

Izabela Młynarczuk-Biały
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny

AUTOREFERAT

Warszawa, 2018

1. **Imię i nazwisko:** Izabela Młynarczuk-Biały

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

1995-2001 studia na II Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
Dyplom lekarza nr: L.2842/31473/2001

W tym:

1996-2001 członek Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Histologii Embriologii pod opieką naukową dr Jana Lamprechta (patogeneza celiakii) a od 1998 pod opieką dr Cezarego Wójcika (pionierskie prace w dziedzinie biologii proteasomów w ramach grantu KBN dr Wójcika).

1998-2001 członek a następnie przewodnicząca Koła Naukowego przy Zakładzie Immunologii pod opieką dr Wojciecha Feleszko (badanie roli statyn w biologii nowotworów) i profesora Witolda Laska (rola TNF w biologii nowotworów) oraz dr Jakuba Gołęba (charakterystyka TRAIL i TNF w modelu białaczek).

1999-2001 członek Koła Pediatrycznego przy Klinice Gastroenterologii i Żywienia Dzieci – pionierskie badania kliniczne surowicy dzieci z celiakią i oznaczania w niej poziomu tkankowej transglutaminazy tTG (dr Piotr Dziechciarz).

2004 **doktor nauk medycznych**, nadany przez Radę Naukową Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie, na podstawie rozprawy doktorskiej pt.:
Badanie przeciwnowotworowego działania cytokin nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF oraz TRAIL) w połączeniu z inhibitorami wybranych proteaz wewnątrzkomórkowych w modelu białaczek ludzkich *in vitro*. Obrona z wyróżnieniem.
Promotor: dr hab. n. med. Jakub Gołąb;
recenzenci: prof. dr hab. n. med. Maria Wąsik; dr hab. n. med. Danuta Duś

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2001-2002 – Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Warszawa - staż podyplomowy

2001-2002 Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie, asystent

od 2005 Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, adiunkt

2013-2018 – Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, ul Banacha 1, Warszawa szkolenie specjalizacyjne z medycyny rodzinnej. Szkolenie zakończone.

Staż zagraniczne

2000-2001 Studia medyczne (1 semestr) na Heinrich Heine Univeristät, Düsseldorf, Niemcy w ramach programu SOCRATES/ERASMUS. Udział w grantie klinicznym finansowanym ze środków Unii Europejskiej – **Badanie skuteczności przeciwciała anty CD20 (Rituximab) w leczeniu chłoniaków nieziarniczych (Blood 2001, Appendix, Publikacja K1).**

2002-2005 Staż naukowy w Instytucie Biochemii Szkoły Medycznej Charité w Berlinie w ramach stypendium DAAD, EMBO, UICC i Charité
Funkcja proteasomu w czerniakach

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Wewnątrzkomórkowe układy proteolityczne jako punkt uchwytu terapii

a) (autor/autorzy, tytuł./tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H1. **Młynarczuk-Biały I.**, Roeckmann H., Kuckelkorn U., Schmidt B., Umbreen S., Golab J., Ludwig A., Montag C., Wiebusch L., Hagemeyer C., Schadendorf D., Kloetzel P.M. and Seifert U. Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Research*. 2006;66:7598-7605.

IF: 7,656, MNiSW: 24

H2. **Młynarczuk-Biały I.**, Doeppner T.R., Golab J., Nowis D., Wilczynski G.M., Parobczak K., Wigand M.E., Hajdamowicz M., Biały L.P., Aniolek O., Henklein P., Bahr M., Schmidt B., Kuckelkorn U. and Kloetzel P.M. Biodistribution and efficacy studies of the proteasome inhibitor BSc2118 in a mouse melanoma model.

Translational Oncology. 2014;7:570-579.

IF: 2,884, MNiSW: 25

H3. Doeppner T.R., **Młynarczuk-Biały I.**, Kuckelkorn U., Kaltwasser B., Herz J., Hasan M.R., Hermann D.M. and Bahr M. The novel proteasome inhibitor BSc2118 protects against cerebral ischaemia through HIF1a accumulation and enhanced angiogenesis. *Brain*. 2012;135:3282-3297.

IF: 9,915, MNiSW: 50

H4. **Młynarczuk-Biały I.** Enigmatic tripeptidylpeptidase II - protease for special tasks. *Postępy Biologii Komórki*. 2008;35:427-439.

MNiSW: 9

H5. Biały Ł. and **Młynarczuk-Biały I.** (2007). General aspects of ubiquitin proteasome system in the mature central nervous system. In: *The ubiquitin proteasome system in the central nervous system: From physiology to pathology* Di Napoli M. and Wójcik C. (eds). Nova Science Publishers, Incorporated. pp 373-391.

RAZEM IF: 20, 455 MNiSW: 108

b) Omówienie celów naukowych ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Charakterystyka układu ubikwityna-proteasom

Białka, oprócz lipidów i węglowodanów, stanowią główny budulec organizmów żywych a ich prawidłowy metabolizm to jest synteza i proteoliza warunkują właściwe funkcjonowanie każdej komórki. We wszystkich kompartmentach komórki proteoliza zachodzi nieustannie, służąc wielu zadaniom - od usunięcia niektórych sekwencji aminokwasowych z białek do kompletnej hydrolizy łańcuchów polipeptydowych. Procesy wewnątrzkomórkowej proteolizy można ująć w dwie grupy - lizosomalne i pozalizosomalne. Głównym elementem pozalizosomalnej degradacji białek jest układ ubikwityna-proteasom odkryty w latach osiemdziesiątych XX wieku. Proteasom jest samokompartementującym się układem proteolitycznym o masie około 2,5 MDa, zbudowanym z rdzenia 20S i czapki 19S. Struktura i funkcja proteasomu jest wiernie zachowana ewolucyjnie. Rdzeń proteasomu stanowią 4 pierścienie ułożone w stos; dwa zewnętrzne pierścienie alfa i dwa wewnętrzne pierścienie beta. Każdy pierścień zawiera siedem globularnych podjednostek nazwanych odpowiednio α 1-7 i β 1-7. We wnętrzu stosu znajduje się kanał w którego środkowym rejonie znajduje się komora proteolityczna zawierająca sześć aktywności proteolitycznych utworzonych przez trzy (β 1, β 2 i β 5) spośród siedmiu podjednostek każdego z pierścieni β . Aktywności proteolityczne proteasomu wykazujące optimum działania w fizjologicznym zakresie pH cytoplazmy nazywa się odpowiednio:

- aktywnością chymotrypsynopodobną (ChTL), jeżeli hydrolizuje wiązania peptydowe po karboksylowej stronie hydrofobowej reszty aminoacylowej,
- trypsynopodobną, (TL) jeżeli hydrolizuje wiązania peptydowe po karboksylowej stronie zasadowej reszty aminoacylowej,

- lub kaspazo-podobną (PGPH) jeżeli hydrolizuje wiązania po karboksylowej stronie kwaśnej reszty aminoacylowej.

Fakt iż proteasom zawiera nie jedną ale co najmniej trzy różne aktywności proteolityczne jest ewenementem w rodzinie klasycznych enzymów proteolitycznych.

Proteasom jest kompleksem odpowiedzialnym za degradację większości białek w komórkach. Białka przeznaczone do degradacji muszą być uprzednio połączone z ubikwityną w procesie ubikwitynacji. Cały proces ubikwitynacji jest regulowany przez szereg enzymów regulatorowych (E1, E2, E3) oraz wymaga dostarczenia energii z hydrolizy ATP. Częsteczka ubikwityny ulega najpierw aktywacji z wytworzeniem wysokoenergetycznego wiązania tiolestrowego pomiędzy ubikwityną a enzymem aktywującym ubikwitynę, E1. Enzym koniugujący ubikwitynę (E2) przechwytuje tak aktywowaną ubikwitynę, która przy udziale ligazy ubikwityny (E3) przyłącza ubikwitynę do substratu. Sygnałem do degradacji przez proteasom jest przyłączenie co najmniej 4 cząsteczek ubikwityny. Poliubikwitynowany substrat jest rozpoznawany przez podjednostkę regulatorową 19S, następnie dzięki aktywności ATP-azowej pierścieni alfa, łańcuch degradowanego peptydu ulega wyprostowaniu. Substrat w tej formie w komorze proteolitycznej jest cięty do oligopeptydów o długości łańcucha od 4 do 75 aminokwasów, które są najprawdopodobniej degradowane przez inne proteazy wewnątrzkomórkowe (tj. TPPII, kalpaina) aż do pojedynczych aminokwasów. Odległość pomiędzy aktywnymi miejscami proteolitycznymi w obrębie pierścienia β umożliwia powstawanie produktów o określonej długości. Najczęściej powstają okta- i nona peptydy – które są źródłem antygenów prezentowanych przez cząsteczki MHC kl I.

Aby białka zostały wyznaczone do degradacji przez proteasom, muszą mieć sekwencje sygnalizujące degradację białek. Do takich sekwencji zalicza się tak zwane - box destrukcji cyklin, oraz box delta białka c-Jun. Degradacji ulegają także te białka, które zawierają

aminokwasy destabilizujące na końcu aminowym lub też ulegną fosforylacji jak np. białko I κ B α . Po związaniu poliubikwitynowanego substratu z aktywatorem 19S następuje jego degradacja w komorze proteasomu 20S, a ubikwityna jest regenerowana przy udziale hydrolazy ubikwityny.

Fizjologiczne aspekty układu proteasom-ubikwityna w komórce badano między innymi stosując specyficzne substancje blokujące aktywności enzymatyczne proteasomów, a zwłaszcza aktywności chymotrypsynopodobnej. Aktywność chymotrypsynopodobna jest niezwykle istotna w procesie degradacji białek a jej blokowanie lub delecja podjednostki odpowiadającej za tą aktywność jest letalna. Ja w moich badaniach stosowałam inhibitor PSI, MG132, bortezomib i BSc2118 (**H1-H3, P2-4, P11-12, P14**).

Zablokowanie aktywności proteasomu w komórce powoduje nagromadzenie poliubikwitynowanych białek, może wywoływać stres siateczki śródplazmatycznej i kierować proteolizę na szlak autofagii, może indukować proces programowej śmierci komórki – apoptozę, a poprzez hamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B nasilać śmierć komórek nowotworowych i mieć działanie przeciwzapalne. Ponadto inhibitory proteasomów hamując degradację cyklin, wywołują blok w cyklu komórkowym, zmniejszają prezentację niektórych antygenów i zapobiegają degradacji mięśni w stanach ze zwiększonym katabolizmem. Większość szlaków sygnałowych kluczowych w procesie onkogenezy, jest regulowana przez proteasom. Aktywacja białka p53, włączanie szlaku WNT- β katenina, degradacja większości cyklin, rozdział siostrzanych chromatyd przy podziale komórki i aktywacja szlaku promującego przeżycie komórki nowotworowej tj. szlaku NF- κ B - to tylko niektóre przykłady procesów warunkowanych prawidłowym działaniem układu proteasom-ubikwityna. Dlatego zahamowanie zależnej od proteasomu degradacji białek działa cytostatycznie/cytotoksycznie na komórki nowotworowe.

Badania budowy i funkcji proteasomu i odkrycie jego roli w biologii nowotworów skutkowało wdrożeniem pierwszego inhibitora proteasomów (bortezomibu) do praktyki klinicznej oraz uhonorowaniem nagrodą Nobla z chemii (2004 rok) odkrywców ubikwityno-zależnej degradacji białek. Uhonorowani zostali Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Irvin Rose.

Charakterystyka TPPII i kalpainy

Trójpeptydylpeptydaza druga jest obok proteasomu drugim poznanim samokompartmentującym się układem proteolitycznym w komórce. Trójpeptydylpeptydaza druga (TPPII, E.C.3.4.14.10) jest enzymem występującym w cytoplazmie i jako forma związana z błoną komórkową. Enzym ten jest obecny tylko w komórkach eukariotycznych, organizmy prokariotyczne mają analog TPPII, proteazę trikorn. TPPII po raz pierwszy została odkryta w 1983 roku jako pozalizosomalna peptydaza w wątrobie szczura. Natywna forma TPPII jest białkiem o dużej masie cząsteczkowej, złożonym z ośmiu podjednostek o długości 6,5 nM i masie 138 kDa. Całość kompleksu ma wymiary 50 x 20 nm i masę $5-9 \times 10^3$ kDa. Analiza krystalograficzna struktury TPPII wykazała, że peptydaza ta, podobnie jak proteasom 20S, tworzy strukturę wyższego rzędu, kształtu cylindrycznego z kanałem w środku, w którym znajdują się miejsca obdarzone aktywnością proteolityczną. Monomery i dimery TPPII nie wykazują aktywności proteolitycznej lub jest ona niewielka w porównaniu z całym kompleksem. Oligomery wykazują dziesięciokrotnie większą aktywność (**H4**).

Kalpainy to obojętne proteazy, podobne do papainy, aktywowane jonami wapnia. Są one powszechne w komórkach zarówno niższych jak i wyższych organizmów. Typowe kalpainy są hetero dimerami składającymi się z dużej podjednostki katalitycznej o masie 80 kDa i małej regulatorowej o masie 28 kDa. Podjednostki są połączone domeną PEF. Najbardziej znane i zbadane są kalpainy μ i m . Kalpainy wymagają mikro i milimolarnych stężeń jonów wapnia do ich aktywacji. Jednak wchodząc w reakcję z fosfolipidami błon

komórkowych i trawami lipidowymi ich powinowactwo do jonów wapnia znacznie wzrasta. Wtedy kalpajany mogą ulec aktywacji nawet w stężeniach nanomolarnych jonów wapnia, jakie fizjologicznie występują w cytoplazmie komórek niepobudzonych. Kalpajany są zaangażowane w śmierć z przestymulowania neuronów, jak również w procesy apoptozy i autofagocytozy oraz w stres siateczki śródplazmatycznej. Jednak uważa się, że kalpajany odgrywają raczej nie proteolityczną rolę w komórce, a regulatorową. Wykazano, że inhibitory kalpajany zmniejszają obszar udaru w eksperymentalnym modelu udaru u szczurów.

Narzędzia badawcze układu ubikwityna-proteasom

Mój okres stażu naukowego w Berlinie to intensywne szkolenie zarówno w zakresie wiedzy teoretycznej - bardzo zaawansowanej i na najwyższym światowym poziomie, jak i trening metod badawczych służących badaniu układu ubikwityna-proteasom.

W tym okresie poznałam przyszłego noblistę Arona Ciechanovera z Haify, oraz człowieka który jako jeden z pierwszych opisał proteasom, profesora Alfreda Goldberga z Harvardu. Miałam okazję w gronie noblistów i osób z nimi współpracujących dyskutować na tematy związane z biologią proteasomów, oraz czerpać inspiracje do dalszych badań.

Realizując temat badawczy „rola proteasomów w czerniakach”, między innymi nauczyłam się: oczyszczać proteasom 20S, inkubować natywny proteasom z dedykowanymi oligopeptydami i badać produkty degradacji w systemie MALDI-TOF-TOF, znakować radioaktywną metioniną proteasom 20S, następnie w analizie 2D Western-blot oceniać wbudowywanie podjednostek immunoproteasomu. Ponadto opanowałam technikę Northern-blot i hybrydyzację z sondą znakującą RNA dla podjednostki immunoproteasomu, transfekcję komórek z wbudowaniem DNA dla podjednostek immunoproteasomu, technikę radioaktywną i nie radioaktywną wykonania testu EMSA z sondą wykrywającą czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Podsumowując, nauczyłam się większości nowoczesnych metod stosowanych w badaniu

biologii proteasomów w gronie czołowych w tej dziedzinie badaczy. W Polsce ta tematyka jest reprezentowaną przez niewielką grupę naukowców, których większość pracuje w laboratoriach poza granicami Polski.

Odkrycie nowego inhibitora proteasomów BSc2118

Mój opiekun naukowy - profesor Peter Kloetzel wraz z profesorem Borysem Schmidtem z politechniki w Darmstadt zaprojektowali syntezę peptydomimetyków - analogów znanego inhibitora proteasomu MG132. Znając biologię proteasomów oraz metody badania substancji chemicznych w żywych komórkach, podjęłam się zbadania zsyntetyzowanych związków *in vitro* i *in vivo*. Testy przeze mnie przeprowadzone wykazały, że substancje silnie i efektywnie blokujące aktywność natywnego, wyekstrahowanego proteasomu *in vitro*, nie zawsze wnikały do żywych komórek. Natomiast związki mniej efektywne *in vitro*, skutecznie zabijały nowotworowe komórki raka szyjki macicy linii HeLa i czerniaka złośliwego linii MeWo. Dzięki uzyskanym przeze mnie obiecującym wynikom wstępnych analiz, twórcy nowych syntez zdecydowali się opatentować syntezę i strukturę nowej cząsteczki najbardziej aktywnej *in vivo* i nazwanej od nazwiska prof. Schmidta BSc2118 (numer patentu EU i USA: T30305). Jednocześnie wyniki moich eksperymentów charakteryzujących BSc2118 ukazały się w Journal of Biological Chemistry (**P12**). Wykazałam, że BSc2118 wywołuje blok w cyklu komórkowym oraz ma działanie cytostatyczne/cytotoksyczne wobec komórek linii ludzkiego czerniaka MeWo. Ponadto udowodniłam, że BSc2118 działa silniej i bardziej efektywnie od macierzystego MG132.

BSc2118 w modelu komórek opornych na cis platynę

Streszczenie pracy: Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells, Cancer Research (H1)

W następnym etapie podjęłam się systematycznych badań nad układem ubikwityna-proteasom, kalpainą i trójpeptydylpeptydazą drugą (TPPII) w modelu komórek czerniaka linii MeWo wrażliwych i opornych na cisplatynę (**H1**). Już w pierwszych testach żywotności wykazałam, że komórki oporne na cisplatynę są też względnie oporne na działanie nowego inhibitora proteasomów BSc2118. Działo się tak mimo, iż w zaprojektowanym przeze mnie teście proteasom w obu liniach był zablokowany efektywnie w takim samym stopniu zarówno w krótkim czasie od podania leków, jak i po kilku godzinach inkubacji. Wykazałam, że inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, białko I κ B α , normalnie degradowany przez proteasom - w komórkach opornych jest dalej degradowany - mimo efektywnego zablokowania proteasomu. W komórkach wrażliwych na cisplatynę stopień zablokowania proteasomu, zgodnie z oczekiwaniem, korelował ze stabilizacją sygnału dla I κ B α .

Następnie zbadalam poprzez ekstrakcję i sekwencjonowanie RNA z komórek MeWo i MeWo_{cis}, czy mRNA dla I κ B α nie jest zmienione w komórkach opornych – ale nie wykazałam różnic w ekspresji tej cząsteczki we wrażliwych i niewrażliwych komórkach. Skupiłam się zatem na poszukiwaniach enzymu degradującego I κ B α w komórkach z zablokowanym proteasomem w których mimo to dochodzi do degradacji białka I κ B α i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Ponieważ TPPII była znana jako proteaza mogąca zastępować funkcję proteasomu, zbadalam czy dodatkowe blokowanie TPPII zapobiega degradacji I κ B α . Jednak nie wykazałam roli TPPII w tym procesie. Innym potencjalnym enzymem mogącym zastąpić proteasom jest kalpaina. Wykazałam, że zablokowanie kalpaina w komórkach opornych skutecznie zapobiegało zarówno degradacji I κ B α jak i aktywacji NF- κ B (test EMSA). Ponadto, dodanie do hodowli inhibitora kalpaina uwrażliwiało oporne na cisplatynę komórki zarówno na działanie cisplatyny jak i inhibitorów proteasomów. Wykazałam w autorskich zaprojektowanych przeze mnie testach, że przy jednakowej liczbie komórek i zawartości białka w lizacie, kalpaina jest 6x bardziej aktywna w

komórkach opornych w porównaniu do wrażliwych (**H1**). Dokonałam odkrycia wykazującego w komórkach nowotworowych możliwość przesunięcia w szlakach degradacji białek jako przyczynę oporności na chemioterapię lub terapię celowaną. Ponadto, po raz pierwszy wykazałam, że wzrost aktywności kalpajny uczestniczy w mechanizmie oporności wielolekowej. Wiedza na ten temat może przyczynić się do lepszej diagnostyki wraz z typowaniem tych guzów, w których doszło do przesunięcia w szlakach sygnałowych i mieć implikacje kliniczne w postaci bardziej celowanej i spersonalizowanej terapii choroby nowotworowej.

Odkrycie to nie byłoby możliwe bez mojej wcześniejszej pracy naukowej na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w zakresie biologii nowotworów. Powyższe badania zostały opublikowane w pracy pt: **Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells** w *Cancer Research* (**H1**).

Charakterystyka przedkliniczna BSc2118

Streszczenie pracy: Biodistribution and Efficacy Studies of the Proteasome Inhibitor BSc2118 in a Mouse Melanoma Model (H2)

Jako lekarz zainteresowany aspektami klinicznymi badanych wątków naukowych, postanowiłam podjąć się systematycznej charakterystyki przedklinicznej nowego inhibitora BSc2118. W pracy w *Translational Oncology* pt.: **Biodistribution and Efficacy Studies of the Proteasome Inhibitor BSc2118 in a Mouse Melanoma Model (H2)** całościowo scharakteryzowałam farmakokinetyczne i farmakodynamiczne właściwości BSc2118 w modelu zwierzęcym. Ponadto zbadalam efekty przeciwnowotworowe nowego i stosowanego klinicznie inhibitora proteasomów w modelu 20 linii komórkowych *in vitro*. Wyznaczyłam krzywe pokazujące efektywność obu inhibitorów. W pracy w *Translational Oncology* (**H2**) wykazałam po raz pierwszy, że BSc2118 tak samo efektywnie jak bortezomib blokuje

proteasom, a różnice w stężeniach stechiometrycznych i konieczność stosowania 10x większych stężeń BSc2118 niż bortezomibu wynikają z różnicy wartości stałych inhibicji proteasomu 20S przez oba związki. Wykazałam też w modelu zwierzęcym, że BSc2118 skutecznie blokuje proteasom w erytrocytach krwi obwodowej i tkance guza w sposób zależny od drogi podania. Lokalna iniekcja (doguzowa) blokowała w 100% aktywność proteasomu 20S w tkance nowotworowej i w 60% w erytrocytach. Iniekcja dootrzewnowa BSc2118 w 80% blokowała aktywność 20S w erytrocytach i w 70% w tkankach guza. Po 24h od podania doguzowego wciąż 90% aktywności 20S w guzie było zablokowane, a we krwi obwodowej stwierdzono około 50% aktywności 20S. Po 24h od podania dootrzewnowego nie stwierdzono zahamowania aktywności proteasomu w tkance guza, a we krwi obwodowej wciąż 40% aktywności tej proteazy było zablokowane (**H2**). Dlatego biodystrybucję inhibitora w tkankach zwierzęcych badano po podaniu dootrzewnowym, a wzrost guza monitorowano stosując lokalne iniekcje BSc2118. Badając kinetykę i biodystrybucję BSc2118 wykazałam, że wszystkie badane narządy wewnętrzne po 1h od iniekcji inhibitora mają zablokowany proteasom w ok. 90%, a aktywność proteasomu po 24h od podania jednorazowej dawki inhibitora wraca do wartości wyjściowej. Wyjątkiem od tej reguły są tkanki mózgu, gdzie wykazałam, że proteasom jest nieistotnie zablokowany po 1h od iniekcji a po 24 h obserwowano około 10 % wzrost inhibicji proteasomu. Wykazałam, że w porównaniu do klinicznie stosowanego bortezomibu, ekwipotencjalne dawki BSc2118 były tak samo skuteczne w blokowaniu proteasomu 20S *in vivo*. Ponadto udowodniłam, że nowy inhibitor jest 3 x mniej toksyczny od bortezomibu, gdyż codzienne iniekcje z BSc2118 w dawce 30mg/kg m.c. przez 7 dni nie wywołały żadnych objawów toksycznych. Dla przypomnienia, dawka bortezomibu 1mg/kg m.c. – odpowiadająca 10mg/kg BSc2118- podawana codziennie myszom jest dawką letalną. Ponadto stosując BSc2118 w modelu

czerniaka wykazałam całkowitą remisję u 30% badanych zwierząt i nie obserwowałam wznowy przez okres obserwacji trwający 2 miesiące.

Na potrzeby badania biodystrybucji BSc2118, zamówiłam syntezę cząsteczek BSc2118 znakowanych małą grupą fluorescencyjną Bodipy (tak powstały związek nazwano BSc2118-FL). Następnie określiłam stabilność tej cząstki, oraz zakres stężeń nietoksycznych dla badanych komórek, a także efektywność znakowania proteasomu w zależności od dawki i czasu w odniesieniu do znakowania immunofluorescencyjnego proteasomu 20S. Wykazałam, że w stężeniach 0,1 μ M – 1 μ M nowa cząsteczka nie jest toksyczna dla komórek i znakuje w krótkim czasie inkubacji cytoplazmę komórek, a w dłuższym czasie formujące się agregaty białkowe zawierające proteasom i cząsteczki poliubikwitynowanych białek – zwane agresomami. Wykazałam, że cząsteczka BSc2118-FL w stosowanych stężeniach daje jasny i stabilny sygnał w mikroskopie fluorescencyjnym bez autofluorescencji tła i jest użytecznym narzędziem do śledzenia biodystrybucji proteasomów w żywych komórkach. Następnie zbadalam stabilność nowej cząsteczki BSc2118-FL podanej dootrzewnowo gryzoniom oraz jej biodystrybucję w wybranych narządach wewnętrznych po 1h i 24h od iniekcji tej substancji. Wykazałam, że substancja jest stabilna w żywym organizmie i 1h po iniekcji można stwierdzić fluorescencję w erytrocytach krwi obwodowej, w kryptach jelitowych, w nabłonku kanalików nerkowych. Po 24h od iniekcji fluorescencja w wymienionych tkankach jest nieobecna lub jest poniżej poziomu detekcji. Eksperymenty do pracy w Translational Oncology powstały głównie w latach 2004-2008, ale moje plany osobiste i macierzyńskie sprawiły, że praca ukazała się drukiem dopiero w roku 2014.

BSc2118 w eksperymentalnym modelu udaru

Streszczenie prac: The Novel Proteasome Inhibitor BSc2118 Protects against Cerebral Ischaemia through HIF1a Accumulation and Enhanced Angiogenesis (H3)

The Ubiquitin Proteasome system in the Central Nervous System. Tytuł rozdziału: General Aspects of Ubiquitin Proteasome System In the Mature Central Nervous System (H5)

Enigmatyczna tripeptydylpeptydaza II – proteaza do zadań specjalnych (H4)

Projekt charakterystyki przedklinicznej BSc2118 obejmował również badania nad wpływem BSc2118 w eksperymentalnym modelu udaru. Część neurobiologiczna projektu której jestem drugim współautorem ukazała się w Brain w pracy pt.: **The Novel Proteasome Inhibitor BSc2118 Protects against Cerebral Ischaemia through HIF1a Accumulation and Enhanced Angiogenesis (H3)**. W pracy tej wykazaliśmy, że BSc2118 podany dokomorowo myszom (bo jak wynika z pracy **H2** - inne podanie napotka na barierę krew-mózg) chroni tkankę mózgu przed skutkami indukowanego eksperymentalnie udaru. Udar indukowaliśmy poprzez podwiązanie tętnicy szyjnej. Wiadomo, że rozległość udaru to też skutki metaboliczne wyrzutu cytokin prozapalnych stąd badaliśmy też ekspresję czynnika indukowanego hipoksją (HIF). Pierwsza część pracy **H3** zawiera analizę biodystrybucji nowego inhibitora proteasomów analogiczną jak w pracy **H2** wzbogaconą o badanie stabilności i odwracalności nowego inhibitora BSc2118. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie rozpuszczalności nowego inhibitora proteasomów w roztworach hydrofilnych i hydrofobowych. Ustaleniu eksperymentalnie modelu podawania nowego inhibitora proteasomów zwierzętom z analizą stopnia zablokowania proteasomu w komórkach krwi obwodowej i w wybranych tkankach zwierzęcych w tym w tkance mózgu. Analiza polegała na wykonaniu homogenizatów wybranych tkanek i zbadaniu w nich aktywności

proteasomu, oraz wykonaniu Western blotu na białka poliubikwitynowane. Dodatkowo w dopowiedzi na uwagi recenzentów przeprowadziłam badanie toksyczności inhibitora proteasomów BSc2118 w modelu mysim, które polegało na iniekcji zwierząt z badanych grup odpowiednimi dawkami inhibitorów proteasomów i analizie behawioralnej (zachowanie, stan odżywienia, analiza masy ciała, stanu skóry i przewodu pokarmowego), zebraniu krwi obwodowej oraz analizie obrazu krwi obwodowej w odpowiednich punktach czasowych przed i po iniekcji leku – dane z tego eksperymentu znajdują się w rycinie dodatkowej.

Moje zaangażowanie w pracę neurobiologiczną było poprzedzone napisaniem rozdziału w książce monograficznej wydanej w Stanach Zjednoczonych Ameryki pt. **The Ubiquitin Proteasome system in the Central Nervous System. Tytuł rozdziału: General Aspects of Ubiquitin Proteasome System In the Mature Central Nervous System (H5).**

Pracując nad rozdziałem w książce miałam okazję pracować w grupie czołowych badaczy układu ubikwityna-proteasom. Jednym ze współautorów jest prof. Ciechanover – laureat nagrody Nobla. Publikacja była recenzowana a ja zostałam do niej zaproszona przez dr Cezarego Wójcika. Przedstawiłam w niej odrębności układu ubikwityna-proteasom w centralnym układzie nerwowym. Między innymi opisałam odrębności proteolizy przez proteasom w CNS nakierowany na degradację określonych neuroprzekazników i ich kofaktorów. Ponadto opisałam biodystrybucję proteasomu w różnych częściach centralnego układu nerwowego – w komórkach ruchowych rogów przednich rdzenia kręgowego i w neuronach piramidowych 5 warstwy kory mózgu proteasom ma homogenną dystrybucję w cytoplazmie neuronów. W pozostałych częściach w tym w zakręcie gruszkowatym, opuszcze węchowej, korze nowej (poza warstwą 5), ciele migdałowatym, komórkach Purkiniego mózdzku - dominuje silna immunoreaktywność proteasomu 20S w obrębie jądra tych komórek i w słabszym stopniu w obszarach synaptycznych oraz w obszarze okołojądrowym. Następnie zamieściłam dane wskazujące na rolę układu ubikwityna-proteasom w

funkcjonowaniu synapsy, zwłaszcza udział w proteolizie neuroprzekaźników i receptorów w zakończeniach synaptycznych. Ponadto jestem autorem rycin w tej publikacji.

Ostatnia praca składająca się na dzieło to polskojęzyczny artykuł **Enigmatyczna tripeptydylpeptydaza II – proteaza do zadań specjalnych (H4)**. Praca ta stanowi wstęp do badań nad proteolitycznymi układami pozalizosomalnej degradacji białek. Jest to systematyczny przegląd informacji cytofizjologicznych na temat tripeptydyl peptydazy 2. Między innymi opisałam budowę i funkcję TPPII, rolę TPPII w procesie apoptozy, w funkcjonowaniu układu nerwowego i jej potencjalnej roli w patogenezie schizofrenii, w patogenezie otyłości jako enzym inaktywujący cholecystokininę w układzie nerwowym, oraz rolę TPPII w biologii nowotworów i potencjalną rolę inhibitorów TPPII jako leków onkologicznych. Publikacja w Postęпах Biologii Komórki zawiera autorskie ilustracje wyjaśniające rolę TPPII jako wspomagającej działanie układu ubikwityna-proteasom. Pisząc tą pracę zapoznałam się z całą dostępną w tamtych czasach literaturą na temat TPPII, zacytowałam większość prac z tej tematyki i przedstawiłam polskim czytelnikom jasny przegląd roli tej peptydazy w biologii komórki oraz jej potencjalnego udziału w patogenezie chorób nowotworowych i cywilizacyjnych. Od tego czasu ukazało się zaledwie kilkanaście nowych anglojęzycznych pełnotekstowych publikacji na temat TPPII. Praca ta stanowi ciągle znakomite uzupełnienie wiedzy na temat biologii cytoplazmatycznych proteaz w literaturze polskojęzycznej i stanowi mój wkład w promocję wiedzy niszowej i specjalistycznej w języku ojczystym. Jest to tekst napisany językiem przystępnym i zrozumiałym, mogący stanowić znakomite źródło wiedzy dla młodych doktorantów i magistrantów zaczynających pracę z tą tematyką.

Podsumowanie

1. Odkrycie - zależnego od kalpajny mechanizmu aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B jako mechanizmu oporności komórek nowotworowych na działanie inhibitorów proteasomów. Praca nr H1. Dodatkowo wykazałam, że zablokowanie kalpajny uwrażliwia komórki czerniaka na cytostatyczne/cytotoksyczne działanie inhibitora proteasomów.

2. Opracowanie kompleksowej metodologii badania aktywności proteasomu oraz farmakokinetyki i farmakodynamiki inhibitora proteasomów BSc2118 w modelu mysim. Praca nr H2. Uzyskana metodologia może być wykorzystana do badań nad innymi inhibitorami proteasomów tym bardziej, że już w zastosowaniu klinicznym są inhibitory proteasomów drugiej generacji i rynek syntez tych inhibitorów jest wciąż bardzo aktywny.

3. Systematycznie porównałam stopień zablokowania proteasomu, akumulację poliubikwitynowanych białek w wybranych narządach wewnętrznych po iniekcji bortezomibu i BSc2118. Wykazałam, że dawki ekwipotencjalne stosowanego klinicznie bortezomibu i nowego inhibitora BSc2118 dają porównywalne efekty biologiczne w zakresie stosowanych stężeń. Ponadto znacząco mniej toksyczny jest BSc2118. **Prace nr H2 i H3.**

4. Badanie nowatorskiego koniugatu BSc2118 z grupą fluorescencyjną. Znacznik proteasomów *in situ* był stabilny *in vitro* i *in vivo*. W nietoksycznych dla komórek i zwierząt stężeniach znakował proteasom 20S i pozwalał na jego wizualizację oraz prowadzenie obserwacji przyżyciowych *in situ*. Taka cząsteczka stanowi znakomite uzupełnienie metod immunohistochemicznych i jest prostym w zastosowaniu, nowoczesnym narzędziem badawczym proteasomu i efektów jego zablokowania. **Prace nr H2 i H3**

5. Wykazałam, że Bc2118 ma lokalne działanie antynowotworowe w mysim modelu czerniaka i pokazałam, dlaczego lokalne leczenie w tym przypadku ma szansę powodzenia. (praca nr H2) Do tej pory żaden inhibitor proteasomów mimo obiecujących badań przedklinicznych nie był skuteczny w leczeniu guzów litych u ludzi. Wszelkie próby kliniczne były przerywane z powodu braku skuteczności antynowotworowej i akumulacji efektów ubocznych. Wyniki zamieszczone w pracy **H2** stanowią szczegółową analizę, z której

można ekstrapolować uzasadnienie braku skuteczności inhibitorów proteasomów we wspomnianych badaniach klinicznych.

6. Przeprowadziłam analizę biodystrybucji inhibitora BSc2118 w mózgu myszy i analizę toksyczności BSc2118 w modelu zwierzęcym (praca nr H3). Udar prowadzi do nieodwracalnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym. Wszelkie działania zmniejszające rozległość udaru mogą polepszyć stan chorych doznających udaru. W niniejszej pracy inhibitor proteasomów nie tylko zmniejszył istotnie rozległość udaru ale i zapobiegał szkodliwym efektom podania tkankowego aktywatora plazminogenu.

7. Opisałam rolę układu ubikwityna-proteasom (UPS) w dojrzałym centralnym układzie nerwowym (praca nr H5). Ze szczególnym uwzględnieniem regulacji przez UPS dystrybucji neuroprzekazników i ich receptorów oraz funkcji UPS w komórkach glejowych i neuronach.

8. Przedstawiłam budowę i rolę TPPII w biologii komórki i w chorobach nowotworowych oraz cywilizacyjnych (praca H4). Jest to praca poglądowa wyczerpująco charakteryzująca TPPII i implikacje kliniczne procesów regulowanych przez TPPII.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Poza powyższym cyklem prac, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, w mojej pracy badawczej zajmowałam się przede wszystkim tematyką związaną z biologią nowotworów, biologią układu ubikwityna-proteasom, oraz wdrożeniem systemów badania potencjalnych leków przeciwnowotworowych w modelu komórkowym. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych.

Poniżej zamieszczam omówienie najistotniejszych zagadnień zawartych w publikacjach, nie wchodzących w skład cyklu stanowiącego osiągnięcie. Prace zostały pogrupowane zgodnie z tematyką poruszanych zagadnień i są oznaczone numerami nadanymi w załączniku nr 4 pt. **Wykaz dorobku naukowego.**

Patogeneza celiakii

Od pierwszego roku studiów medycznych, a w zasadzie od czasów liceum chciałam prowadzić badania naukowe i szukałam zespołu z którym mogłabym nawiązać współpracę. Najpierw trafiłam pod skrzydła dr Jana Lamprechta z Zakładu Histologii WUM. Pod jego kierunkiem zajmowałam się immunohistochemiczną charakterystyką endomyzjum tętnic pępowiny jako narzędzia w diagnostyce celiakii. Między innymi, za pomocą wzorcowej surowicy ESPGHAN (The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) wyznakowaliśmy endomyzjum tętnic pępowiny udowadniając, że antygen zawarty w tej surowicy reaguje z endomyzjum tkanek pępowiny. Do tej pory stosowano skrawki przełyku koczodana. Każde badania z wykorzystaniem zwierząt chronionych powinny mieć swój odpowiednik w bardziej powszechnej tkance. Ludzka pępowina jest łatwiej dostępnym materiałem i to odkrycie stanowiło znaczny jak na owe czasy postęp. W tym okresie napisałam pracę poglądową dotyczącą patogenezy celiakii opublikowaną w Nowej Klinice (M2). Dr Lamprecht zmarł, a ja nawiązałam, współpracę z dr Wojciechem Feleszko.

Badanie modulującego wpływu statyn w biologii nowotworów.

Ta część mojego dorobku dotyczy badań nad wpływem statyn na wzrost i rozwój nowotworów i w modelu *in vitro* i *in vivo*. Statyny są lekami powszechnie stosowanymi przez internistów w leczeniu zaburzeń lipidowych. Biochemicznie statyny są inhibitorami reduktazy hydroksymetyloglutarylo koenzymu A i blokują wątrobową produkcję lipidów. Obniżają w ten sposób poziom endogenego cholesterolu i zapobiegają naczyniowym skutkom hipercholesterolemii w tym udarom i zawałom. Jednak mają one jeszcze inne działanie – wynikające z faktu, iż niektóre cząsteczki sygnałowe np. białka Ras są izoprenylowane, aby zakotwiczyć się w błonie komórkowej. Tylko w takiej formie mogą aktywnie przekazywać sygnał do podziału komórki. Grupy izoprenylowe powstają w tym samym szlaku biosyntezy cholesterolu, którego pierwszy etap jest zależny od aktywności reduktazy hydroksymetyloglutarylo koenzymu A. Dlatego statyny mają działanie antyproliferacyjne wobec komórek nowotworowych a zwłaszcza tych z hiperaktywacją szlaku RAS/Raf/MEK/ERK.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że statyny mają słabe działanie antyproliferacyjne *in vitro*, nasilają w sposób synergistyczny działanie przeciwnowotworowe doksorubicyny i cispaltyny, wywołują apoptozę. W modelu trzech guzów nowotworowych wykazano, że lowastatyna nasila działanie doksorubicyny i zmniejsza jej toksyczny wpływ poprzez działanie kardioprotekcyjnie. Z tej współpracy powstały 3 pełnotekstowe publikacje i jeden

list do redakcji, odznaczające się dobrym współczynnikiem cytowań, co dowodzi ich aktualności i ważności (**P1, P8, P9, L2**).

Układ ubikwityna-proteasom – pionierskie badania

Zaczynając w roku 1997 pracę z tą tematyką – niewielu uczonych znało pojęcie proteasom. Sytuacja zmieniła się diametralnie od roku 2004, kiedy pierwszy inhibitor proteasomów został dopuszczony do praktyki klinicznej oraz przyznano nagrodę Nobla za odkrycie tego systemu degradacji białek.

Tematyką związaną z układem ubikwityna-proteasom zainteresował mnie dr Cezary Wójcik, kiedy jeszcze byłam członkiem Studenckiego Koła naukowego przy Zakładzie Histologii WUM. Dr Wójcik jako pierwszy scharakteryzował tworzące się agresomy w komórkach linii HeLa. Następnie przebywał na stażu naukowym w USA u odkrywców proteasomu profesorów Wilka i Orłowskiego. Dzięki współpracy z dr Wójcikiem poznałam właściwości proteasomu i podstawowe narzędzia do jego badania. Ta współpraca owocowała powstaniem 3 publikacji i jednego listu (**P2, P3, P4, L1**). W pionierskim okresie badań nad biologią proteasomów, skupiłam się głównie na analizie wpływu inhibitorów proteasomu i tripeptydylpeptydazy II na proliferację cykl komórkowy i proces apoptozy w komórkach białaczki U937 [Bury, Młynarczuk et al., 2001 (**P3**)]. Badanie opublikowane w Folia Histochemica et Cytobiologica 2001r zostało zacytowane przez znaną firmę biochemiczną na ulotce produktu AAF-cmk (inhibitor TPPII). Analizowaliśmy też wpływ inhibitora proteasomów PSI na proliferację nowotworowych i nienowotworowych komórek, oraz wykazaliśmy, że komórki nie nowotworowe są mniej wrażliwe na działanie PSI (**P4**). Wykazaliśmy ponadto, że stosowanie kwasu retinowego w kombinacji z inhibitorem proteasomów stymuluje dojrzewanie komórek nowotworowych i może być potencjalnie szkodliwym połączeniem [Wojcik, Młynarczuk et al 2001 - list od redakcji – (**L1**)]. Ponadto wykazaliśmy, że statyny są modulatorami proteasomu (**P2**).

Immunomodulacyjne działanie pochodnych adamantonu w tym jego wpływ na wydzielanie TNF

W ramach mojej współpracy z Zakładem Immunologii WUM powstały jeszcze 4 pełnotekstowe publikacje z zakresu eksperymentalnej terapii nowotworów (**P6, P7, P10, M1**). Obejmowały one charakterystykę pochodnych kwasu masłowego w modelu czerniaka i

po pochodnych adamantanu oraz ich wpływ na wydzielanie Czynnika Martwicy Nowotworów (TNF) przez komórki nowotworowe.

Proteasom i TPPII oraz cytokiny TRAIL i TNF

Jest to cykl prac których jestem pierwszym autorem. Wykazałam, że inhibitor proteasomów nasila działanie nowo odkrytej cytokiny TRAIL w komórkach ludzkiej białaczki U937 w mechanizmie wzmożonej apoptozy [Młynarczuk, 2001 **Anticancer Research (P5)**]. Analogicznie w drugiej pracy wykazałam, że zablokowanie TPPII nasila efekt TRAIL w komórkach linii białaczki poprzez stabilizację białka IκBα. IκBα hamuje jeden z najsilniejszych induktorów proliferacji białaczek: czynnik transkrypcyjny NF-κB [Młynarczuk et al, 2004, **Leukemia Research (P11)**]. Napisałam też polskojęzyczną pracę przeglądową pt.: **Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowania TRAIL w terapii nowotworów (M3)**.

Badania te stały się również podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt.: **Badanie przeciwnowotworowego działania cytokin nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF oraz TRAIL) w połączeniu z inhibitorami wybranych proteaz wewnątrzkomórkowych w modelu białaczek ludzkich in vitro**. W późniejszym czasie inne zespoły wykazały nasienie działania TRAIL przez połączenie z inhibitorem proteasomów; oraz TRAIL był włączony do badań klinicznych – do czego przyczyniły się również moje prace.

Charakterystyka inhibitorów proteasomów w biologii nowotworów

Pierwsza praca charakteryzująca nowy inhibitor proteasomów, BSc2118 ukazała się w *Journal of Biological Chemistry* (**P12**) i zawierała wyniki badań na komórkowych linii czerniaka pokazujące wpływ BSc2118 na żywotność komórek czerniaka jak i na dystrybucję faz cyklu komórkowego, które wykonałam osobiście.

W następnej pracy wykazaliśmy, że inhibitory proteasomów nasilały działanie terapii fotodynamicznej poprzez akumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek [Szokalska et al, **Cancer Research 2009 (P14)**].

Badanie nowo zsyntetyzowanych substancji jako leków przeciwnowotworowych

Cykl dziewięciu prac jest efektem współpracy z chemikami z Politechniki Warszawskiej lub Wydziału Farmacji WUM.

W ramach pierwszej współpracy badano biblioteki związków chemicznych będących peptydomimetykami jako potencjalnych inhibitorów kinaz MEK. W ramach współpracy opracowałam i wystandaryzowałam model badawczy określający wpływ nowych substancji na aktywność kinazy MEK oraz w modelu komórkowym za pomocą Western blot wykazałam, że nowe inhibitory również skutecznie blokują wspomnianą kinazę na terenie komórki. Co oznacza, że przenikają przez błony komórkowe i nie są degradowane przez proteazy w komórce. [**Szymański et al 2014 (P15)**]. Praca była finansowana ze środków grantu KBN, którego byłam kierownikiem.

W ramach współpracy z Wydziałem Farmacji WUM nad nowymi syntezami koordynowałam i nadzorowałam część biologiczną badań. Wykazaliśmy, że galusany nasilają apoptozę w komórkach czerniaka i zwiększają ilość wolnych rodników [**Hejchman et al, Pharmacological Reports. 2015 (P17)**]. Badaliśmy też pochodne kwasu cyjanonowego, pochodne kumaryny oraz ich kompleksy z solami metali (**P16, P18-21**). Wystandaryzowaliśmy tanie i efektywne testy określające efekty biologiczne nowych substancji w modelu komórkowym. Na każdym etapie badań byłam konsultantem merytorycznym i osobiście nadzorowałam poprawność wykonania eksperymentów. Również uczestniczyłam w procesie obróbki danych i tworzenia rycin oraz opisu wyników w powstających manuskryptach. Testy te pozwoliły wskazać aktywne i selektywne substancje i weryfikować założenia teoretyczne dotyczące struktury związków w żywych komórkach. Takie połączenie dwóch dziedzin: chemii leków i testów w modelu komórkowym daje nową jakość – możliwość weryfikacji *in vivo* założeń syntetycznych, bez której najlepsze nawet syntezy pozostają tylko pewną ideą. Tego typu współpraca pozwala wyłonić takie struktury, które mogą później być podstawą badań aplikacyjnych i wdrożeniowych. Takim przykładem jest również historia charakterystyki BSc2118.

Pogłębione badania roli proteasomów w biologii nowotworów i aktywność

popularyzatorska

Czas po stażu w Berlinie poświęciłam w dużej mierze pracy z młodymi naukowcami i stopniowym obejmowaniem przeze mnie funkcji kierownika zespołu. Jako kierownik grantu KBN kierowałam zespołem naukowym charakteryzującym biblioteki peptydomimetyków jako potencjalnych inhibitorów kinazy MEK. Grant został rozliczony i ukazały się 2 oryginalne pełnotekstowe publikacje (**H2, P15**). W ramach indywidualnej subwencji działalności statutowej prowadziłam dalsze badania nad rolą układu ubikwityna-proteasom w

biologii nowotworów. Jestem autorem co najmniej 40 doniesień zjazdowych, w 17 z nich występuję w roli opiekuna tematu. Badaliśmy między innymi dynamikę powstawania agregatów białkowych pod wpływem inhibitorów proteasomów w różnych komórkach (**K4**). Wykazałam, że w zależności od wielkości agregatów komórki nowotworowe są różnie wrażliwe na działanie inhibitorów proteasomów. Znaczna część badań charakteryzuje rolę proteasomu w zjawisku entozy. Jest to nowo odkryty w 2007 roku proces pochłaniania jednej żywej komórki przez drugą. Wykazałam w kontekście nowotworów, że entoza jest metodą ucieczki przed niekorzystnymi warunkami środowiska, takimi jak zablokowanie proteasomu, proces jest hamowany przez inhibitory kinazy MEK, a nasilany przez BSc2118 (**K3, K10, K18-19, K23-24, K26, K28-30, K33, K37, K41**).

W temacie charakterystyki inhibitorów proteasomów włączyliśmy do badań porównawczych inhibitory drugiej generacji carfilzomib i marizomib poza bortezomibem i BSc2118 i badaliśmy proces apoptozy, ekspresję cykliny B, oraz przyczyny oporności komórek białaczki HL-60 na działanie inhibitorów proteasomów. Ponadto wykazaliśmy, że zablokowanie kinazy MEK nasila działanie inhibitorów proteasomów w modelu raka trzustki (**K19, K30, K39**).

Temat inhibitorów proteasomów w biologii nowotworów realizowała też grupa około 10 studentów medycyny z różnych krajów półkuli południowej w ramach krótkich staży naukowych pod auspicjami IFMSA (International Federation of Medical Students Association). Byłam opiekunem 5 prac magisterskich, z czego trójka moich podopiecznych podjęła studia doktoranckie w Katedrze Histologii i Embriologii WUM, dwie prace magisterskie uzyskały nagrody i wyróżnienia w wydziałowym konkursie prac magisterskich. Dodatkowo od roku 2006 objęłam funkcję opiekuna Studenckiego Koła Naukowego HESA. Kierowane przeze mnie Koło Naukowe HESA od trzech lat z rzędu zajmuje czołowe pozycje w rankingu ponad 250 kół naukowych WUM. Dodatkowo, wraz ze studentami z Koła Naukowego HESA od wielu lat organizuję konferencję naukową pt. Postępy w Badaniach Biomedycznych (PBB). Ja jestem pomysłodawcą tej konferencji nakierowanej na integrację środowiska, stworzenie platformy do wymiany intelektualnej, nawiązania współpracy naukowej i połączeniu wielu dziedzin wiedzy zarówno ścisłej, technicznej jak i biologicznej w realizacji zadań naukowych. W roku 2019 spodziewamy się zorganizować jubileuszową 10 konferencję. Konferencja PBB aktualnie rozrosła się do konferencji o zasięgu ogólnopolskim na której gościmy przedstawiciele uniwersytetów, uniwersytetów medycznych i politechnik z całej Polski. Zapraszamy też ekspertów do wygłoszenia wykładów poprzedzających sesje: genetyka, farmacja, immunologia, biologia nowotworów, nowe technologie, histochemia.

Nagroda główna w konferencji to nagroda imienia prof. Ostrowskiego. Mamy też nagrody w każdej sesji, co zachęca do rywalizacji i podnosi poziom merytoryczny konferencji.

Za najbardziej prestiżową nagrodę w zespole którym kieruję, uważam wyróżnienie pracy mojej studentki na konferencji w Berlinie i przyznanie jej możliwości publikacji wyników badań w Open Science (**K24**).

Będąc Aktywnym członkiem Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Cytochemików i Histochemików od 2010 roku, współorganizowałam sympozjum PTHC w Warszawie w roku 2017.

Aktualnie jestem redaktorem cyklu monografii, które ukażą się pod koniec roku 2018, z zakresu nauk biomedycznych, publikowanych przez wydawnictwo Tygiel.

Medycyna kliniczna

W latach 2013-2018 podjęłam i zakończyłam szkolenie specjalizacyjne z medycyny rodzinnej. W ramach szkolenia specjalizacyjnego opublikowałam pracę naukową w czasopiśmie z IF opisującą możliwości leczenia nadciśnienia tętniczego lekami wchłanianymi przez błony śluzowe u osoby po resekcji żołądka, nie przyjmującej leków doustnych z powodu uporczywych wymiotów pt: **Mucosal delivery systems of antihypertensive drugs: A practical approach in general practice**. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia. 2018 (**P22**). W pracy tej na potrzeby leczenia groźnych dla życia zwyżek ciśnienia tętniczego opracowaliśmy autorski model dawkowania leków hipertensyjnych aplikowanych podjęzykowo i doodbytniczo, uzyskując zadowalającą kontrolę ciśnienia w długoterminowym leczeniu choroby nadciśnieniowej. Taki schemat terapii był akceptowany przez pacjentkę i stanowi przykład niestandardowej, spersonalizowanej terapii prowadzonej w trybie ambulatoryjnym. Wspomniany artykuł kliniczny zawiera również przegląd leków hipotensyjnych aplikowanych w systemie przezśluzówkowym dostępnych w Unii Europejskiej.

Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Prace jako pierwszy ostatni lub korespondencyjny autor - prace oryginalne wchodzące w skład osiągnięcia nr H1 i H2, prace oryginalne niewchodzące w skład osiągnięcia P5, P11, P17, P21, M4 artykuły przeglądowe wchodzące w skład osiągnięcia nr H4, artykuły przeglądowe niewchodzące w skład osiągnięcia nr P22, M2, M3.

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	6	1	18,204	114
Artykuły przeglądowe	1	3	0,894	29,5
Łącznie	7	4	19,098	143,5

Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	11	1	24,085	125
Artykuły przeglądowe		2		5,5
Łącznie	11	3	24,085	130,5

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	13	1	49,495	343
Artykuły przeglądowe	1	1	0,894	24
Łącznie	14	2	50,389	367

Publikacje ogółem

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	24	2	73,58	468
Artykuły przeglądowe	1	3	0,894	29,5
Łącznie	25	5	74,474	497,5

1. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (Web):487 (bez autocytowań)
2. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (Web):12
3. Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:20,455

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o pozostałych osiągnięciach habilitanta (m.in. dydaktycznych, uzyskanych nagrodach, popularyzacji nauki) zostały zamieszczone w załączniku nr 4. pt „Wykaz dorobku naukowego”.

Warszawa, 25.06.2018 Izabela M-Biały