru (oksydant oraz induktor starzenia indukowanego stresem) nie potęgował starzenia w komórkach z obniżonym poziomem DNMT2, natomiast nadtlenek wodoru indukował zwiększoną apoptozę w porównaniu do komórek kontrolnych.

W pracy zatytułowanej „Downregulation of Methyltransferase Dnmt2 Results in Condition-dependent Telomere Shortening and Senescence or Apoptosis in Mouse Fibroblasts” wykazano, iż wyciszenie metylotransferazy Dnmt2 w mysich fibroblastach linii ciągłej NIH3T3 (technologia CRISPR) skutkuje obniżeniem długości telomerów oraz aktywności telomerazy, a także powoduje globalną hipermetylację DNA oraz RNA oraz podwyższenie poziomu metylotransferaz Dnmt1, Dnmt3a oraz Dnmt3b. Wyciszenie Dnmt2 w warunkach kontrolnych indukowało starzenie komórkowe, a po ekspozycji na nadtlenek wodoru uwrażliwiała komórki na apoptozę indukowaną przez nadtlenek wodoru. Podobnie jak w przypadku fibroblastów ludzkich, fibroblasty mysie z obniżonym poziomem Dnmt2 cechowały się zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, podwyższonym poziomem uszkodzeń DNA oraz zmienionym profilem ekspresji regulatorów cyklu komórkowego. Opublikowane wyniki to pierwsze tego typu obszerne doniesienie o regulacyjnej roli DNMT2 w fibroblastach ludzkich oraz Dnmt2 w fibroblastach mysich podczas starzenia komórkowego oraz podczas odpowiedzi na stres komórkowy indukowany przez nadtlenek wodoru. Ponadto, otrzymane wyniki wydają się obiecujące w kontekście możliwości modulowania poziomu DNMT2 także w komórkach nowotworowych i wywoływania potencjalnych efektów antyproliferacyjnych poprzez zmiany w długości telomerów oraz aktywności telomerazy, co może stać się podstawą zupełnie nowej strategii przeciwnowotworowej, co jednak wymaga dalszych pogłębionych badań i dalszego wsparcia finansowego.

Część wyników prezentowanych w powyższych dwóch pracach stanie się podstawą doktoratu Pani mgr Jagody Adamczyk-Grochali, w którym pełni rolę promotora pomocniczego, natomiast dr hab. Tomasz Ząbek (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) pełni rolę promotora.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. **Lewińska A**, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Deręgowska A, Semik E, Ząbek T, Wnuk M. 2018. Reduced levels of methyltransferase DNMT2 sensitize human fibroblasts to oxidative stress and DNA damage that is accompanied by changes in proliferation-related miRNA expression. *Redox Biol.* Apr;14:20-34. IF₂₀₁₆ = 6.337. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 - **autor korespondujący**.
2. **Lewińska A**, Adamczyk-Grochala J, Kwaśniewicz E, Wnuk M. 2017. Downregulation of Methyltransferase Dnmt2 Results in Condition-dependent Telomere Shortening and Senescence or Apoptosis in Mouse Fibroblasts. *J Cell Physiol.* Dec;232(12):3714-3726. IF₂₀₁₆ = 4.08. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 35 - **autor korespondujący**.

5.2 Charakterystyka genomowa wybranych szczepów drożdży z grupy *Saccharomyces sensu stricto*, a zwłaszcza tych o istotnej roli w przemyśle piwowarskim, winiarskim oraz gorzelniczym

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* z uwagi na łatwość genetycznych manipulacji, mały, dobrze poznany genom oraz krótki cykl życiowy stanowią jeden z najbardziej popularnych modeli badawczych, zwłaszcza do badania ogólnie pojętej biologii molekularnej i komórkowej, a także poznawania molekularnych mechanizmów regulujących procesy zachodzące w komórkach eukariotycznych (Mech. Ageing Dev., 2000, 120(1–3), 1–22). Niemniej jednak, drożdże *S. cerevisiae* to nie tylko szeroko stosowane szczepy laboratoryjne, ale także bardzo ważne narzędzie biotechnologiczne, zwłaszcza w przemyśle spożywczym (piekarnictwo, browarnictwo, gorzelnictwo, winiarstwo) (C. R. Biol., 2011, 334(3), 229-36). Zmienność genomowa drożdżowych szczepów przemysłowych mogąca promować niestabilność genetyczną oraz mogąca wpływać na proces fermentacyjny oraz jakość uzyskiwanych produktów biotechnologicznych (Bioessays, 2012, 34, 893–900) powinna być wnikliwie i stale monitorowana oraz kontrolowana. Dlatego też w ramach realizacji projektu naukowego zatytułowanego „Genetyczna charakterystyka wybranych szczepów drożdżowych *Saccharomyces cerevisiae* pod względem ich niestabilności genetycznej ze szczególnym zwróceniem uwagi na zjawisko zaburzeń chromosomowych” (numer WND-RPPK-01.03.00-18-038/13, Regionalny Program Operacyjny Województwa Podkarpackiego na lata 2007-2013), w którym pełniłam rolę koordynatora naukowego, a dr hab. Maciej Wnuk (Zakład Genetyki, Uniwersytet Rzeszowski) pełnił funkcję koordynatora merytorycznego, podjęto próbę kompleksowej charakterystyki genomowej wybranych stu szczepów drożdży przemysłowych stosowanych komercyjnie w piekarnictwie, piwowarstwie, winiarstwie oraz gorzelnictwie oraz próbę oceny wpływu wybranych cech genetycznych/genomowych na użyteczne aspekty fenotypowe, szczególnie te o znaczeniu adaptacyjnym podczas procesów fermentacyjnych przebiegających w warunkach stresowych. Projekt realizowano we współpracy z dr hab. Markiem Skonecznym (Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa), dr hab. Adrianną Skoneczną (Pracownia Mutagenyzy i Reperacji DNA, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) oraz dr Arturem Gurgulem (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice). W ramach realizacji projektu powstało

sześć manuskryptów opublikowanych w Oncotarget (dwie prace), Cell Cycle, Archives of Microbiology, Cell Stress and Chaperones oraz Current Genetics.

W pracy zatytułowanej „Genome-wide array-CGH analysis reveals *YRF1* gene copy number variation that modulates genetic stability in distillery yeasts” dokonano kompleksowej analizy genomowej 22 szczepów drożdży gorzelniczych (PFGE oraz aCGH). Rozpatrywane szczepy zostały przypisane do grupy *Saccharomyces sensu stricto* oraz stanowiły gatunki *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cerevisiae* oraz *S. kudriavzevii*. Zmienność genomową obserwowano głównie w regionach subtelomerowych oraz zmiany typu utrata/nadwyżka fragmentów chromosomów dotyczyły głównie chromosomów I, III, VI oraz IX. Istotnie statystycznie różnice w ilości kopii genów zanotowano w sześciu funkcjonalnych kategoriach, a mianowicie: 1) zachowanie długości telomerów przez rekombinację, aktywność helikazy DNA lub wiązanie DNA, 2) metabolizm maltozy, aktywność przezbłonowego transportera glukozy, 3) katabolizm asparaginy, komórkowe odpowiedzi na głodzenie azotowe, 4) transport w oparciu o siderofory, 5) odpowiedź na obecność jonów miedzi, wiązanie jonów kadmu oraz 6) aktywność L-idoitol-2-dehydrogenazy. Utrata kopii genu *YRF1* (helikaza elementu Y' zależna od ATP) była skorelowana z obniżonym poziomem sekwencji Y' oraz wzrostem podwójnych oraz pojedynczych pęknięć nici DNA, a także z oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA w grupie drożdży należącej do gatunku *S. paradoxus* w porównaniu do grupy drożdży należącej do gatunku *S. bayanus*. Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto przypuszczenie, iż naturalnie występująca zmienność w ilości kopii genu *YRF1* może promować stabilność genetyczną w grupie drożdży należącej do gatunku *S. bayanus*.

W pracy zatytułowanej „Adaptive response to chronic mild ethanol stress involves ROS, sirtuins and changes in chromosome dosage in wine yeasts” badano odpowiedź adaptacyjną drożdży winiarskich na niskie, nietoksyczne stężenie etanolu i stwierdzono, iż wzrost produkcji reaktywnych formy tlenu (pula całkowita ROS oraz pula anionorodnika ponadtlenkowego) po ekspozycji na etanol promuje wzrost komórek, czemu towarzyszy zwiększona ekspresja sirtuin (Sir1, Sir2 oraz Sir3) oraz czynnika transkrypcyjnego Rap1. Zaobserwowano zwiększenie ilości fragmentów chromosomów I, III oraz VI, a także zmiany w ilości kopii genów z dziewięciu funkcjonalnych kategorii zaangażowanych w procesy metaboliczne i odpowiedź na stres komórkowy, przy czym wzrost ilości kopii genów *YRF1* oraz *CUP1* był najbardziej widoczny. Zanotowano także fragmentację jąderka, co potwierdza, iż jąderko może być rozpatrywane jako sensor stresu. Podsumowując, odpowiedź adaptacyjna komórek drożdży winiarskich na niskie dawki etanolu polega na zmianach w poziomie reaktywnych form tlenu, zmianach w ekspresji sirtuin oraz zmianach w dawkach genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy chromosomowej oraz detoksykację metali przejściowych.

W pracy zatytułowanej „Shifts in rDNA levels act as a genome buffer promoting chromosome homeostasis” wykazano, iż podczas pasażowania drożdży przemysłowych (100 generacji), a także w odpowiedzi na stres indukowany etanolem następuje selekcja komórek i komórki z bardziej zbalansowanym garniturem chromosomowym są promowane, co kontrolowane jest przez rDNA. Sekwencjonowanie nowej generacji ujawniło również zmiany w genach istotnych z punktu widzenia metabolizmu białek oraz DNA/RNA. Zmiany na poziomie chromosomowym skorelowano również ze stanem homeostazy redoks, stabilnością genetyczną oraz stanem telomerów i jąderka. Uzyskane wyniki sugerują, iż genom drożdżowy jest dynamiczny i homeostaza chromosomowa może być zapewniana przez zmiany w puli rDNA.

W pracy zatytułowanej „Relationships between rDNA, Nop1 and Sir complex in biotechnologically relevant distillery yeasts” dokonano charakterystyki stanu jąderka u 22 szczepów drożdży gorzelniczych (poziom oraz długość sekwencji rDNA oraz poziom wybranych białek jąderkowych). Negatywne korelacje pomiędzy poziomem rDNA a poziomem Nop1, poziomem Sir2 a poziomem Nop1, a także, poziomem Sir2 a poziomem Fob1 zostały zaobserwowane. Tolerancja na warunki stresowe towarzyszące procesowi fermentacji była związana z pulą rDNA oraz poziomem Sir2 (niska temperatura, wysoka temperatura, ekspozycja na KCl). Otrzymane wyniki sugerują, iż rDNA może być rozpatrywane jako kolejny czynnik modulujący proces biotechnologiczny (w tym przypadku fermentację alkoholową).

W pracy zatytułowanej „Copy number variations of genes involved in stress responses reflect the redox state and DNA damage in brewing yeasts” dokonano charakterystyki genomowej wybranych szczepów drożdży piwowskich i zaobserwowano różnice w ilości kopii genów w obrębie pięciu funkcjonalnych kategorii, a mianowicie: 1) metabolizm i transport maltozy, 2) odpowiedź na toksyny, 3) transport w oparciu o siderofory, 4) metabolizm aldehydów oraz 5) aktywność L-itytol 2-dehydrogenazy. Utrata kopii genów kodujących dehydrogenazę alkoholi arylowych (geny AAD) korelowała ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA i pęknięciami nici DNA, obniżonym poziomem białek jąderkowych Nop1 oraz Fob1 oraz zmniejszoną tolerancją na czynniki stresowe towarzyszące procesowi fermentacji. Uzyskane wyniki wskazują na dalsze potencjalne kierunki ulepszania szczepów przemysłowych w oparciu o modulowanie dawek genów AAD.

W pracy zatytułowanej „Affected chromosome homeostasis and genomic instability of clonal yeast cultures” badano zmienność klonalną (genetyczną oraz genomową) wybranych klonów komórek drożdżowych zarówno szczepów dzikich, jak i pojedynczych mutantów delecyjnych pozbawionych genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, naprawę DNA czy kontrolę długowieczności z zastosowaniem opracowanych przez nasz zespół metod, tj. metody kometowej pojedynczego chromosomu oraz CGH *in situ*. Zwiększona łamliwość chromosomów oraz pojawianie się nietypowych struktur chromosomowych związanych ze stresem replikacyjnym były skorelowane z niestabilnością genetyczną, przypadkami disomii, monosomii oraz rzadziej trisomii, co może w konsekwencji promować zmienność genomową w obrębie teoretycznie identycznych genetycznie populacji komórek drożdżowych wywodzących się z pojedynczej komórki i mieć implikacje zarówno w naukowej pracy laboratoryjnej, jak również wpływać na proces biotechnologiczny z udziałem drożdżowych szczepów przemysłowych.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. Adamczyk J, Deręgowska A, Skoneczny M, Skoneczna A, Kwiatkowska A, Potocki L, Rawska E, Pabian S, Kapłan J, **Lewińska A**, Wnuk M. 2016. Adaptive response to chronic mild ethanol stress involves ROS, sirtuins and changes in chromosome dosage in wine yeasts. *Oncotarget*. May 24;7(21):29958-76. IF₂₀₁₆ = 5.168. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 35 – **równorzędny autor korespondujący**.
2. Adamczyk J, Deręgowska A, Panek A, Golec E, **Lewińska A**, Wnuk M. 2016. Affected chromosome homeostasis and genomic instability of clonal yeast cultures. *Curr Genet*. May;62(2):405-18. IF₂₀₁₆ = 3.764. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 25 – **równorzędny autor korespondujący**.

3. Adamczyk J, Deręgowska A, Skoneczny M, Skoneczna A, Natkańska U, Kwiatkowska A, Rawska E, Potocki L, Kuna E, Panek A, **Lewińska A**, Wnuk M. 2016. Copy number variations of genes involved in stress responses reflect the redox state and DNA damage in brewing yeasts. *Cell Stress Chaperones*. Sep;21(5):849-64. IF₂₀₁₆ = 2.411. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 20 – **równorzędny autor korespondujący**.
4. Adamczyk J, Deręgowska A, Potocki L, Kuna E, Kapłan J, Pabian S, Kwiatkowska A, **Lewińska A**, Wnuk M. 2016. Relationships between rDNA, Nop1 and Sir complex in biotechnologically relevant distillery yeasts. *Arch Microbiol*. Sep;198(7):715-23. IF₂₀₁₆ = 1.6. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 20 – **równorzędny autor korespondujący**.
5. Deręgowska A, Skoneczny M, Adamczyk J, Kwiatkowska A, Rawska E, Skoneczna A, **Lewińska A**, Wnuk M. 2015. Genome-wide array-CGH analysis reveals *YRF1* gene copy number variation that modulates genetic stability in distillery yeasts. *Oncotarget*. Oct 13;6(31):30650-63. IF₂₀₁₅ = 5.008. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 40 – **równorzędny autor korespondujący**.
6. Deręgowska A, Adamczyk J, Kwiatkowska A, Gurgul A, Skoneczny M, Skoneczna A, Szmatoła T, Jasielczuk I, Magda M, Rawska E, Pabian S, Panek A, Kapłan J, **Lewińska A**, Wnuk M. 2015. Shifts in rDNA levels act as a genome buffer promoting chromosome homeostasis. *Cell Cycle*. Nov 2;14(21):3475-87. IF₂₀₁₅ = 3.952. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30 – **równorzędny autor korespondujący**.

5.3 Molekularne mechanizmy leżące u podstaw starzenia komórkowego oraz na poziomie całego organizmu

Badania naukowe odzwierciedlające moje zainteresowania naukowe dotyczące molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesu starzenia się prowadziłam już na etapie realizacji pracy doktorskiej zatytułowanej „Udział flawohemoglobiny w obronie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed reaktywnymi formami azotu i tlenu” pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Bartosza. Z uwagi na postulowaną rolę tlenu azotu jako cząsteczki sygnałowej także w jednokomórkowym organizmie *S. cerevisiae* (J. Cell Sci., 2007, 120(Pt 18), 3279–3288), postanowiono zweryfikować udział tlenu azotu w mediowaniu apoptotycznej śmierci komórki podczas starzenia chronologicznego komórek drożdży *S. cerevisiae* (praca zatytułowana „A genetic analysis of nitric oxide-mediated signaling during chronological aging in the yeast”). Badania prowadzono we współpracy z dr Agnieszką Grzelak (Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki). Użyto komórki pozbawione flawohemoglobiny Yhb1 enzymu metabolizującego tlenek azotu, czynnika transkrypcyjnego Fzf1 biorącego udział w odpowiedzi komórek na stymulację tlenkiem azotu oraz reduktazy S-nitrozoglutationu Sfa1 metabolizującej S-nitrozoglutation. Chronologiczna długość życia mutantów nie okazała się zmieniona w stosunku do komórek kontrolnych, a poziom tlenu azotu, nitracja tyrozyny w białkach oraz ekspresja flawohemoglobiny raczej spadały niż rosły podczas hodowli długoterminowej. Uzyskane wyniki wskazują, iż apoptoza podczas starzenia chronologicznego drożdży jest promowana raczej przez powstający anionorodnik ponadtlenkowy niż tlenek azotu.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, byłam wykonawcą trzech krajowych projektów naukowych dotyczących różnych zagadnień starzenia i angażujących różne modele eksperymentalne (limfocyty końskie izolowane od

młodych, dojrzałych oraz starych osobników, jednokomórkowy organizm drożdży *S. cerevisiae* oraz komórki mięśni gładkich i śródbłonka pochodzące z ludzkiej aorty).

W ramach realizacji projektu zatytułowanego „Zastosowanie metod cytogenetyki molekularnej w monitorowaniu zmian zachodzących w chromatynie somatycznych komórek starzejących się zwierząt na przykładzie gatunku *Equus caballus*” (numer N N311 06 89 37, KBN) pod kierunkiem Prof. dr hab. Ewy Słoty (Zakład Immunologii i Cytogenetyki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) powstały z moim udziałem trzy prace doświadczalne (opublikowane w *Mechanisms of Ageing and Development*, *Age* oraz *Annals of Animal Science*) oraz jedna praca przeglądowa (opublikowana w *Annals of Animal Science*).

W pracy zatytułowanej „Age-related changes in genomic stability of horses” na grupie 80 koni należących do dwóch ras huculskiej oraz angloarabskiej pokazano, iż poziom pęknięć nici DNA, oksydacyjnych uszkodzeń DNA, wymiana chromatyd siostrzanych oraz pęknięcia chromatyd indukowane bleomycyną są podwyższone w grupie koni starych w stosunku do grupy koni dorosłych, co może wskazywać na istotność zmian w stabilności genetycznej w przebiegu starzenia u koni.

W pracy zatytułowanej „Changes in DNA methylation patterns and repetitive sequences in blood lymphocytes of aged horses” wykazano obniżenie globalnej metylacji DNA, utratę pericentromerowej heterochromatyny, obniżenie ilości i rozmiarów obszarów jąderkotwórczych oraz skrócenie długości telomerów w limfocytach końskich pochodzących od starych donorów, co może mieć związek z uprzednio udokumentowaną i związaną z wiekiem niestabilnością genetyczną u koni.

W pracy zatytułowanej „Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the *Tert* locus” badano polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie genu kodującego podjednostkę białkową końskiej telomerazy u koni huculskich oraz angloarabskich i allele charakterystyczne dla obu ras zostały zidentyfikowane (12 haplotypów dla rasy angloarabskiej oraz 11 haplotypów dla rasy huculskiej).

Z kolei w pracy przeglądowej zatytułowanej „Aging Process in Chromatin of Animals” dokonano przeglądu literatury na temat związanych z wiekiem zmian w obrębie chromatyny, ze szczególnym zwróceniem uwagi na uszkodzenia DNA, skracanie telomerów oraz zmiany epigenetyczne, głównie zmiany w metylacji DNA.

W ramach realizacji projektu zatytułowanego „Otrzymanie oraz wykorzystanie panelu sond malujących chromosomy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelowych badaniach starzenia” (IUVENTUS PLUS, numer 0607/IP1/2011/71, MNiSW) pod kierunkiem dr hab. Macieja Wnuka (Zakład Genetyki, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego) powstała z moim udziałem praca eksperymentalna zatytułowana „Links between nucleolar activity, rDNA stability, aneuploidy and chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. Pokazano, iż w przebiegu starzenia chronologicznego u drożdży *S. cerevisiae*, niestabilność chromosomu XII, wynikająca z zaburzenia równowagi redoks, prowadzi zarówno do niestabilności rDNA, jak i do aneuploidii całych chromosomów. Fragmentacja jąderka podczas starzenia chronologicznego może być wynikiem powiększenia jąderka oraz/lub podwyższonej ekspresji białka Nop2. Pula rDNA komórek starych chronologicznie określała późniejszą replikacyjną długość życia. Otrzymane wyniki sugerują, iż stan jąderka jest zmieniony podczas starzenia chronologicznego komórek drożdży *S. cerevisiae*.

W ramach realizacji projektu zatytułowanego „Wpływ kurkuminy na modulację procesu starzenia *in vitro* prawidłowych komórek mięśni gładkich i śródbłonka naczyń, pochodzących z aorty” (OPUS, numer 2011/01/B/NZ3/02137, NCN) pod

kierunkiem dr hab. Anny Bielak-Żmijewskiej (Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa) powstały z moim udziałem cztery prace eksperymentalne (opublikowane w *Biogerontology*, *Age*, *Toxicology Letters* oraz *Oncotarget*).

W pracy zatytułowanej „A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta” porównano liczne biomarkery starzenia podczas starzenia replikacyjnego oraz indukowanego doksorubicyną w komórkach mięśni gładkich pochodzących z aorty. Stwierdzono, iż większość biomarkerów starzenia była wspólna dla obu typów starzenia. Niemniej jednak, komórki były zatrzymane w różnych fazach cyklu komórkowego w trakcie starzenia replikacyjnego (faza G1) oraz indukowanego doksorubicyną (faza G2/M). Doksorubicyna również nie promowała procesu zwapnienia, co sugeruje, iż doksorubicyna nie wzmacnia mineralizacji naczyń krwionośnych, co jest typowe w przebiegu starzenia replikacyjnego.

W pracy zatytułowanej „Curcumin induces senescence of primary human cells building the vasculature in a DNA damage and ATM-independent manner” dowiedziono, iż komórki mięśni gładkich i śródbłonna pochodzące z aorty są bardzo wrażliwe na stymulację kurkuminy oraz ulegają starzeniu pod wpływem cytostatycznych dawek kurkuminy. Obserwowano charakterystyczne markery starzenia po traktowaniu komórek kurkuminy, niemniej jednak liczba ognisk 53BP1 spadała. Wyciszenie ATM oraz suplementacja antyoksydantami nie hamowały starzenia komórkowego, co może sugerować, iż starzenie stymulowane przez kurkuminy jest niezależne od uszkodzeń DNA i ATM, a także nie jest indukowane przez reaktywne formy tlenu w komórkach budujących naczynia krwionośne. Otrzymane wyniki sugerują również, iż kurkumina może indukować starzenie komórkowe w komórkach prawidłowych jako efekt uboczny suplementacji i zwracają uwagę na bardziej uważne stosowanie preparatów zawierających kurkuminy, zwłaszcza tych o zwiększonej biodostępności kurkuminy.

W pracy zatytułowanej „Curcumin induces oxidation-dependent cell cycle arrest mediated by SIRT7 inhibition of rDNA transcription in human aortic smooth muscle cells” pokazano, iż cytostatyczne działanie kurkuminy jest wynikiem zmian w aktywności jąderka oraz zahamowania transkrypcji rDNA w komórkach mięśni gładkich pochodzących z aorty, co może być związane z obniżeniem ekspresji SIRT7 oraz metylacją promotora genu *RNA18S5*. Kurkumina indukowała również ekspresję metylotransferazy DNMT2, co może świadczyć o adaptacyjnej odpowiedzi komórki opartej na stabilizacji RNA poprzez DNMT2. Otrzymane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia efektów biologicznych oraz farmakologicznych kurkuminy w układzie sercowo-naczyniowym człowieka.

Z kolei w pracy zatytułowanej „Curcumin elevates sirtuin level but does not postpone *in vitro* senescence of human cells building the vasculature” zweryfikowano czy bardzo niskie dawki kurkuminy mogą opóźnić efekty starzenia w komórkach mięśni gładkich i śródbłonna pochodzących z aorty oraz promować zwiększoną ekspresję sirtuin. Nie wykazano efektu anty-starzeniowego kurkuminy, natomiast zaobserwowano zwiększoną ekspresję sirtuin po stymulacji kurkuminy. Aktywacja sirtuin może wynikać z aktywacji AMPK jako rezultat podwyższonego poziomu anionorodnika ponadtlonowego czy obniżenia puli ATP po traktowaniu kurkuminy.

W ramach pracy o charakterze hipotezy zatytułowanej „*Helicobacter pylori*-induced premature senescence of extragastric cells may contribute to chronic skin diseases”, zaproponowano, iż przewlekłe choroby skóry przebiegające ze stanem zapalnym

mogą być promowane przez starzenie komórek skóry (fibroblastów oraz keratynocytów) indukowane przez cytotoksyny *Helicobacter pylori*.

Ostatnio, w ramach współpracy naukowej z Prof. Sureshem Rattanem (Laboratory of Cellular Ageing, Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Dania), uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu rapamycyny i głodzenia na przebieg starzenia ludzkich fibroblastów *in vitro*. Badania te były finansowane z projektu unijnego numer 633589 w ramach Horizon 2020 Research and Innovation Programme i otrzymane wyniki opublikowano w czasopiśmie *Biogerontology* (praca zatytułowana „Chronic exposure to rapamycin and episodic serum starvation modulate ageing of human fibroblasts *in vitro*”).

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. Sodagam L, **Lewińska A**, Wnuk M, Rattan S. 2017. Chronic exposure to rapamycin and episodic serum starvation modulate ageing of human fibroblasts *in vitro*. ***Biogerontology***. Oct;18(5):841-854. IF₂₀₁₆ = 3.231. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 30.
2. **Lewińska A**, Wnuk M. 2017. *Helicobacter pylori*-induced premature senescence of extragastric cells may contribute to chronic skin diseases. ***Biogerontology***. Apr;18(2):293-299. IF₂₀₁₆ = 3.231. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 30 – **równorzędny autor korespondujący**.
3. Grabowska W, Suszek M, Wnuk M, **Lewińska A**, Wasiak E, Sikora E, Bielak-Żmijewska A. 2016. Curcumin elevates sirtuin level but does not postpone *in vitro* senescence of human cells building the vasculature. ***Oncotarget***. Apr 12;7(15):19201-13. IF₂₀₁₆ = 5.168. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 35.
4. **Lewińska A**, Wnuk M, Grabowska W, Ząbek T, Semik E, Sikora E, Bielak-Żmijewska A. 2015. Curcumin induces oxidation-dependent cell cycle arrest mediated by SIRT7 inhibition of rDNA transcription in human aortic smooth muscle cells. ***Toxicol Lett***. Mar 18;233(3):227-38. IF₂₀₁₅ = 3.522. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 35 – **równorzędny autor korespondujący**.
5. Grabowska W, Kucharewicz K, Wnuk M, **Lewińska A**, Suszek M, Przybylska D, Mosieniak G, Sikora E, Bielak-Żmijewska A. 2015. Curcumin induces senescence of primary human cells building the vasculature in a DNA damage and ATM-independent manner. ***Age (Dordr)***. Feb;37(1):9744. IF₂₀₁₅ = 2.500. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30.
6. Bielak-Żmijewska A, Wnuk M, Przybylska D, Grabowska W, **Lewińska A**, Alster O, Korwek Z, Cmoch A, Myszka A, Piśkuła S, Mosieniak G, Sikora E. 2014. A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. ***Biogerontology***. Feb;15(1):47-64. IF₂₀₁₄ = 3.29. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 30.
7. **Lewińska A**, Miedziak B, Kułak K, Mołoń M, Wnuk M. 2014. Links between nucleolar activity, rDNA stability, aneuploidy and chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***Biogerontology***. Jun;15(3):289-316. IF₂₀₁₄ = 3.29. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 30.
8. Wnuk M, **Lewińska A**, Gurgul A, Ząbek T, Potocki T, Oklejewicz B, Bugno-Poniewierska M, Węgrzyn M, Słota E. 2014. Changes in DNA methylation patterns and repetitive sequences in blood lymphocytes of aged horses. ***Age (Dordr)***. Feb;36(1):31-48. IF₂₀₁₄ = 3.39. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 35.

9. Wnuk M, Bugno-Poniewierska M, **Lewińska A**, Oklejewicz B, Ząbek T, Bartosz G, Słota E. 2011. Age-related changes in genomic stability of horses. **Mech Ageing Dev.** 2011 May;132(5):257-68. IF₂₀₁₁ = 3.439. Punkty MNiSW₂₀₁₁ = 32.
10. Ząbek T, Czapla P, Wnuk M, **Lewińska A**, Oklejewicz B, Bartosz G, Słota E. 2012. Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the *Tert* locus. **Ann Anim Sci.** 12(4): 483–494. IF₂₀₁₂ = 0.42. Punkty MNiSW₂₀₁₂ = 15.
11. Wnuk M, Bugno-Poniewierska M, **Lewińska A**, Oklejewicz B, Ząbek T, Słota E. 2012. Aging Process in Chromatin of Animals. **Ann Anim Sci.** 12(3):301–309. IF₂₀₁₂ = 0.42. Punkty MNiSW₂₀₁₂ = 15.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

1. **Lewińska A**, Macierzyńska M, Grzelak A, Bartosz G. 2011. A genetic analysis of nitric oxide-mediated signaling during chronological aging in the yeast. **Biogerontology.** Aug;12(4):309-20. IF₂₀₁₁ = 3.339. Punkty MNiSW₂₀₁₁ = 32 - autor korespondujący.

5.4 Analiza biokompatybilności wybranych nanocząstek w modelowych liniach komórkowych oraz limfocytach ludzkich *in vitro*

Nanomateriały są szeroko stosowane zarówno w medycynie (diagnostyka, terapia), jak i w różnych gałęziach przemysłu. Niemniej jednak, wiedza na temat biokompatybilności konkretnych nanomateriałów i nanocząstek jest ciągle niewystarczająca, a wyjaśnienie molekularnego podłoża działania nanomateriałów na organizmy żywe, w tym człowieka, wymaga dalszych pogłębionych badań (Annu. Rev. Public Health, 2009, 30, 137-150; Small, 2008, 4, 26-49). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, byłam zaangażowana w realizację dwóch naukowych projektów studenckich (numer UDA-POKL.04.01.02-00-038/09-00 w ramach kierunku zamawianego „Studenci biotechnologii akceleratorem gospodarki opartej na wiedzy” finansowanego w ramach działania POKL 4.1.2, MNiSW/NCBiR oraz „Identyfikacja nowych zagrożeń związanych ze stosowaniem nanocząstek złota, srebra, krzemu oraz nanodiamentów na proces przedwczesnego starzenia się komórek ludzkich”, Generacja Przyszłości, numer 19/POIG/GP/2013, MNiSW). W ramach realizacji wymienionych wyżej projektów powstało sześć manuskryptów opublikowanych w Molecular Neurobiology, Biomaterials, Diamond and Related Materials, Biomed Research International, Chemico-Biological Interactions oraz Carbon.

W pracy zatytułowanej „Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes *in vitro*” wykazano, iż proszek nanodiamentowy indukuje stres oksydacyjny w limfocytach krwi obwodowej człowieka *in vitro*, co promuje uszkodzenia DNA (pęknięcia pojedynczej nici DNA, oksydacyjne uszkodzenia DNA) oraz wywołuje efekt aneugenny (obecność sygnałów centromerowych w formowanych mikrojądrach).

W pracy zatytułowanej „Nanodiamond-mediated impairment of nucleolar activity is accompanied by oxidative stress and DNMT2 upregulation in human cervical carcinoma cells” i powstałej w ramach współpracy z dr hab. Anną Bielak-Żmijewską (Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa) udokumentowano, iż proszek nanodiamentowy indukuje stres jąderkowy (zmiany w ilości oraz wielkości jąderek, przemieszczanie się czynnika transkrypcyjnego RRN3 z jądra do cytoplazmy) w komórkach raka szyjki

macy HeLa, co mediowane jest przez stres oksydacyjny. Zaobserwowano też ciekawą odpowiedź komórek nowotworowych na stymulację proszkiem nanodiamentowym, a mianowicie stabilizację RNA, w czym uczestniczyła metylotransferaza DNMT2.

W pracy zatytułowanej „Nanoparticle-mediated decrease of lamin B1 pools promotes a TRF protein-based adaptive response in cultured cells” dokonano dogłębnej analizy molekularnego działania nanocząstek srebra, krzemu oraz proszku nanodiamentowego względem pięciu linii komórkowych, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na możliwość indukowania starzenia komórkowego przez użyte nanocząstki. Nanocząstki indukowały stres oksydacyjny i szlak NF- κ B, co prowadziło do obniżenia poziomu laminy B1 oraz podwyższenia ekspresji białek TRF oraz utrzymania homeostazy telomerowej (długości telomerów). W komórkach nowotworowych, odpowiedź była niezależna od p53, natomiast w fibroblastach z aktywnym szlakiem p53/p21 odnotowano starzenie komórkowe indukowane stresem.

W pracy zatytułowanej „Gold Nanoparticles Promote Oxidant-Mediated Activation of NF- κ B and 53BP1 Recruitment-Based Adaptive Response in Human Astrocytes” stwierdzono, iż nanocząstki złota wpływają na cykl komórkowy oraz indukują starzenie komórkowe w astrocytach ludzkich *in vitro*, czemu towarzyszy stres oksydacyjny, aktywacja ścieżki NF- κ B oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA. W pracy zatytułowanej „Nanodiamond-induced increase in ROS and RNS levels activates NF- κ B and augments thiol pools in human hepatocytes” zaobserwowano odpowiedź adaptacyjną hepatocytów ludzkich na stymulację nanodiamentami. Nanodiamenty podwyższały poziom reaktywnych form tlenu oraz reaktywnych form azotu oraz indukowały ścieżkę NF- κ B, co promowało podwyższenie puli komórkowych tioli (pula glutationu GSH).

Z kolei w pracy zatytułowanej „Prolonged Effects of Silver Nanoparticles on p53/p21 Pathway-Mediated Proliferation, DNA Damage Response, and Methylation Parameters in HT22 Hippocampal Neuronal Cells” badano trwałe efekty wywoływane przez nanocząstki srebra na mysie komórki neuronalne HT22 po usunięciu nanocząstek srebra ze środowiska hodowlanego *in vitro*. Nanocząstki srebra promowały zmiany w cyklu komórkowym, stres oksydacyjny, odpowiedź na uszkodzenia DNA, a także zmiany epigenetyczne, tj. globalną hipermetylację DNA oraz podwyższenie poziomu metylotransferaz Dnmt1, Dnmt3a oraz Dnmt3b. Co więcej, zaobserwowano odpowiedź adaptacyjną opartą na podwyższonym poziomie metylotransferazy Dnmt2, czego wynikiem była stabilizacja RNA.

Ostatnio, w ramach współpracy naukowej z Prof. Klaudią Tortiglione (Istituto di Scienze Applicate e Sistemi Intelligenti „E. Caianiello”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli, Włochy), brałam udział w badaniach dotyczących efektów cytofizjologicznych wywoływanych przez nanocząstki P3HT przed i po naświetlaniu w organizmie wodnym stulbi (*Hydra*), a zwłaszcza badałam możliwość indukowania stresu oksydacyjnego i odpowiedzi w oparciu o białka szoku cieplnego po ekspozycji na nanocząstki P3HT. Obecnie przygotowujemy jest manuskrypt do oceny w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. Mytych J, Żebrowski J, **Lewińska A**, Wnuk M. 2017. Prolonged Effects of Silver Nanoparticles on p53/p21 Pathway-Mediated Proliferation, DNA Damage Response, and Methylation Parameters in HT22 Hippocampal

- Neuronal Cells. *Mol Neurobiol.* Mar;54(2):1285-1300. IF₂₀₁₆ = 6.19. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40 – **równorzędny autor korespondujący.**
2. Mytych J, Pacyk K, Pępek M, Żebrowski J, **Lewińska A**, Wnuk M. 2015. Nanoparticle-mediated decrease of lamin B1 pools promotes a TRF protein-based adaptive response in cultured cells. *Biomaterials.* Jun;53:107-16. IF₂₀₁₅ = 8.387. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 50.
 3. Mytych J, **Lewińska A**, Żebrowski J, Wnuk M. 2015. Nanodiamond-induced increase in ROS and RNS levels activates NF-κB and augments thiol pools in human hepatocytes. *Diam Relat Mater.* May 55;95-101. IF₂₀₁₅ = 2.125. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 25.
 4. Mytych J, **Lewińska A**, Żebrowski J, Wnuk M. 2015. Gold Nanoparticles Promote Oxidant-Mediated Activation of NF-κB and 53BP1 Recruitment-Based Adaptive Response in Human Astrocytes. *Biomed Res Int.* 2015:304575. IF₂₀₁₅ = 2.134. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 20.
 5. Mytych J, **Lewińska A**, Bielak-Żmijewska A, Grabowska W, Żebrowski J, Wnuk M. 2014. Nanodiamond-mediated impairment of nucleolar activity is accompanied by oxidative stress and DNMT2 upregulation in human cervical carcinoma cells. *Chem Biol Interact.* Jun 11;220C:51-63. IF₂₀₁₄ = 2.577. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 30.
 6. Dworak N, Wnuk M, Żebrowski J, Bartosz G, **Lewińska A**. 2014. Genotoxic and mutagenic activity of diamond nanoparticles in human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Carbon.* Mar;68:763–776. IF₂₀₁₄ = 6.196. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 40 - **autor korespondujący.**

5.5 Molekularne mechanizmy leżące u podłoża niestabilności genomowej u zwierząt o znaczeniu ekonomicznym

Zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, dzięki licznym współpracom naukowym, uczestniczyłam w badaniach dotyczących przyczyn i konsekwencji niestabilności genomowej u zwierząt o znaczeniu ekonomicznym. W ramach współpracy z dr Wierą Schwarzbacherową (Institute of Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Koszyce, Słowacja) powstała praca zatytułowana „Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes”. Zaobserwowano, iż preparat Tango® Super na bazie dwóch fungicydów indukuje stres oksydacyjny (podwyższony poziom anionorodnika ponadtlenkowego, karbonylacja białek oraz zmiany w składzie błony komórkowej), uszkodzenia DNA oraz apoptotyczną śmierć limfocytów bydlęcych *in vitro*.

W ramach współpracy z Prof. Christophem Kochem (ISME - Equine Clinic Bern, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Szwajcaria), z dr Jolantą Klukowską-Rötzler (Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Szwajcaria), z dr hab. Anną Bielak-Żmijewską (Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa) oraz z Prof. dr hab. Moniką Bugno-Poniewierską (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) powstały dwie prace eksperymentalne opublikowane w czasopiśmie *Biochimie*. W pracach zatytułowanych „DNA hypomethylation and oxidative stress-mediated increase in genomic instability in equine sarcoid-derived fibroblasts” oraz „Sarcoid-derived fibroblasts: Links between genomic instability, energy metabolism and senescence” badano cytofizjologiczne efekty obecności wirusa BPV-1 w fibroblastach wyprowadzonych z końskich

sarkoidów. Dowiedziono, iż komórki zainfekowane wirusem BPV-1 cechują się podwyższoną produkcją anionorodnika ponadtlenkowego oraz obniżoną ekspresją enzymów antyoksydacyjnych oraz zmienionym profilem metylacji DNA (globalna hipometylacja DNA), co przyczynia się do zaburzeń stabilności genetycznej (uszkodzenia DNA) i ploidalności w komórkach wyprowadzonych z końskich sarkoidów. Wykazano również, iż populacja komórek wyprowadzona z końskich sarkoidów stanowi frakcję heterologiczną składającą się z komórek cechujących się wzmożoną proliferacją oraz zwiększoną produkcją ATP, a z drugiej strony z komórek posiadających skrócone telomery, co może być wynikiem stresu oksydacyjnego, oraz szybciej ulegających starzeniu komórkowemu w porównaniu do komórek kontrolnych, co ostatecznie odzwierciedla plastyczność fenotypową populacji komórek wyprowadzonych z końskich sarkoidów.

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Moniką Bugno-Poniewierską (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) powstała praca zatytułowana „Cadmium-induced changes in genomic DNA-methylation status increase aneuploidy events in a pig Robertsonian translocation model”. Użyto świński model translokacji Robertsonowskiej (37,XX,der15;17 lub 37,XY,der15;17) do określenia roli jonów kadmu w modulowaniu globalnej metylacji DNA i promowaniu efektów aneuploidalnych. Kadm promował globalną hipermetylację DNA, oksydacyjne uszkodzenia DNA i aneuploidie w różnych grupach chromosomów, a także indukował apoptotyczną śmierć komórki i obniżał potencjał proliferacyjny w limfocytach świńskich z translokacją Robertsonowską (37,XX,der15;17 lub 37,XY,der15;17).

W ramach realizacji projektu naukowego „Kliniczna i cytogenetyczna analiza nasienia ogierów w aspekcie zaburzeń płodności koni” (numer N N311 310636, KBN) pod kierunkiem dr Marka Tischnera (Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy, Kraków) powstała z moim udziałem jedna praca eksperymentalna zatytułowana „Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells”. Udokumentowano, iż uszkodzenia DNA plemników końskich (oksydacyjne uszkodzenia DNA, pęknięcia DNA) są związane z obniżoną aktywnością antyoksydacyjną osocza nasienia i zaproponowano aby uwzględnić analizę antyoksydacyjną osocza nasienia jako kolejny parametr oceniający jakość nasienia.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. Schwarzbacherová V, Wnuk M, **Lewińska A**, Potocki L, Żebrowski J, Koziorowski M, Holečková B, Šiviková K, Dianovský J. 2017. Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes. *Environ Pollut.* Jan;220(Pt A):255-263. IF₂₀₁₆ = 5.099. Punkty MNiSW₂₀₁₆ = 40.
2. Potocki L, **Lewińska A**, Klukowska-Rötzler J, Bielak-Żmijewska A, Grabowska W, Rzeszutek I, Kamińska P, Roga E, Bugno-Poniewierska M, Słota E, Mählmann K, Koch C, Wnuk M. 2014. Sarcoid-derived fibroblasts: Links between genomic instability, energy metabolism and senescence. *Biochimie.* Feb;97:163-72. IF₂₀₁₄ = 2.963. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 30.
3. Potocki L, **Lewińska A**, Klukowska-Rötzler J, Bugno-Poniewierska M, Koch C, Mählmann K, Janda J, Wnuk M. 2012. DNA hypomethylation and oxidative stress-mediated increase in genomic instability in equine sarcoid-derived

fibroblasts. *Biochimie*. Sep;94(9):2013-24. IF₂₀₁₂ = 3.142. Punkty MNiSW₂₀₁₂ = 30.

4. Inglot P, Lewińska A, Potocki L, Oklejewicz B, Tabęcka-Łonczyńska A, Koziarowski M, Bugno-Poniewierska M, Bartosz G, Wnuk M. 2012. Cadmium-induced changes in genomic DNA-methylation status increase aneuploidy events in a pig Robertsonian translocation model. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Sep 18;747(2):182-9. IF₂₀₁₂ = 2.22. Punkty MNiSW₂₀₁₂ = 30.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Wnuk M, Lewińska A, Oklejewicz B, Bartosz G, Tischner M, Bugno-Poniewierska M. 2010. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology*. Dec;74(9):1677-84. IF₂₀₁₀ = 2.045. Punkty MNiSW₂₀₁₀ = 32.

5.6 Zastosowanie metod cytogenetyki molekularnej w poznawaniu genomów organizmów eukariotycznych

Zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, byłam również zaangażowana w badania naukowe mające na celu opracowanie nowych narzędzi badawczych do poznawania genomów organizmów eukariotycznych.

W ramach realizacji projektu zatytułowanego „Otrzymanie oraz wykorzystanie panelu sond malujących chromosomy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelowych badaniach starzenia” (IUVENTUS PLUS, numer 0607/IP1/2011/71, MNiSW) pod kierunkiem dr hab. Macieja Wnuka (Zakład Genetyki, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego) opracowano metodę kometową pojedynczych chromosomów do oceny uszkodzeń DNA na poziomie chromosomowym u drożdży *S. cerevisiae* (praca zatytułowana „Assessment of yeast chromosome XII instability: single chromosome comet assay”) oraz skonstruowano oraz oceniono przydatność panelu sond molekularnych malujących chromosomy drożdżowe do oceny zjawiska aneuploidii na poziomie pojedynczej komórki (praca zatytułowana „Single-cell analysis of aneuploidy events using yeast whole chromosome painting probes (WCPPs”). Sonda molekularna znakująca chromosomy pary XII drożdży na szkiełku mikroskopowym wraz z procedurą jej otrzymywania stanowi również przedmiot zgłoszenia patentowego „Sonda genetyczna typu *in situ* znakująca chromosomy pary XII drożdży piekarniczych na szkiełku mikroskopowym oraz sposób jej otrzymywania” (numer P.404526, 2013, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, Polska). Sonda ta została również wyróżniona srebrnym medalem podczas Brussels Innova 2014, International Exhibition of Invention, Research and New Technologies (Bruksela, Belgia).

W ramach realizacji projektu naukowego zatytułowanego „Genetyczna charakterystyka wybranych szczepów drożdżowych *Saccharomyces cerevisiae* pod względem ich niestabilności genetycznej ze szczególnym zwróceniem uwagi na zjawisko zaburzeń chromosomowych” (numer WND-RPPK-01.03.00-18-038/13, Regionalny Program Operacyjny Województwa Podkarpackiego na lata 2007-2013), w którym pełniłam rolę koordynatora naukowego, opracowano metodę CGH *in situ* służącą profilowaniu genetycznemu szczepów drożdży przemysłowych jako tańszą i opartą na analizie pojedynczej komórki alternatywę wobec metod opartych na mikromacierzach i wysokoprzepustowych analizach populacyjnych (praca

zatytułowana „Genetic profiling of yeast industrial strains using *in situ* comparative genomic hybridization (CGH)”).

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Adamem Jaworskim (Społeczna Akademia Nauk, Łódź) oraz z dr Anitą Ciesielską (Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Uniwersytet Łódzki) powstała praca zatytułowana „Identification of dermatophyte species using genomic *in situ* hybridization (GISH)”, w której zaproponowano identyfikację dermatofitów (*Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum* oraz *Microsporum canis*) opartą na metodzie GISH przy użyciu sond molekularnych typu GISH jako alternatywę do PCR-RFLP dającą często niejednoznaczne wzory prążków.

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Moniką Bugno-Poniewierską (Laboratorium Genomiki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) opracowano metodę detekcji 18S rDNA u świni, lisa oraz jenota, a także centromerów u konia z wykorzystaniem techniki PRINS (praca zatytułowana „PRINS detection of 18S rDNA in pig, red fox and Chinese raccoon dog, and centromere DNA in horse”), natomiast w ramach współpracy z Prof. dr hab. Ewą Słotą (Zakład Immuno- i Cytogenetyki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) opracowano metodę detekcji genów rRNA u drożdży *S. cerevisiae* także z wykorzystaniem techniki PRINS (praca zatytułowana „Rapid detection of yeast rRNA genes with primed *in situ* (PRINS) labeling”).

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. Wnuk M, Miedziak B, Kułak K, Panek A, Golec E, Deręgowska A, Adamczyk J, **Lewińska A**. 2015. Single-cell analysis of aneuploidy events using yeast whole chromosome painting probes (WCPPs). *J Microbiol Methods*. Apr;111:40-9. IF₂₀₁₅ = 1.857. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 25.
2. Wnuk M, Panek A, Golec E, Magda M, Deręgowska A, Adamczyk J, **Lewińska A**. 2015. Genetic profiling of yeast industrial strains using *in situ* comparative genomic hybridization (CGH). *J Biotechnol*. Sep 20;210:52-6. IF₂₀₁₅ = 2.667. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30.
3. **Lewińska A**, Miedziak B, Wnuk M. 2014. Assessment of yeast chromosome XII instability: single chromosome comet assay. *Fungal Genet Biol*. Feb;63:9-16. IF₂₀₁₄ = 2.587. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 35.
4. Worek M, Kwiatkowska A, Ciesielska A, Jaworski A, Kapłan J, Miedziak B, Deręgowska A, **Lewińska A**, Wnuk M. 2014. Identification of dermatophyte species using genomic *in situ* hybridization (GISH). *J Microbiol Methods*. May;100:32-41. IF₂₀₁₄ = 2.026. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 25.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Wnuk M, Oklejewicz B, **Lewińska A**, Ząbek T, Bartosz G, Słota E, Bugno-Poniewierska M. 2010. PRINS detection of 18S rDNA in pig, red fox and Chinese raccoon dog, and centromere DNA in horse. *Hereditas* Dec;147(6):320-4. IF₂₀₁₀ = 1.066. Punkty MNiSW₂₀₁₀ = 13.
2. Wnuk M, **Lewińska A**, Bugno M, Bartosz G, Słota E. 2009. Rapid detection of yeast rRNA genes with primed *in situ* (PRINS) labeling. *FEMS Yeast Res*. Jun;9(4):634-40. IF₂₀₀₉ = 1.785. Punkty MNiSW₂₀₀₉ = 24.

Zgłoszenie patentowe zarejestrowane w w/w tematyce:

1. Maciej Wnuk, Anna Lewińska. 2013 (rok rejestracji zgłoszenia patentowego). „Sonda genetyczna typu *in situ* znakująca chromosomy pary XII drożdży piekarniczych na szkiełku mikroskopowym oraz sposób jej otrzymywania”. Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej (nr P.404526).

5.7 Biologia reaktywnych form tlenu i azotu oraz znaczenie antyoksydantów w układach biologicznych

Zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, byłam również zaangażowana w badania naukowe dotyczące biologii reaktywnych form tlenu, jak i reaktywnych form azotu, a także potencjalnych zastosowań związków o charakterze antyoksydacyjnym w różnych układach biologicznych *in vitro*.

W ramach współpracy z Polską Akademią Zdrowia przebadano skład kwasów tłuszczowych i właściwości biologiczne trzech olejów jadalnych (dwóch lnianych i jednego rzepakowego) wobec mysich fibroblastów NIH3T3 (praca zatytułowana „Fatty Acid Profile and Biological Activities of Linseed and Rapeseed Oils”). Oleje promowały proliferację oraz migrację komórek w miejsce zranienia (test na gojenie się ran), co było zależne od zawartości kwasu α -linolenowego (ALA). Oleje nie wykazywały się ani cytotoksycznością, ani genotoksycznością, ani też nie indukowały stresu oksydacyjnego.

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Michałem Woźniakiem, z dr Magdaleną Górską (Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny) oraz z Prof. Francesco Cappello (Department of Experimental Biomedicine and Clinical Neurosciences, University of Palermo, Włochy) powstała praca eksperymentalna zatytułowana „DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol”, w której dowiedziono, iż 2-metoksyestradiol (2-ME) promuje wzrost puli jądrowej neuronalnej syntazy tlenu azotu (nNOS), co przyczynia się do oksydacyjnych uszkodzeń DNA, hamuje cykl komórkowy i indukuje apoptozę w komórkach kostniakomięsaka.

W ramach współpracy z Prof. dr hab. Ewą Słotą (Zakład Immuno- i Cytogenetyki, Instytut Zootechniki PIB, Balice) zaproponowano, iż przeciwnowotworowe działanie kurkuminy w relatywnie niskich stężeniach na komórki raka szyjki macicy HeLa polega na obniżaniu aktywności obszarów jąderkotwórczych poprzez globalną hipermetylację DNA (praca zatytułowana „Curcumin-mediated decrease in the expression of nucleolar organizer regions in cervical cancer (HeLa) cells”).

Z kolei w ramach realizacji naukowego projektu studenckiego numer UDA-POKL.04.01.02-00-038/09-00 w ramach kierunku zamawianego „Studenci biotechnologii akceleratorem gospodarki opartej na wiedzy” finansowanego w ramach działania POKL 4.1.2 (MNiSW/NCBiR) powstała praca zatytułowana „Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications”, w której oceniono ochronne działanie piętnastu flawonoidów względem utleniającego i chlorującego działania podchlorynu w układach *in vitro* zawierających komórki, a także w układach bezkomórkowych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych, byłam zaangażowana w liczne badania naukowe wykorzystujące drożdże *S. cerevisiae* jako organizm modelowy, zwłaszcza do badania różnych aspektów stresu oksydacyjnego i testowania ochronnego działania związków o charakterze antyoksydacyjnym.

W ramach pracy magisterskiej pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Bartosza, badałam efekty ochronne wybranych antyoksydantów, tj. askorbinianu, glutationu, tempolu, troloksu oraz melatoniny wobec komórek drożdży pozbawionych dysmutazy

ponadtlenkowej oraz glutaredoksyny 5 oraz traktowanych zestawem różnych oksydantów. Wynikiem tychże badań finansowanych z projektu naukowego zatytułowanego „Zastosowanie mutantów drożdży nadwrażliwych na stres oksydacyjny dla identyfikacji i testowania właściwości antyoksydacyjnych związków egzo- i endogennych” (numer 3 P04B 006 22, KBN) i realizowanych pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Bartosza jest praca eksperymentalna zatytułowana „Limited effectiveness of antioxidants in the protection of yeast defective in antioxidant proteins”. Praca zatytułowana „Yeast flavohemoglobin protects against nitrosative stress and controls ferric reductase activity” również powstała w wyniku realizacji wspomnianego wyżej projektu. Wykazano, iż mutanty drożdżowe pozbawione flavohemoglobiny są nadwrażliwe na ekspozycję na donory tlenu azotu oraz czynniki nitrujące, a nie są wrażliwe na oksydanty. Delecja genu *YHB1* zmienia także aktywność przezbłonowego systemu redukcji żelaza.

W pracy zatytułowanej „Protection of yeast lacking the Ure2 protein against the toxicity of heavy metals and hydroperoxides by antioxidants” badano efekty ochronne askorbinianu, glutationu, tempolu, troloksu oraz melatoniny względem komórek drożdży pozbawionych białka Ure2 o domniemanej roli antyoksydacyjnej po ekspozycji na metale ciężkie i wodoronadtlenki.

W ramach realizacji projektu naukowego pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Bartosza „Mechanizmy działania, interakcje i efektywność działania przeciwutleniaczy w układach bezkomórkowych i na poziomie komórkowym” (COST B35 Grant-in-aid numer 83/N-Cost/2007/0, MNiSW, projekt międzynarodowy niewspółfinansowany (PMN) w ramach COST B35 European Concerted Research Action B35: Lipid peroxidation associated disorders), powstało pięć prac eksperymentalnych z moim udziałem (prace opublikowane w *Redox Report* (trzy prace), *Fungal Genetics and Biology* oraz *Cellular and Molecular Biology Letters*).

W pracy zatytułowanej „Application of a YHB1-GFP reporter to detect nitrosative stress in yeast” we współpracy z dr Agnieszką Grzelak (Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki) testowano użyteczność konstruktu YHB1-GFP do badania zmian ekspresji białka Yhb1 w wyniku ekspozycji na oksydanty i donory tlenu azotu z zastosowaniem cytometrii przepływowej.

W pracy zatytułowanej „A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress” udokumentowano, iż komórki drożdży pozbawione glutaredoksyny 1 oraz 2 lub glutaredoksyny 5 są nadwrażliwe na selenin i toksyczność ta wynika z generowania reaktywnych form tlenu przez selenin, gdyż w warunkach hipoksji i anoksji wrażliwość ta jest znoszona.

W pracy zatytułowanej „Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*” wykazano, iż jąderko u drożdży może być rozpatrywane, podobnie jak u ssaków, jako sensor stresu oksydacyjnego, gdyż czynnik transkrypcyjny *RRN3* przemieszcza się podczas warunków stresowych z jądra do nukleoplazmy/cytoplazmy, natomiast mutacja punktowa w genie *RRN3* powoduje nadwrażliwość na oksydanty, a przywrócenie funkcjonalności genu *RRN3*, suplementacja antyoksydantami oraz anoksja znosi nadwrażliwość na oksydanty. W pracy zatytułowanej „Antioxidant properties of carnitine *in vitro*” badano właściwości antyoksydacyjne karnityny *in vitro* i udokumentowano, iż karnityna wykazuje aktywność antyoksydacyjną w teście z ABTS, chroni fluoresceinę przed utlenieniem przez rodniki nadtlenkowe oraz nadtlenoazotyn, chroni grupy tiolowe przed utlenieniem przez nadtlenek wodoru, rodniki nadtlenkowe, nadtlenoazotyn oraz podchloryn, a także chroni erytrocyty przed hemolizą indukowaną przez rodniki nadtlenkowe oraz podchloryn.

Natomiast w pracy zatytułowanej „Changes of markers of oxidative stress during menstrual cycle”, która powstała w wyniku współpracy z Prof. dr hab. Agatą Karowicz-Bilińską (Uniwersytet Medyczny, Łódź), porównano poziom nadtlenu wodoru oraz substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), dwóch markerów stresu oksydacyjnego, w moczu dwunastu zdrowych kobiet w trakcie cyklu menstruacyjnego i wykazano wyższy poziom obu biomarkerów w fazie lutealnej cyklu, co może być skorelowane ze stężeniem estrogenów o działaniu antyoksydacyjnym w trakcie cyklu menstruacyjnego.

W pracy zatytułowanej „Total anti-oxidant capacity of cell culture media” dokonano porównania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej podłoży hodowlanych stosowanych do hodowli komórek ssaczych, drożdżowych i bakteryjnych dwoma niezależnymi metodami, a także dowiedziono, iż cysteina, tyrozyna, tryptofan oraz czerwień fenolowa jako składniki tychże podłoży mogą być istotnymi czynnikami decydującymi o zdolnościach antyoksydacyjnych podłoży hodowlanych.

W pracy zatytułowanej „The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes *in vitro*” wykazano ochronne działanie przeciwutleniaacza tempolu wobec limfocytów ludzkich traktowanych jonami kadmu oraz chromu (działanie anti-apoptotyczne oraz anti-genotoksyczne). Niemniej jednak, w wyższych stężeniach tempol okazał się cytotoksyczny i wywoływał efekt klastogenny.

W pracy zatytułowanej „Oxidant-induced decrease of NORs expression in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress” udokumentowano, iż oksydanty nadtlenu wodoru oraz AAPH mogą powodować obniżenie aktywności jądrotwórczej w świńskich limfocytach i zaproponowano, iż spadek ekspresji NORs może być rozpatrywany jako kolejny biomarker stresu oksydacyjnego.

W pracy zatytułowanej „Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*” udokumentowano, iż ekstrakt herbaty yerba mate może wywierać efekt cytotoksyczny oraz genotoksyczny wobec ludzkich limfocytów hodowanych *in vitro* oraz, że kofeina, jako składnik ekstraktu herbaty yerba mate występujący w nim w wysokim stężeniu, może być odpowiedzialna za obserwowane efekty.

W pracy zatytułowanej „*Helicobacter pylori* *cagA* gene polymorphism affects the total antioxidant capacity of human saliva” przebadano 102 próbki śliny ludzkiej w kontekście obecności DNA *Helicobacter pylori* (fragmenty genów *ureA* oraz *cagA*) i skorelowano uzyskane wyniki z całkowitą zdolnością antyoksydacyjną śliny. Materiał *ureA-/cagA-* charakteryzował się wyższą całkowitą zdolnością antyoksydacyjną w porównaniu do materiału *ureA+/cagA-* oraz *ureA+/cagA+*, co świadczy o tym, iż obecność cytotoksyn *Helicobacter pylori* w ślinie może obniżać jej całkowitą zdolność antyoksydacyjną.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

1. **Lewińska A**, Żebrowski J, Duda M, Górka A, Wnuk M. 2015. Fatty Acid Profile and Biological Activities of Linseed and Rapeseed Oils. *Molecules*. Dec 21;20(12):22872-80. IF₂₀₁₅ = 2.465. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 30.
2. Górka M, Kuban-Jankowska A, Żmijewski MA, Marino Gammazza A, Cappello F, Wnuk M, Gorzynik M, Rzeszutek I, Dąca A, **Lewińska A**, Woźniak M. 2015. DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as

an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol. *Oncotarget*. Jun 20;6(17):15449-63. IF₂₀₁₅ = 5.008. Punkty MNiSW₂₀₁₅ = 40.

3. Lewińska A, Adamczyk J, Pająk J, Stokłosa S, Kubiś B, Pastuszek P, Słota E, Wnuk M. 2014. Curcumin-mediated decrease in the expression of nucleolar organizer regions in cervical cancer (HeLa) cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Sep 1;771:43-52. IF₂₀₁₄ = 2.415. Punkty MNiSW₂₀₁₄ = 25.
4. Siwak J, Lewińska A, Wnuk M, Bartosz G. 2013. Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications. *Food Chemistry*. Nov 15;141(2):1227-41. IF₂₀₁₃ = 3.259. Punkty MNiSW₂₀₁₃ = 40 - autor korespondujący.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Lewińska A, Wnuk M, Grzelak A, Bartosz G. 2010. Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep*. 15(2):87-96. IF₂₀₁₀ = 1.514. Punkty MNiSW₂₀₁₀ = 20 - autor korespondujący.
2. Solarska K, Lewińska A, Karowicz-Bilińska A, Bartosz G. 2010. Antioxidant properties of carnitine *in vitro*. *Cell Mol Biol Lett*. 15(1):90-7. IF₂₀₁₀ = 1.455. Punkty MNiSW₂₀₁₀ = 20.
3. Wnuk M, Myszka A, Lewińska A, Tokarz I, Solarska K, Bartosz G. 2010. *Helicobacter pylori cagA* gene polymorphism affects the total antioxidant capacity of human saliva. *Helicobacter*. Feb;15(1):53-7. IF₂₀₁₀ = 3.109. Punkty MNiSW₂₀₁₀ = 27.
4. Wnuk M, Lewińska A, Oklejewicz B, Bugno M, Słota E, Bartosz G. 2009. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Sep-Oct;679(1-2):18-23. IF₂₀₀₉ = 2.552. Punkty MNiSW₂₀₀₉ = 24.
5. Karowicz-Bilińska A, Płodzidym M, Król J, Lewińska A, Bartosz G. 2008. Changes of markers of oxidative stress during menstrual cycle. *Redox Rep*. 13(5):237-40. IF₂₀₀₈ = 2.013. Punkty MNiSW₂₀₀₈ = 15.
6. Lewińska A, Bartosz G. 2008. A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress. *Fungal Genet Biol*. Aug; 45(8):1182-7. IF₂₀₀₈ = 3.005. Punkty MNiSW₂₀₀₈ = 24 - autor korespondujący.
7. Lewińska A, Grzelak A, Bartosz G. 2008. Application of a YHB1-GFP reporter to detect nitrosative stress in yeast. *Redox Rep*. 13(4):161-71. IF₂₀₀₈ = 2.013. Punkty MNiSW₂₀₀₈ = 15 - autor korespondujący.
8. Wnuk M, Lewińska A, Bugno M, Bartosz G, Słota E. 2008. Oxidant-induced decrease of NORs expression in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. May 31; 653(1-2):124-9. IF₂₀₀₈ = 2.363. Punkty MNiSW₂₀₀₈ = 24.
9. Lewińska A, Wnuk M, Słota E, Bartosz G. 2008. The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. Jan 8; 649: 7-14. IF₂₀₀₈ = 2.363. Punkty MNiSW₂₀₀₈ = 24 - autor korespondujący.
10. Lewińska A, Wnuk M, Słota E, Bartosz G. 2007. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Aug; 34(8):781-6. IF₂₀₀₇ = 2.038. Punkty MNiSW₂₀₀₇ = 15 - autor korespondujący.
11. Lewińska A, Bartosz G. 2007. Protection of yeast lacking the Ure2 protein against the toxicity of heavy metals and hydroperoxides by antioxidants. *Free*

- Radic Res.* May; 41(5):580-90. IF₂₀₀₇ = 2.925. Punkty MNiSW₂₀₀₇ = 20 - **autor korespondujący**.
12. **Lewińska A**, Bartosz G. 2006. Yeast flavohemoglobin protects against nitrosative stress and controls ferric reductase activity. *Redox Rep.* 11(5):231-9. IF₂₀₀₆ = 1.593. Punkty MNiSW₂₀₀₆ = 15 - **autor korespondujący**.
13. **Lewińska A**, Biliński T, Bartosz G. 2004. Limited effectiveness of antioxidants in the protection of yeast defective in antioxidant proteins. *Free Radic Res.* Nov; 38(11):1159-65. IF₂₀₀₄ = 2.744. Punkty MNiSW₂₀₀₄ = 16.

Ama Lewińska