

MAJA GRABACKA

Katedra Biotechnologii Żywności
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

AUTOREFERAT

*Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów i ich ligandy jako
modulatory metabolizmu i różnicowania komórek nowotworowych*

Kraków 2018

1. Imiona i nazwisko: **Maja Małgorzata Grabacka**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- 2001** Magister biologii, specjalność biologia molekularna,
Zakład Biofizyki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet
Jagielloński, tytuł pracy:
*Analiza możliwości wykorzystania fenofibratu – ligandu dla PPAR α
w terapii czerniaka*
Promotor pracy: dr Przemysław Płonka
- 2006** Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet
Jagielloński, tytuł pracy:
*Rola receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów
(PPARs) w regulacji różnicowania i zdolności do przerzutowania
komórek czerniaka*
Promotor pracy: prof. dr hab. Krystyna Urbańska,
ko-promotor: prof. dr hab. Krzysztof Reiss

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2003 - 2005** Technik laboratoryjny w Center for Neurovirology, Department of
Neuroscience, Temple University School of Medicine,
Philadelphia, USA
- 2006-2007** Asystent w Zakładzie Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki
i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
- 2006 - 2008** Asystent w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydział
Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy, Kraków
- 2008 - obecnie** Adiunkt w Katedrze Biotechnologii Żywności, Wydział Technologii
Żywności, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

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

4. 1 Podstawą do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego (osiągnięciem naukowym) jest cykl powiązanych tematycznie publikacji zatytułowany:

Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów i ich ligandy jako modulatory metabolizmu i różnicowania komórek nowotworowych

Cykl składa się z 9 prac o łącznym współczynniku IF 23,635, liczbie punktów MNiSW 184 i liczbie cytowań 102.

4.2 Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

W tabeli 1 zestawione są publikacje wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi i informacjami na temat mojego wkładu w powstanie publikacji.

Tabela 1

L.p.	Publikacja	IF (z roku publikacji)	Punkty MNiSW	Liczba cytowań (Web of Science, stan z 7.03.2018)
1	<p>Grabacka M, Placha W, Urbanska K, Laidler P, Płonka PM, Reiss K (2008) PPARγ regulates MITF and β-catenin expression and promotes a differentiated phenotype in mouse melanoma S91. <i>Pigment Cell and Melanoma Research</i> 21: 388-396, doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00460.x</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 70% Mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji i planu badawczego, wykonaniu doświadczeń na komórkach, oznaczeń aktywności promotorów wybranych genów związanych z melanogenezą, oznaczeń ekspresji genów i poziomu białek, aktywności enzymatycznej w przypadku tyrozynazy, wykonaniu rysunków i napisaniu wstępnej wersji manuskryptu.</p>	4,634	25	28
2	<p>Grabacka M, Reiss K (2008) Anti-cancer properties of PPARα – effects on cellular metabolism and inflammation. <i>PPAR Research</i>, article ID 930705, doi: 10.1155/2008/930705</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 80% Mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji pracy, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i sporządzeniu ilustracji.</p>	2008 brak (2010: 2,727)	2008 brak (2011: 30)	19
3	<p>Grabacka M, Pierzchalska M, Reiss K (2013) Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha Ligands as Anticancer Drugs Targeting Mitochondrial Metabolism. <i>Curr Pharm Biotechnol</i> 14: 342-356.</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 75% Mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji pracy, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i sporządzeniu ilustracji.</p>	2,511	30	18

Tabela 1

L.p.	Publikacja	IF (z roku publikacji)	Punkty MNiSW	Liczba cytowań (Web of Science, stan z 7.03.2018)
4	<p>Grabacka M, Gawin M, Pierzchalska M (2014) Phytochemical modulators of mitochondria: the search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. Pharmaceuticals (Basel). 7:913-42, doi: 10.3390/ph7090913</p> <p>Mój udział szacuję na 75% i polegał on na sformułowaniu koncepcji pracy, napisaniu manuskryptu i sporządzeniu ilustracji.</p>	brak	brak	13
5	<p>Wilk A, Wyczechowska D, Zapata A, Dean M, Mullinax J, Marrero L, Parsons C, Peruzzi F, Culicchia F, Ochoa A, Grabacka M, Reiss K (2015) Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. Mol Cell Biol. 35:182-98, doi: 10.1128/MCB.00562-14</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 25%</p> <p>Mój udział polegał na zdobyciu funduszy, które pokryły część kosztów badań, sformułowaniu hipotezy dotyczącej „katastrofy metabolicznej” oraz strategii badawczej, która miała zweryfikować tę hipotezę. Ponadto zaplanowałam doświadczenia na liniach komórkowych i wykonałam serię eksperymentów z użyciem różnych syntetycznych agonistów i antagonistów PPARα, doświadczenia zasugerowane przez recenzentów, przeprowadziłam analizę i interpretację wyników co pozwoliło mi napisać duże fragmenty dyskusji i mieć duży wpływ na końcowy kształt manuskryptu.</p>	4,427	35	13
6	<p>Grabacka M, Waligorski P, Zapata A, Blake DA, Wyczechowska D, Wilk A, Rutkowska M, Vashistha H, Ayyala R, Ponnusamy T, John VT, Culicchia F, Wisniewska-Becker A, Reiss K (2015) Fenofibrate subcellular distribution as a rationale for the intracranial delivery through biodegradable carrier. J Physiol Pharmacol. 66:233-47</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 30%</p> <p>Mój udział polegał na zdobyciu funduszy, które pokryły część kosztów badań, sformułowaniu koncepcji pracy, opracowaniu danych pochodzących z doświadczeń na komórkach, wykonaniu testów wzrostu klonalnego, wykonaniu analiz zasugerowanych w trakcie recenzji, napisaniu wstępnej wersji pracy i sporządzeniu rysunków.</p>	2,804	25	3

Tabela 1

L.p.	Publikacja	IF (z roku publikacji)	Punkty MNiSW	Liczba cytowań (Web of Science, stan z 7.03.2018)
7	<p>Grabacka M, Wilk A, Antonczyk A, Banks P, Walczyk-Tytko E, Dean M, Pierzchalska M, Reiss K (2016) Fenofibrate Induces Ketone Body Production in Melanoma and Glioblastoma Cells. <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i>.7:5. doi: 10.3389/fendo.2016.00005</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 70%</p> <p>Mój udział polegał na zdobyciu funduszy na badania, sformułowaniu koncepcji pracy i planu doświadczeń, wyprowadzeniu i przeprowadzeniu charakterystyki stabilnych linii komórkowych opracowaniu, wykonaniu oznaczeń produkcji ciał ketonowych i poziomu białek, analizy cyklu komórkowego i testów klonogenności i oznaczeń stosunku zredukowanego i utlenionego NADP, interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rysunków.</p>	3,675	9	4
8	<p>Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K (2016) Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPARα. <i>Int J Mol Sci</i> 17(12), 2093; doi:10.3390/ijms17122093</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 75%</p> <p>Mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji pracy, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i sporządzeniu ilustracji.</p>	3,226	30	4
9	<p>Grabacka M, Wieczorek J, Michalczyk-Wetula D, Malinowski M, Wolan N, Wojcik K, Plonka PM (2017) Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPARα) contributes to control of melanogenesis in B16 F10 melanoma cells. <i>Arch Derm Res</i> 309:141-157. doi: 10.1007/s00403-016-1711-2</p> <p>Szacowany udział w powstanie pracy 60%</p> <p>Mój udział polegał na zdobyciu funduszy, które pokryły większą część kosztów badań, sformułowaniu koncepcji i planu badawczego, wykonaniu doświadczeń na komórkach, oznaczeń aktywności promotorów wybranych genów związanych z melanogenezą, oznaczeń poziomu białek, ich modyfikacji posttranslacyjnych i aktywności enzymatycznej w przypadku tyrozynazy, interpretacji i dyskusji wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i wykonaniu rysunków.</p>	2,327	30	0

4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1 Wprowadzenie

Transformacja nowotworowa jest złożonym i wieloetapowym procesem uniezależniania się komórki od sygnałów kontrolnych płynących z organizmu wielokomórkowego. Proces ten prowadzi do szeregu zmian fizjologicznych, w tym z jednej strony do **zaniku cech wyspecjalizowanych (anaplazji)** i przejścia do proliferacji, lub z drugiej strony do utraty asymetrii podziałów w przypadku transformacji komórek macierzystych. W ten sposób komórki uzyskują nieograniczony potencjał do ekspansji. Cofnięcie zróżnicowanego fenotypu powoduje osłabienie oddziaływań łączących komórkę neoplastyczną z komórkami tkanki, co w konsekwencji umożliwia migrację i inwazję.

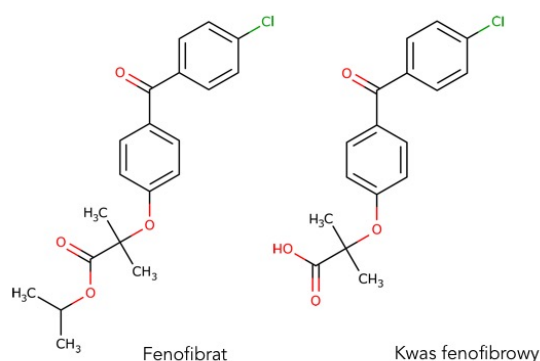
Zmiana zachowania się komórek podczas transformacji wiąże się najczęściej z koniecznością pokrycia zwiększonego zapotrzebowania na energię, która jest niezbędna zarówno do procesów biosyntezy nukleotydów, białek i lipidów błonowych, ale także zużytkowywana na ruch i migrację. **Przeprogramowanie metabolizmu** zachodzące w komórkach nowotworowych skutkuje najczęściej uzależnieniem od niektórych substratów energetycznych oraz utratą plastyczności, czyli zmniejszeniem możliwości wzajemnego uzupełniania się przez poszczególne szlaki metaboliczne, w porównaniu do komórek prawidłowych (DeBerardinis i in. 2007).

W obu wymienionych wyżej aspektach fizjologii komórki związanych ze stopniem zróżnicowania oraz modulacją metabolizmu, biorą udział **receptory aktywowane proliferatorami peroksyosomów** (ang. peroxisome proliferator activated receptors, PPARs). Białka te należą do rodziny receptorów jądrowych, w związku z czym działają jako czynniki transkrypcyjne o aktywności modulowanej przez ligandy. Receptory PPARs zostały po raz pierwszy opisane na początku lat 90 XX wieku (Issemann i Green 1990), a w kolejnych latach zidentyfikowano trzy ich izotypy: PPAR α , PPAR β/δ oraz PPAR γ , będące produktami odrębnych genów. Dokładniejsze badania nad ekspresją PPAR γ doprowadziły do wyodrębnienia podtypów $\gamma 1$ i $\gamma 2$, powstających na skutek transkrypcji z alternatywnych miejsc promotorowych genu *PPARG*. Pomimo wysokiego stopnia homologii sekwencji pomiędzy poszczególnymi izotypami PPARs oraz posiadania wielu wspólnych ligandów, PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ są zaangażowane w odrębne, często przeciwstawne procesy (Berger i Moller 2002). Jednym z powodów takiego stanu rzeczy jest charakterystyczny wzór ekspresji, który jest ściślej określony i lepiej zbadany w przypadku PPAR α i PPAR γ , niż PPAR β/δ . Ten ostatni receptor ulega niskiej ekspresji praktycznie we wszystkich przebadanych komórkach i tkankach (Desvergne i Wahli 1999).

Ligandami dla receptorów PPARs są związki o charakterze hydrofobowym, zdolne do przenikania przez błonę do wnętrza komórek. Po związaniu liganda receptory rezydujące w cytoplazmie ulegają translokacji do jądra, gdzie, przyłączając się do charakterystycznych sekwencji występujących w promotorach genów docelowych (tzw. *response elements*), mogą indukować lub

blokować transkrypcję. Charakterystyczną cechą receptorów jądrowych jest preferencja do współdziałania pomiędzy sobą i tworzenia zarówno homo- jak i heterodimerów. W przypadku receptorów PPARs obligatoryjnym partnerem wchodzącym w skład heterodimeru jest receptor X retinoidowy (RXR), wiążący kwas 9-*cis* retinowy. Dodatkowym mechanizmem regulującym aktywność receptorów jądrowych oraz ich zdolności do dimeryzacji jest wprowadzanie odwracalnych modyfikacji posttranslacyjnych, głównie fosforylacji, acetylacji i ubiquitynacji (Anbalagan i in. 2012).

Receptor PPAR α jest głównym regulatorem katabolizmu lipidów w komórkach i induktorem ekspresji genów dla białek zaangażowanych w transport kwasów tłuszczowych oraz genów kodujących enzymy szlaków mitochondrialnej i peroksysomalnej oksydacji kwasów tłuszczowych, a także odpowiedzialnych za mobilizację rezerw tłuszczowych i biosyntezę ciał ketonowych. Z tego względu poziom ekspresji i aktywność PPAR α indukowane są w warunkach obniżonej podaży energii lub głodu, natomiast konstytutywnie wysokie są w komórkach prowadzących intensywne procesy kataboliczne, m.in. w hepatocytach, kardiomiocytach, komórkach brunatnej tkanki tłuszczowej, nabłonka kanalików nerkowych i jelita cienkiego (Desvergne i Wahli 1999). Fizjologiczną funkcją PPAR α jest regulacja odpowiedzi na stres energetyczny zarówno na poziomie pojedynczej komórki, jak i organizmu. Naturalnymi ligandami PPAR α są wolne kwasy tłuszczowe i ich pochodne (m.in. acylo-CoA), co pozwala temu receptorowi działać jako sensor mobilizacji tłuszczu zapasowych (Kersten i in. 1999). Ze względu na swój wpływ na metabolizm lipidów i lipoprotein, syntetyczne ligandy dla PPAR α , takie jak leki z grupy fibratów (fenofibrat, klofibrat, ciprofibrat, gemfibrozil) są stosowane do normalizacji profilu lipidowego osocza krwi i obniżania poziomu cholesterolu i triglicerydów. Fenofibrat jest estrem izopropylowym kwasu fenofibrowego, który w wyniku działania esteraz jest rozkładany, a właściwym agonistą receptora PPAR α jest kwas fenofibrowy (Najib 2002). Strukturę obu tych związków przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Wzory strukturalne fenofibratu i kwasu fenofibrowego.

Receptor PPAR γ , mimo podobieństw strukturalnych do PPAR α oraz zdolności do wiązania tych samych ligandów, reguluje całkowicie odmienne procesy fizjologiczne. Najwyższy poziom ekspresji PPAR γ obserwowany jest w tkance tłuszczowej białej i brunatnej oraz w preadipocytach o różnym stopniu rozwoju, ale ekspresja zachodzi także w komórkach nabłonka jelit, śródbłonna czy wątroby, choć na niższym poziomie (Sarraf i in. 1998, Kersten i in. 2000). Dodatkowo, receptor ten posiada immunomodulacyjne funkcje i jest produkowany w komórkach układu odpornościowego, m.in. makrofagach (Ricote i in. 1998). PPAR γ jako czynnik transkrypcyjny ma kluczowe znaczenia dla rozwoju i różnicowania adipocytów ponieważ kontroluje geny odpowiedzialne za transport kwasów tłuszczowych, syntezę lipidów, odpowiedź na insulinę czy ekspresję adipocytokin (adipokin) (Poulos i in. 2016). W przeciwieństwie do PPAR α , PPAR γ koordynuje na poziomie pojedynczej komórki, jak i całego organizmu, odpowiedź na dostarczenie składników odżywczych (stan po posiłku), poprawiając wrażliwość na insulinę, pobór glukozy z krwi przez komórki oraz biosyntezę i magazynowanie związków lipidowych w tkance tłuszczowej (Tordjman i in. 2003). Syntetyczne ligandy dla PPAR γ z grupy tiazolidinedionów uwrażliwiają tkanki na insulinę i są stosowane w terapii cukrzycy typu II. Do prototypowych związków tej grupy leków należy zsyntetyzowany w latach osiemdziesiątych XX wieku ciglitazon, natomiast otrzymane później rosiglitazon i pioglitazon stosowane są klinicznie w celu obniżenia insulinooporności w cukrzycy typu II (Wagstaff i Goa 2002).

4.3.2. Zmiany w metabolizmie i różnicowaniu w trakcie transformacji nowotworowej

W 2001 roku Hanahan i Weinberg w swoim przeglądowym artykule, który odbił się szerokim echem wśród badaczy zjawisk nowotworzenia, sformułowali listę typowych cech komórek nowotworowych odróżniających je od prawidłowych. Lista ta została uzupełniona w 2011 (Hanahan i Weinberg 2011). Oprócz deregulacji procesów kontroli cyklu komórkowego, niekontrolowanej proliferacji, zaburzeń apoptozy i kontaktów z otaczającymi komórkami, które prowadzą do rozrostu i rozsiewania komórek nowotworowych, **„przeprogramowanie” metaboliczne jest uważne za ważny aspekt biologii nowotworów**, z którym obecnie wiąże się nadzieję na rozwój celowanych działań terapeutycznych.

Zmiany metaboliczne były jednymi z pierwszych, jakie zaobserwowano w fizjologii komórek neoplastycznych. Już w latach 30 XX wieku Otto Warburg przedstawił hipotezę, że z transformacją nowotworową związane jest upośledzenie oddychania mitochondrialnego, i w tym zjawisku upatrywał nawet przyczyny transformacji nowotworowej (Warburg 1956). Pomimo, że kolejne dane doświadczalne nie potwierdziły istnienia uniwersalnej reguły, w postaci ograniczenia oddychania tlenowego w skrawkach tkanki guzów nowotworowych (Burk i Schade 1956, Weinhouse 1956), faktem jest obniżenie wydajności syntezy ATP podczas przemian tlenowych w niektórych typach nowotworów i uzależnienie metabolizmu komórki od intensywnej glikolizy, któremu towarzyszy utrata tzw. efektu Pasteura, czyli zahamowania fermentacji mlekowej w warunkach aerobowych (Icard i Lincet 2012). Zestaw tych zmian nazwano efektem Warburga, a powoduje on zwiększony

pobór i metabolizm glukozy na drodze glikolizy oraz redukcję pirogronianu do mleczanu, nawet w warunkach dostępności tlenu. Zjawisko to leży u podstaw szeroko stosowanej w diagnostyce metody obrazowania tkanek techniką tomografii emisji pozytonów (PET) przy użyciu fluorowanych pochodnych glukozy (2-deoksy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glukozy) jako znaczników, kumulujących się wybiórczo w tkankach neoplastycznych. Chociaż Warburg mylił się upatrując w upośledzeniu oddychania komórkowego przyczyny transformacji nowotworowej, to jednak jego prace początkowo traktowane sceptycznie, po wielu latach zainspirowały badaczy do dogłębnej analizy metabolizmu komórek nowotworowych. Jakkolwiek intensywna glikoliza i niski poziom konsumpcji tlenu są spotykane w większości agresywnych nowotworów, to jednak znane są przypadki kiedy oddychanie mitochondrialne stanowi główne źródło ATP, m.in w komórkach raka sutka (LeBleu i in. 2014). W guzach litych, pozbawionych dobrze funkcjonującej sieci naczyń krwionośnych, rozwija się stan niedotlenienia, który dodatkowo ogranicza możliwość oddychania. Przesławienie metabolizmu ma jednak szerszy charakter i obejmuje również inne anomalie, takie jak: intensywna glutaminoliza czy przebieg niektórych reakcji cyklu Krebsa w odwrotnym niż normalnie kierunku, na przykład oksydacyjna dekarboksylacja izocytrynianu, katalizowana przez dehydrogenazę izocytrynianową, zastępowana jest przez redukcyjną karboksylację α -ketoglutaranu do izocytrynianu (Mullen i in. 2011).

Częstym zjawiskiem obserwowanym w komórkach nowotworowych, szczególnie pochodzenia neuroektodermalnego, jest też zahamowanie β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz brak zdolności do metabolizmu ciał ketonowych (Maurer i in. 2011, Seyfried i in. 2015). Czerpanie energii z metabolizmu tych substratów wymaga sprawnie działających mitochondriów oraz ich aparatu enzymatycznego, co jest warunkiem trudnym do spełnienia w przypadku wielu nowotworów. Dodatkowo, stan hipoksji notorycznie występujący w guzach litych i związany z nim wysoki poziom czynnika indukowanego przez hipoksję HIF-1 α są silnymi supresorami β -oksydacji kwasów tłuszczowych i hamują ekspresję dehydrogenaz średnio- i długołańcuchowych cząsteczek acylo-CoA (MCAD i LCAD), które są niezbędne dla tego szlaku (Huang i in. 2014). Z tego też powodu często obserwowany w komórkach nowotworowych stan tzw. pseudohipoksji, czyli wysokiej aktywności HIF-1 α nawet w warunkach dostępności tlenu hamuje katabolizm kwasów tłuszczowych promując przemianę glukozy na drodze glikolizy (Kim i in. 2006, Huang i in. 2014).

Ogół zmian metabolicznych w komórkach nowotworowych, czasem zwany „przeprogramowaniem” metabolizmu (ang. *metabolic reprogramming*) ma częstokroć swoje źródła w **anaplazji (odróżnicowaniu)**, czyli utracie cech charakterystycznych dla dojrzałej tkanki, z której nowotwór pochodzi i przyjęciu bardziej pierwotnego, embrionalnego fenotypu. W nowotworach pochodzenia neuroektodermalnego, takich jak glejaki, nerwiaki i rdzeniaki zarodkowe czy czerniaki odróżnicowanie towarzyszy progresji do złośliwienia i inwazyjności. We wszystkich tych typach nowotworów zidentyfikowano komórki macierzyste (ang. *cancer stem cells*) o wysokim stopniu pluripotencji, odpowiedzialne za agresywną i inwazyjną postać choroby, a także inicjujące wznowę po terapii (Singh i in. 2003, Boiko i in. 2010, Bhaskara i in. 2012, Bradshaw i in.

2016). Komórki te często rezydują w mikrośrodowisku ubogim w tlen, wykazują metabolizm oparty na glikolizie i charakteryzują się ekspresją markerów embrionalnych komórek macierzystych oraz komórek progenitorowych pochodzących z grzebieni nerwowych, takich jak OCT-4, SOX2, SOX9, SOX10, CD133, CD271, ZEB1, TWIST. Specyficzny program transkrypcyjny komórek grzebieni nerwowych (ang. neural crest cells, NCCs), z których wywodzą się m.in. melanocyty, komórki glejowe i nerwowe, umożliwia im bardzo szybką migrację i zdolność do docierania do odległych części zarodka poprzez warstwy komórek pochodzących z różnych listków zarodkowych. Z kolei ekspresja markerów różnicowania poszczególnych komórek neuroektodermalnych, m.in. czynnika transkrypcyjnego *microphthalmia* (MITF-M) dla melanocytów, czy neurofilamentów w przypadku neuronów, wiąże się na ogół z niższą zdolnością do naciekania otaczających tkanek i tworzenia przerzutów, a w konsekwencji lepszą prognozą dla pacjenta (Cheli i in. 2012, Mohlin i in. 2017).

Podsumowując, profil metaboliczny komórek nowotworowych oraz ich fenotyp i ekspresja markerów różnicowania są cechami powiązаныmi ze sobą, a co najważniejsze, mają kluczowe znaczenie dla przebiegu leczenia i rokowania w przypadku choroby nowotworowej. Identyfikacja i analiza czynników molekularnych, które wpływają na profil metaboliczny oraz różnicowanie ma zatem potencjał, aby decydować o rozwoju istniejących i wytyczaniu nowych kierunków interwencji terapeutycznej, szczególnie farmakologicznej. Za jeden z takich potencjalnych czynników można uznać receptory PPARs. **Celem naukowym cyklu prac habilitacyjnych przedstawianych do oceny, było właśnie przeanalizowanie roli receptorów PPARs i ich wybranych ligandów w modulacji metabolizmu i różnicowania komórek nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego.**

4.3.3. Geneza cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Badania nad antynowotworowym działaniem syntetycznych agonistów PPARs, a także rolę receptorów PPARs w nowotworzeniu prowadzone są na świecie od kilkunastu lat. W pracach tych brałam czynny udział, a niniejsza rozprawa nakreśla mój wkład w poznanie nowych faktów dotyczących roli PPARs w biologii komórek nowotworowych. Dzięki dużej swobodzie wyboru tematu badań, którą mnie obdarzono już na studiach, mogłam kierować swoim rozwojem naukowym w ten sposób, aby przebiegał konsekwentnie w obszarze tej tematyki rozpoczynając od pracy magisterskiej, poprzez badania realizowane w czasie przygotowywania doktoratu a następnie habilitacji.

Wyniki doświadczeń prowadzonych przeze mnie w ramach pracy magisterskiej wykazały, że fenofibrat, syntetyczny ligand dla PPAR α i jednocześnie lek stosowany od lat siedemdziesiątych XX wieku do normalizacji profilu lipidowego osocza krwi, obniża znacząco (prawie trzykrotnie) liczbę przerzutów tworzonych w płucach przez komórki rosnącego podskórnie chemicznego

czerniaka Bomirskiego (BHM Ma), mimo braku wpływu na tempo wzrostu guza pierwotnego (Grabacka i in. 2004). Wynik ten zasługuje na uwagę z kilku powodów: po pierwsze chomiczki syryjskie (*Mesocricetus auratus*), na których wykonane były doświadczenia, są zwierzętami laboratoryjnymi outbredowymi, stanowiącymi populację heterogenną pod względem genetycznym (pomimo stosunkowo niskiego stopnia polimorfizmu w obrębie genów kodujących białka głównego układu zgodności tkankowej), a więc stwierdzenie statystycznie istotnej różnicy, pomiędzy grupą otrzymującą fenofibrat a kontrolną, o niewielkiej liczebności (13 i 14 zwierząt), świadczy o dużej sile efektu. Po drugie, zawiesinę komórek nowotworowych zaszczepiano podskórnie, nie zaś do żyły ogonowej, co sprawia, że ogniska wtórne nowotworu utworzone w płucach, można było nazwać rzeczywiście przerzutami *sensu stricto*, czyli ogniskami rozsiewu ze zmiany pierwotnej, a nie guzami utworzonymi przez komórki wprowadzone sztucznie do krwiobiegu. Po trzecie, doustne podawanie fenofibratu rozpoczęto dopiero po uformowaniu się guza pierwotnego (a nie w dniu podskórnego wszczepienia komórek), co spowodowało, że model doświadczenia bardziej przypominał sytuację rzeczywistą, gdy terapię rozpoczyna się po stwierdzeniu objawów chorobowych, nie wcześniej. **Wszystkie te aspekty doświadczenia *in vivo* pozwoliły na wnioskowanie, że otrzymany rezultat może rzeczywiście mieć istotne znaczenie biologiczne.** Wyniki zostały opublikowane w *Archives of Dermatological Research* i były pierwszym doniesieniem na temat ekspresji PPAR α w komórkach chomiczego czerniaka, cytowanym dotychczas 54 razy.

Kolejne badania podjęte już w ramach realizacji pracy doktorskiej dostarczyły nowych informacji na temat molekularnego mechanizmu leżącego u podstaw antymetastatycznego działania fenofibratu. Stwierdziłam m.in., że za zahamowanie proliferacji w hodowli adherentnej i tworzenie kolonii w warunkach braku kontaktu z podłożem, a także migracji i ruchliwości komórek różnych linii czerniaków mysich i ludzkich przez fenofibrat odpowiada zależne od PPAR α obniżenie fosforylacji onkogennej kinazy Akt (Grabacka i in. 2006).

4.3.4. Omówienie głównych wyników cyklu prac (dzieła habilitacyjnego)

Cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe i podstawę przedkładanej habilitacji obejmuje kolejne etapy związane zarówno z wyjaśnianiem działania fenofibratu, jak i roli PPARs w biologii komórek nowotworowych. Szlak sygnałowy kinazy Akt jest konstytutywnie aktywny w większości nowotworów i odpowiada m.in. za wysokie tempo proliferacji, inwazyjność i odporność na apoptozę, ale także za typowe cechy metabolizmu komórek nowotworowych, określane jako efekt Warburga (Robey i Hay 2009). W **pracach przeglądowych nr 2 (2008) i 3** (praca przyjęta do druku w 2010, choć ukazała się dopiero w 2013) stawiam hipotezę, że biorąc pod uwagę fizjologiczną rolę PPAR α , jego aktywacja może w komórkach nowotworowych wywołać stres energetyczny poprzez ograniczenie glikolitycznego katabolizmu glukozy i promowanie utleniania kwasów

tłuszczowych i oddychania tlenowego. W tych komórkach nowotworowych, które posiadają nieefektywnie funkcjonujące mitochondria doprowadziłoby to do spadku poziomu ATP i kryzysu energetycznego, co z kolei wywołuje aktywację kinazy białek zależnej od AMP (AMPK) oraz deacetylazy białek Sirt1. Współdziałanie PPAR α ze szlakami sygnałowymi AMPK i Sirt1 mogłoby w ten sposób doprowadzić komórki nowotworowe do „katastrofy metabolicznej” i w konsekwencji zahamowania proliferacji, energochłonnych procesów, takich jak migracja i inwazja, oraz w końcu do apoptozy.

Uderzenie w metabolizm komórek nowotworowych znacznie ograniczyłoby ich możliwości zapewnienia sobie wystarczającej ilości metabolitów pośrednich do biosyntezy fosfolipidów i białek, a w konsekwencji zahamowało proliferację i inwazyjność. Zatem negatywna regulacja szlaku Akt-mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) przez PPAR α i współdziałanie z AMPK i Sirt1 może być również jednym z mechanizmów biologicznego działania fenofibratu. Dodatkowo, w **pracy nr 3** przytaczam dane pozwalające postrzegać ketozę jako stan niesprzyjający progresji nowotworu, oraz proponuję farmakologiczną aktywację PPAR α jako wspomaganie diety ketogennej o ograniczonej kaloryczności (ang. *calorie-restricted ketogenic diet*), która jest uważana za skuteczne postępowanie dietetyczne w leczeniu niektórych nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego, w tym glejaków (Seyfried i in. 2011).

Hipotezy przedstawione w tych dwóch pracach przeglądowych (2 i 3) stały się podstawą przygotowanego przeze mnie wniosku grantowego, a następnie projektu finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, realizowanego przeze mnie w latach 2011 - 2015 (projekt Pomost/2011-3/4). Projekt koncentrował się na zbadaniu trzech głównych aspektów działania PPAR α w komórkach nowotworów pochodzenia neuroektodermalnego o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym: (1) indukcji zmian w profilu metabolicznym komórek nowotworowych, (2) zahamowaniu lipidogenezy *de novo* oraz modyfikacji składu i własności błon plazmatycznych, (3) zmian w ekspresji markerów komórek progenitorowych grzebieni nerwowych, które to białka są odpowiedzialne m.in. za przejście epitelialno-mezenchymalne, a co za tym idzie inwazyjność i zdolności do przerzutowania. Owocem badań zrealizowanych w ramach tego projektu były m.in. prace doświadczalne 5-7 oraz praca przeglądowa 4, wchodzące w skład osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem habilitacji.

W **pracy 5** weryfikowana była hipoteza dotycząca wywoływania „katastrofy metabolicznej” w komórkach glejaka poprzez zastosowanie fenofibratu jako aktywatora PPAR α . Stwierdziliśmy, że fenofibrat wnika do mitochondriów i w przeciągu kilku minut po podaniu prawie całkowicie blokuje oddychanie mitochondrialne działając najprawdopodobniej na I kompleks oddechowy (imituje działanie rotenonu). Komórki odpowiadają zwiększając równocześnie tempo glikolizy oraz włączając autofagię, jednak mimo tego doświadczają poważnego spadku poziomu ATP w przeciągu 48 godzin i ulegają apoptozie po 72 godzinach. Proces ten jest jeszcze

intensywniejszy, gdy komórki dodatkowo wystawione są na działanie inhibitorów autofagii. Co ciekawe, wszystkie te skutki są całkowicie niezależne od PPAR α i wywoływane wyłącznie przez niezhydrolizowany fenofibrat w formie estrowej. Kwas fenofibrowy oraz inne syntetyczne ligandy dla PPAR α (gemfibrozil, Wy14,643, GW7647) nie wykazują podobnych właściwości. Ani farmakologiczna inhibicja, ani też wygaszenie ekspresji receptora PPAR α nie niwelują działania fenofibratu. Co ważne, prawidłowe ludzkie astrocyty są znacznie mniej wrażliwe na działanie fenofibratu niż komórki glejaka i fenofibrat osiąga w ich mitochondriach znacząco niższe stężenia, co może świadczyć o tym, że metabolizm tego leku do kwasu fenofibrowego jest znacznie szybszy w komórkach prawidłowych niż nowotworowych. Najistotniejsze, że fenofibrat działa skutecznie w warunkach *in vivo*, u myszy bezgranicznych z rosnącym w mózgu guzem ludzkiego glejaka U87MG: podanie fenofibratu do mózgu, w miejsce wszczepienia komórek nowotworowych, pozwalało znacząco spowolnić rozrost guza tak, że po 14 dniach średnia wielkość guzów w grupie otrzymującej badany związek była około sześciokrotnie mniejsza niż w grupie kontrolnej. Prace badawcze ujęte w publikacji 5 wykonywane były zarówno w moim miejscu zatrudnienia, jak i w siedzibie zagranicznego partnera projektu Pomost, w Stanley S. Scott Cancer Center, Louisiana State University Health Sciences Center, w Nowym Orleanie (USA).

Praca 6 koncentruje się na dwóch wątkach: (1) zrozumieniu dlaczego fenofibrat, a nie jego metabolit kwas fenofibrowy, ma tak silne działanie na komórki nowotworowe oraz (2) opracowaniu sposobu efektywnego podawania fenofibratu w przypadku guzów wewnątrzczaszkowych, takich jak glejaki. W przypadku pierwszego zagadnienia zwróciliśmy uwagę na fakt, że fenofibrat (ester) jest substancją hydrofobową, bardzo słabo rozpuszczalną w wodzie, lecz mającą powinowactwo do środowiska lipidowego, a więc i błon biologicznych. Wyniki doświadczeń farmakokinetycznych na hodowlach komórkowych pokazały, że fenofibrat jest pobierany przez komórki z płynu hodowlanego, część tego związku gromadzi się w błonach fosfolipidowych, natomiast część ulega deestryfikacji w cytoplazmie do kwasu fenofibrowego, który następnie jest wydzielany z komórek do pożywki. Oszacowaliśmy, że traktowanie komórek fenofibratem w stężeniu 50 μ M pozwala osiągnąć we frakcji błonowej około 3,8 %mol (średnio 3,8 cząsteczek fenofibratu na 100 cząsteczek fosfolipidów). Nie wykryliśmy natomiast obecności kwasu fenofibrowego we frakcji błonowej.

Aby stwierdzić, czy fenofibrat w tym stężeniu może wpływać na parametry fizyczne błon przeprowadziliśmy doświadczenia na fosfolipidowych błonach modelowych zbudowanych z dimirystylofosfatydylocholino (DMPC) z dodatkiem fenofibratu (2,5 oraz 5 %mol) lub bez, przy użyciu znaczników spinowych 5-SASL i 16-SASL (*doxyStearic Acid Spin Labels*), zawierających stabilne grupy wolnorodnikowe przy 5 lub 16 atomie węgla licząc od polarnej „głowy” cząsteczki. Zastosowanie tych znaczników spinowych pozwala za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) obserwować zmiany własności fizyko-chemicznych błon modelowych w różnych rejonach dwuwarstwy fosfolipidowej. Wykazaliśmy, że fenofibrat lokując

się w błonie działa podobnie do cholesterolu, tzn. obniża temperaturę głównego przejścia fazowego (pomiędzy fazą żelową a ciekłokrystaliczną) i wpływa na rozmycie samego przejścia. Oznacza to, że związek ten upłynnia błonę w temperaturach poniżej temperatury przejścia fazowego (gdy ma ona sztywniejszą strukturę) oraz usztywnia ją w temperaturze powyżej tego przejścia (gdy jest bardziej płynna), przez co działa jak „bufor płynności” błony. Dodatek fenofibratu również obniża polarność wewnątrz błony, co zwiększa barierę hydrofobowości, a więc naturalne własności fizjologiczne błon jako ochrony przed przenikaniem związków polarnych. Działanie fenofibratu ukierunkowane na błony jest całkowicie niezależne od aktywacji receptora PPAR α . To wyjaśnia także niską antynowotworową skuteczność kwasu fenofibrowego, który nie posiada zdolności lokowania się w obrębie błon biologicznych.

Jest prawdopodobne, że blokowanie respiracji przez fenofibrat ma związek z jego wpływem na płynność wewnętrznej błony mitochondrialnej, co może upośledzać przepływ elektronów pomiędzy kompleksami oddechowymi. Wielokierunkowe działanie fenofibratu zachęca do użycia go jako komponentu skojarzonej terapii antynowotworowej, m.in. w przypadku glejaków. Do osiągnięcia terapeutycznego stężenia substancji czynnej w miejscu docelowym konieczne jest podanie leku odpowiednią drogą. W przypadku doustnej drogi podania, w narządach zwierząt doświadczalnych (myszy) wykryliśmy jedynie obecność kwasu fenofibrowego, który w mózgu obecny był w bardzo niskim stężeniu, natomiast w tkance glejaka poniżej poziomu detekcji. Fenofibrat nie został wykryty też w żadnej z badanych próbek tkanek (wątroba, nerki, serce płuca, śledziona, krew). Biorąc pod uwagę brak możliwości dostarczenia fenofibratu w formie estrowej do mózgu drogą doustną, postanowiliśmy wytworzyć biodegradowalne matryce zbudowane z polimeru mleczanowo-glikolidowego (PLGA) z dodatkiem fenofibratu, które umieszczone w miejscu po resekcji guza i zaszyte w tkance mózgu mogłyby stopniowo uwalniać fenofibrat i działać terapeutycznie generując wysokie lokalne stężenie tego leku w miejscu docelowym. Przesącz tkankowy gromadzący się w miejscu usuniętej tkanki guza stanowiłby dobre środowisko dla stopniowego rozpuszczania matrycy PLGA. Zastosowanie matryc biodegradowalnych jako nośników leków chemioterapeutycznych jest obecnie praktykowane klinicznie w leczeniu glejaka, m.in. w formie preparatu Gliadel® zawierającego bischloroetylonitrozomocznik (BCNU, karmustyna) (Brem i in. 1995, Valtonen i in. 1997). W pracy 6 opisaliśmy procedurę przygotowania oraz wyniki testów matrycy PLGA z fenofibratem i stwierdziliśmy, że zastosowanie matrycy pozwala uzyskać wysokie i stabilne stężenie fenofibratu w hodowli komórek glejaka. Doświadczenia wykonywane były zarówno w moim miejscu zatrudnienia, jak i w siedzibie zagranicznego partnera projektu Pomost, w Stanley S. Scott Cancer Center, Louisiana State University Health Sciences Center, oraz w instytucjach współpracujących: Department of Biochemistry and Molecular Biology Tulane University School of Medicine w Nowym Orleanie (USA) oraz w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

Wyniki badań nad oddychaniem mitochondrialnym oraz eksperymentów z użyciem resweratrolu, stilbenu pochodzenia roślinnego, jako aktywatora Sirt1, prowadzonych w ramach projektu „Pomost”, skłoniły mnie do bardziej szczegółowej analizy dostępnych informacji na temat wpływu fitofarmaceutyków na pracę mitochondriów. Wnioski z tej analizy przedstawione są w **pracy nr 4**. Praca ta ma charakter przeglądowy, ale zawiera również dane doświadczalne pokazujące działanie sulforafanu - fitofarmaceutyku z roślin krzyżowych. Okazuje się, że sulforafan obniża polaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach prawidłowych (fibroblastach ludzkich), natomiast zwiększa ją w komórkach nowotworowych (czerniaka mysiego B16 F10), które wyjściowo charakteryzują się mniejszą liczbą mitochondriów o wysokiej polaryzacji niż prawidłowe fibroblasty. W pracy nr 4 zwracam także uwagę na rolę białka PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α*) i PPAR α w szlakach przekazywania sygnału pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondriami (tzw. *anterograde signaling* i *retrograde signaling*). Sygnalizacja odbywająca się pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondriami prowadzi do indukcji ekspresji genów związanych z biogenezą mitochondriów, ochroną przed działaniem reaktywnych form tlenu i metabolizmem kwasów tłuszczowych. Resweratrol oraz warunki głodzenia lub restrykcja kaloryczna włączają wewnątrzkomórkowe sensory stresu energetycznego: AMPK i Sirt1 oraz PGC-1 α , które modulują tę sygnalizację. Wszystkie te trzy białka są również pozytywnymi modulatorami ketogenezy, działając za pośrednictwem PPAR α .

Tematyka **pracy nr 7** nawiązuje do zagadnień poruszanych w pracy nr 3, głównie roli PPAR α w ketogenezie i potencjalnego znaczenia ketogenezy dla komórek nowotworowych. Głównym odkryciem, które dokumentują wyniki ujęte w tej pracy jest obserwacja, że fenofibrat silnie stymuluje (w niektórych przypadkach nawet dwudziestoczekrotnie) komórki nowotworowe (glejaka i czerniaka) oraz komórki prawidłowe (hodowle neurosfer zbudowane z prawidłowych komórek glejowych i nerwowych) do syntezy i wydzielania głównego ciała ketonowego, β -hydroksymaślanu. Efekt ten jest całkowicie niezależny od poziomu ekspresji i aktywności receptora PPAR α , co jest dość niespodziewane. Fenofibrat wywoływał wzrost ekspresji mitochondrialnej syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMGCS2), kluczowego enzymu szlaku ketogenezy. Jednocześnie w hodowlach komórek traktowanych fenofibratem zaobserwowaliśmy znaczące spadki poziomu białek innych ścieżek metabolicznych: transketolazy, głównego enzymu nieoksydacyjnej gałęzi szlaku pentozofosforanowego oraz enzymów zaangażowanych w procesy anaboliczne, m.in. lipogenezę: syntetazy acetylo-CoA (AceS1), liazy ATP-cytrynianowej (ACL) i kinazy pirogronianowej PKM2. W przypadku ACL obniżał się również poziom fosforylacji tego białka. Nieoksydacyjna faza szlaku pentozofosforanowego jest źródłem cukrów pięciowęglowych, w tym rybozy koniecznej do syntezy nukleotydów i wielu koenzymów, natomiast biosynteza kwasów tłuszczowych jest niezbędna do produkcji fosfolipidów błonowych. Zahamowanie tych procesów odbija się negatywnie na zdolności komórek do proliferacji, i rzeczywiście po traktowaniu fenofibratem zanotowano znaczący spadek frakcji komórek w fazie S oraz G2/M,

któremu towarzyszył wzrost frakcji G0/G1 cyklu komórkowego. Obniżony potencjał proliferacyjny najwyraźniej zademonstrowały testy klonogenności. Badania ujęte w pracy 7 wykonywane były zarówno w moim miejscu zatrudnienia, jak i w siedzibie zagranicznego partnera projektu Pomost, w Stanley S. Scott Cancer Center, Louisiana State University Health Sciences Center. Praca nr 7 była pierwszym doniesieniem na temat syntezy ciał ketonowych przez komórki nowotworowe pochodzenia neuroektodermalnego. W perspektywie klinicznej, ta zdolność mogłaby zostać wykorzystana dla poprawy funkcjonowania otaczającej guz tkanki nerwowej ponieważ ciała ketonowe, a zwłaszcza β -hydroksymaślan mają działanie neuroprotektyjne. Działanie ochronne byłoby pożądane zwłaszcza w takich przypadkach glejaka, gdy naruszenie szczelności bariery krew-mózg wywołuje obrzęk i neurony narażone są na zwiększone ciśnienie śródczaszkowe, a przez to silny stres komórkowy.

Informacje na temat działania neuro- i cytoprotekcyjnego ciał ketonowych zostały zebrane i przeanalizowane w **pracy nr 8**. Artykuł ten ma charakter przeglądowy i omówiono w nim szczegółowo procesy regulacji ketogenezy i ketolizy na poziomie ekspresji genów, aktywności kluczowych enzymów, gospodarki hormonalnej, dostępności składników odżywczych i wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału, w warunkach fizjologicznych oraz w komórkach nowotworowych. Jeden z rozdziałów tego artykułu poświęcono analizie terapeutycznego potencjału ciał ketonowych jako czynników wspomagających leczenie chorób centralnego układu nerwowego o różnym podłożu, takich jak epilepsja, choroby neurodegeneracyjne czy pourazowe uszkodzenia mózgu. W konkluzjach pracy wskazujemy, że przeprogramowanie metabolizmu komórek nowotworowych na ketogenezę przy jednoczesnym zablokowaniu proliferacji mogłoby stać się korzystnym kierunkiem wspomagania konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej.

Prace nr 1 i 9, choć ich publikację dzieli 9 lat, mają wspólną tematykę i dotyczą problemu zaangażowania receptorów PPAR α i γ w procesy różnicowania komórek. Zagadnienie to jest analizowane w modelu hodowli komórek czerniaka, dla których pigmentacja i ekspresja genów zaangażowanych w biosyntezę melaniny są wygodnymi do badania markerami różnicowania, z racji tego, że komórki te wywodzą się z melanocytów. W **pracy nr 1** stwierdziłam, że aktywacja receptora PPAR γ syntetycznym ligandem, ciglitazonem, indukuje w komórkach czerniaka zmiany morfologiczne, charakterystyczne dla dojrzałych melanocytów (wydłużone wypustki dendrytyczne) oraz zwiększoną ekspresję i aktywność markerów różnicowania: czynnika transkrypcyjnego *microphthalmia* (MITF) i tyrozynazy. Zmianom tym towarzyszy zatrzymanie cyklu komórkowego, a także przejściowy wzrost, a następnie spadek ekspresji β -kateniny oraz zmniejszona zawartość tego białka w jądrze komórkowym po dłuższej inkubacji z ciglitazonem. Wyniki te potwierdzają antagonizm pomiędzy PPAR γ a β -kateniną, obserwowany wcześniej w innym układzie doświadczalnym (Liu i Farmer 2004, Liu i in. 2006). W komórkach czerniaka szlak Wnt/ β -katenina

działa onkogennie, a więc zahamowanie proliferacji może być wynikiem ograniczenia aktywności tego szlaku.

Tematem **pracy nr 9** jest natomiast rola receptora PPAR α w regulacji melanogenezy w komórkach upigmentowanego czerniaka mysiego B16 F10. Głównym odkryciem prezentowanym w tej pracy jest zauważenie dwóch zjawisk: po pierwsze, że stopień pigmentacji komórek (zawartość melaniny) jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu ekspresji PPAR α , a po drugie, że syntetyczny ligand dla PPAR α obniża pigmentację, ale w sposób całkowicie niezależny od PPAR α . Fenofibrat obniża poziom białek zaangażowanych w melanogenezę: MITF, tyrozynazy, białka TRP1 /gp75 (tyrosinase-related protein1) i tautomerazy dopachromu (TRP2/Dct). Wyniki wskazują również, że na intensywność melanogenezy ma wpływ PGC-1 α : im wyższa ekspresja tego białka oraz udział formy aktywnej (nieacetylowanej), tym większa zawartość melaniny w komórkach. Podsumowując, można stwierdzić, że w odróżnieniu od PPAR γ , wpływ PPAR α na pigmentację jest negatywny, a zjawisko to jest maskowane przez również hamujące melanogenezę, ale niezależne od receptora działanie fenofibratu. Zdolność do produkcji melaniny ma znaczenie ochronne dla komórek i jest związana z opornością czerniaka na leczenie chemioterapeutykami (zjawisko gromadzenia leków w melanosomach, z dala od ich molekularnego celu działania, jakim najczęściej jest DNA) oraz na radioterapię (neutralizacja przez melaninę wolnych rodników tlenowych tworzonych w trakcie naświetlania). Z tego względu zablokowanie melanogenezy w komórkach czerniaka może mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne.

4.3.4. Omówienie ewentualnego wykorzystania wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wykazanie antynowotworowego działania fenofibratu oraz wyjaśnienie, przynajmniej częściowe, molekularnych podstaw tego działania są głównym rezultatem doświadczalnych prac habilitacyjnych, o charakterze aplikacyjnym. Współczesna terapia przeciwnowotworowa, pomimo stale dokonującego się postępu w zakresie skuteczności, selektywności i bezpieczeństwa stosowania, wciąż pozostaje bezradna w przypadku wielu nowotworów, w tym złośliwych zmian pochodzenia neuroektodermalnego, takich jak glejaki czy czerniaki. Odpowiedzią na ten problem jest z jednej strony poszukiwanie nowych leków precyzyjnie trafiających w słabe punkty komórek nowotworowych, ale z drugiej strony również analiza sprawdzonych, od dawna stosowanych klinicznie leków pod kątem całkiem nowych zastosowań. Ta druga ścieżka badawcza wpisuje się w trend, określane czasem w literaturze jako „**teaching old drugs new tricks**” (Gupta i in. 2013). Podejście to ma szereg zalet, m.in. wykorzystuje leki sprawdzone i na ogół bezpieczne lub takie, których skutki uboczne są dobrze znane i możliwe do zminimalizowania. Nie bez znaczenia jest również wymierna korzyść ekonomiczna, gdyż leki stare, dostępne jako preparaty generyczne, są znacznie tańsze niż nowe substancje objęte patentami. Zastosowanie fenofibratu jako leku

wspomagającego standardową chemioterapię ma duże szanse przynieść korzystne efekty terapeutyczne. Przykładem takiego zastosowania mogłaby być procedura umieszczenia w miejscu po resekcji guza biodegradowalnej matrycy uwalniającej fenofibrat przez długi czas, dzięki czemu możliwe jest osiągnięcie w miejscu docelowym stałego wysokiego stężenia substancji czynnej. Takie rozwiązanie proponujemy w pracy nr 6.

Wskazanie, że fenofibrat w postaci estru izopropylowego, a nie jako kwas fenofibrowy (po deestryfikacji) silnie działa na metabolizm mitochondrialny i wykazuje tendencję do lokalizowania się w błonach fosfolipidowych (praca nr 5 i 6), ma też bardzo ważne konsekwencje. Może to stać się przesłanką do syntezy analogów fenofibratu o większej hydrofobowości, niepodatnych (lub mniej podatnych) na hydrolizę prowadzoną przez esterazy komórkowe.

Wyniki świadczące o antymelanogennym, niezależnym od siebie działaniu receptora PPAR α oraz fenofibratu (praca nr 9), również zachęcają do klinicznego wykorzystania tego zjawiska w terapii czerniaka. Obecność melaniny chroni komórki czerniaka przed skutkami promieniowania jonizującego i generowanych w trakcie naświetlania wolnych rodników, w związku z czym zahamowanie melanogenezy przyczynia się do zwiększenia wrażliwości komórek czerniaka na radioterapię (Rozanowska i in. 1999, Brozyna i in. 2008, Brozyna i in. 2013). Sama melanina ma również zdolność pochłaniania i wiązania w swojej strukturze leków cytostatycznych i chemioterapeutyków, które są w konsekwencji gromadzone w melanosomach. W ten sposób preparaty te nie wchodzi w kontakt ze związkami docelowymi (kwasami nukleinowymi) i zostają pozbawione aktywności (Svensson i in. 2003, Chen i in. 2006, Xie i in. 2009). Jest to jeden z mechanizmów lekooporności czerniaka. Zahamowanie melanogenezy poprzez zastosowanie fenofibratu jako leku wspomagającego zarówno chemio- jak i radioterapię mogłoby stanowić przyczynek do poprawy skuteczności tych dwu, najczęściej stosowanych w przypadku czerniaka, form leczenia. W tym miejscu warto zauważyć, że fenofibrat z jednej strony indukując w komórkach czerniaka pewne cechy charakterystyczne dla różnicowania (zahamowanie proliferacji, ruchliwości i inwazyjności), a z drugiej strony blokując melanogenezę, może być ogniwem łączącym różne strategie leczenia czerniaka.

Podsumowując, wyniki zawarte w cyklu prac habilitacyjnych pozwalają uznać, że **postawiony cel naukowy został zrealizowany**, a najważniejsze wnioski można sformułować następująco:

- fenofibrat w sposób niezależny od PPAR α blokuje oddychanie mitochondrialne oraz przestawia metabolizm komórek nowotworowych, co prowadzi do kryzysu energetycznego
- fenofibrat, lecz nie jego metabolit kwas fenofibrowy, ma zdolność lokowania się w błonach fosfolipidowych zmieniając ich parametry fizyczne, a przez to i cechy biologiczne
- fenofibrat indukuje w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego biosyntezę i sekrecję ciał ketonowych, co jest o tyle ważne, że do tej pory zdolność do

ketogenezy była przypisywana tylko niektórym wyspecjalizowanym typom komórek, takim jak hepatocyty czy astrocyty

- aktywacja receptora PPAR γ włącza program różnicowania komórek linii melanocytarnej w odróżnieniu od PPAR α , którego poziom ekspresji i aktywność są odwrotnie proporcjonalne do pigmentacji
- fenofibrat w sposób niezależny od PPAR α hamuje ekspresję genów szlaku melanogenezy i zmniejsza poziom pigmentacji komórek czerniaka

Wszystkie te rezultaty przemawiają za zastosowaniem fenofibratu jako leku wspomagającego konwencjonalną terapię czerniaka i glejaka.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Oprócz głównego nurtu działalności badawczej skoncentrowanej wokół tematyki metabolizmu komórek nowotworowych, w moim dorobku znajdują się prace zrealizowane w ramach współpracy naukowej prowadzonej zarówno w zespole Katedry Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego, czyli w moim obecnym miejscu zatrudnienia, jak i wcześniej w okresie studiów magisterskich i doktoranckich w Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz staży badawczych w Center for Neurovirology, Temple University, Philadelphia, USA i Stanley S. Scott Cancer Center, Louisiana State University Health Sciences Center oraz Louisiana Cancer Research Center, New Orleans, USA. Publikacje te można podzielić na 6 grup tematycznych:

1. Biologia komórek upigmentowanych (w tym czerniaków) i melanogeneza
2. Działanie insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) na komórki prawidłowe i nowotworowe pochodzenia neuroektodermalnego
3. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych
4. Organoidy jelitowe otrzymane z zarodków kurzych jako narzędzie w badaniu fizjologii nabłonka przewodu pokarmowego
5. Działanie bioaktywnych związków zawartych w żywności (fityniany, enzymatycznie generowane pochodne inozytolu, cytrynina, katechiny, α tokoferol) na wybrane aspekty funkcjonowania organizmu i komórki
6. Zastosowanie preparatów enzymatycznych do ekstrakcji pektyn z materiału roślinnego

Przed uzyskaniem stopnia doktora moje zainteresowania naukowe koncentrowały się w dużej mierze wokół procesu melanogenezy i pigmentacji komórek jako markera ich stopnia zróżnicowania, zwłaszcza w kontekście transformacji nowotworowej. W trakcie studiów magisterskich najbardziej ciekawiła mnie biologia nowotworów, zarówno w ujęciu teoretycznym (matematyczne modelowanie wzrostu guza), jak doświadczalnym. Podejście teoretyczne w biologii

wiąże się z formułowaniem matematycznych modeli opisujących zjawiska biologiczne. W tej dziedzinie udało mi się również włączyć w projekt matematycznego opisu ruchu mięśni klatki piersiowej podczas oddychania, który został zrealizowany pod kierunkiem dr hab. Jana Grabackiego z Instytutu Mechaniki Budowli (Wydział Inżynierii Lądowej Politechniki Krakowskiej).

Publikacja z tej tematyki:

Grabacki J., Zdeb J., **Grabacka M.** (2000) Mechaniczny model procesu oddychania. Acta of Bioengineering and Biomechanics 2 Suppl. 1: 203–209. (IF brak, 3 pkt MNiSW)

Jeśli chodzi o działalność eksperymentalną, to pierwsze kroki w tej dziedzinie stawiałam w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biologii Molekularnej UJ (późniejszego Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ). Korzystając z przyjaznej i twórczej atmosfery starałam się aktywnie uczestniczyć w badaniach tam realizowanych. Pod kierunkiem dr hab. Przemysława Płonki oraz prof. dr hab. Krystyny Urbańskiej pracowałam na dwóch różniących się stopniem pigmentacji liniach chemicznego czerniaka Bomirskiego (BHM - Bomirski Hamster melanoma): amelanotycznej BHM Ab i melanotycznej BHM Ma oraz liniach czerniaka gerbili. Prace obejmowały m.in badanie zależności pomiędzy poziomem kwasów sjałowych ogółem (total sialic acid, TSA) oraz frakcji kwasów sjałowych związanych z lipidami (lipid-associated sialic acid, LASA) w surowicy krwi a stanem zwierząt z guzem pierwotnym czerniaka rosnącym w różnych lokalizacjach (podskórnice, w przedniej komorze oka) i stadiach zaawansowania choroby (przed i po pojawieniu się przerzutów). Kwasy sjałowe wchodzą w skład komponentów cukrowych glikoprotein i glikolipidów eksponowanych na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Komórki nowotworowe, w tym te znajdujące się w krwiobiegu w trakcie rozsiewania się z guza pierwotnego złuszczają ich fragmenty, przez co poziom TSA i LASA może mieć znaczenie prognostyczne w wielu typach nowotworów. Nasze badania wykazały istotny statystycznie spadek wartości LASA/TSA u chomików z czerniakiem w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi, niezależnie od lokalizacji i stopnia zaawansowania choroby.

Publikacja z tej tematyki:

Matysik A., Toczolowski J., **Grabacka M.**, Pająk S., Romanowska – Dixon B., Urbańska K., Solski J., Jakubowska– Stolarska B. (2001) Evaluation of serum sialic acid fractions as markers for Bomirski Melanoma Progression in hamsters. Eksperymentalnaya ta Klinichna Fizjologia i Biochimia 1(13): 24–26. (IF brak; pkt MNiSW brak)

W czasie studiów rozpoczęłam również badania nad wpływem syntetycznych ligandów dla receptorów PPARs (fenofibrat, bezafibrat, ciglitazon) na fizjologię komórek czerniaka w hodowli oraz w warunkach *in vivo*. Badania te realizowane były we współpracy z dr Wojciechem Plachą oraz prof. dr hab. Piotrem Laidlerem z Katedry Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum UJ. W tym okresie udało mi się zaobserwować niezwykle interesujący skutek doustnego podawania fenofibratu, jakim było prawie trzykrotne obniżenie liczby przerzutów z podskórnice rosnącego guza

czerniaka BHM Ma (Grabacka i in. 2004). Było to pierwsze doniesienie na temat antymetastatycznego działania fenofibratu w warunkach *in vivo*. Kontynuacją tych prac była realizacja projektu zatytułowanego „Analiza intensywności melanogenezy w ludzkich i zwierzęcych komórkach czerniaków traktowanych/nietraktowanych ligandami receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów”, na którego realizację uzyskałam finansowanie z Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2003, będąc wówczas na studiach doktoranckich. W Zakładzie Biofizyki prowadziliśmy wtedy także pilotażowe badania nad wpływem fenofibratu na pigmentację tkanek guzów pozyskiwanych od chomików, wykonując pomiary zawartości melaniny techniką spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). Owocem mojej współpracy z dr hab. Przemysławem Płonką była również praca przeglądowa dotycząca biosyntezy melanin u mikroorganizmów (Plonka i Grabacka 2006), która pozostaje jak dotąd moją najlepiej cytowaną pracą (126 cytowań, stan z dnia 31.01.2018).

Publikacje z tej tematyki:

Grabacka M., Placha W., Plonka P.M., Pajak S., Urbanska K., Laidler P., Slominski A. (2004) Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. Arch Derm Res 296: 54–58. (IF 1,217; 9 pkt MNiSW)

Plonka, P. M., **Grabacka M.** (2006) Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. Acta Biochim Pol 53 (3): 429-443. (IF 1,363; 10 pkt MNiSW)

Przed doktoratem odbyłam również staż naukowy w Center for Neurovirology, Temple University, Philadelphia, USA, gdzie pracowałam w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Krzysztofa Reissa. Praktyka i doświadczenie tam zdobyte były dla mnie ogromną pomocą w prowadzeniu dalszej kariery i inspiracją do samodzielnego stawiania pytań naukowych. Tematyka realizowanych badań koncentrowała się wokół roli insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) i aktywowanych przez niego szlaków transdukcji sygnału w regulacji proliferacji, ochrony przed apoptozą, w tym neuroprotekcji oraz wpływu na procesy naprawy uszkodzeń DNA. Wszystkie te zjawiska były badane zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych, o różnym pochodzeniu histologicznym. Badania obejmowały także analizę interakcji pomiędzy białkami wirulencji neuroonkogenego poliomawirusa JC a białkami wchodzącymi w skład szlaku sygnałowego receptora IGF-1.

Publikacje dotyczące tej tematyki:

Wang J.Y., Ho T., Trojanek J., Chintapalli J., **Grabacka M.**, Stoklosa T., Garcia F.U., Skorski T., Reiss K. (2005) Impaired homologous recombination DNA repair and enhanced sensitivity to DNA damage in prostate cancer cells exposed to anchorage-independence. Oncogene 24: 3748 -3758. (IF 6,872; 24 pkt MNiSW)

Wang J.Y., **Grabacka M.**, Marcinkiewicz C., Staniszewska I., Peruzzi F., Khalili K., Amini S., Reiss K (2006) Involvement of alpha1 beta1 integrin in insulin-like growth factor 1 – mediated protection of

PC12 neuronal processes from tumor necrosis factor alpha induced injury. *J Neurosci Res* 83 (1): 7 – 18. (IF 3,476; 24 pkt MNiSW)

Fiorilli P., Patridge D., Staniszewska I., Wang J. Y., **Grabacka M.**, So K., Marcinkiewicz C., Reiss K., Khalili K., Croul S. (2008) Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation. *Lab Invest* 88: 1143-1156. (IF 4,580; 24 pkt MNiSW)

Współpraca nawiązana podczas stażu w grupie prof. Reissa i zainicjowane przeze mnie tam badania nad molekularnym mechanizmem działania fenofibratu na przerzutowanie komórek czerniaka zaowocowały zgromadzeniem wyników, które wykazywały, że zależne od PPAR α zahamowanie aktywności kinazy Akt jest odpowiedzialne za blokowanie proliferacji komórek czerniaka w hodowli adherentnej i wzrostu w warunkach braku kontaktu z podłożem, zmniejszenie ruchliwości i tempa migracji oraz zwiększoną podatność na czynniki proapoptotyczne. Wyniki stanowiły część mojej rozprawy doktorskiej.

Publikacja z tej tematyki:

Grabacka M., Plonka P. M., Urbanska K., Reiss K. (2006) PPAR α activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down regulation of Akt. *Clin Cancer Res* 12: 3028-3036. (IF 6,177; 24 pkt MNiSW)

Po doktoracie kontynuowałam współpracę z grupą prof. Reissa, która przyniosła wymierny efekt w postaci kolejnych prac analizujących problem działania fenofibratu na szlaki sygnałowe aktywowane przez receptor IGF-1, apoptozę oraz powstawanie wolnych rodników tlenowych w komórkach glejaków oraz rdzeniaków.

Publikacje z tej tematyki:

Urbanska K., Pannizzo P., **Grabacka M.**, Croul S., Del Valle L., Khalili K., Reiss K. (2008) Activation of PPAR α inhibits IGF-I-mediated growth and survival responses in medulloblastoma cell lines. *Int J Cancer* 123: 1015-1024. (IF 4,734; 24 pkt MNiSW)

Drukala J., Urbanska K., Wilk A., **Grabacka M.**, Wybieralska E., Del Valle L., Madeja Z., Reiss K. (2010) ROS accumulation and IGF-1R inhibition contribute to fenofibrate / PPAR α – mediated inhibition of Glioma cell motility in vitro. *Mol Cancer* 9:159. (IF 3,779; 32 pkt MNiSW)

Wilk A., Urbanska K., **Grabacka M.**, Mullinax J., Marcinkiewicz C., Impastato D., Estrada J., Reiss K. (2012) Fenofibrate-induced nuclear translocation of FoxO3A triggers Bim-mediated apoptosis in glioblastoma cells in vitro. *Cell Cycle* 11: 2660-2671. (IF 5,321, 30 pkt MNiSW)

W dalszym ciągu moje zainteresowania badawcze obejmowały również problematykę biologii komórek upigmentowanych i rolę melanogenezy w fizjologii komórek skóry, co pozwoliło

na kontynuację owocnej współpracy z zespołem dr hab. Przemysława Płonki i dr hab. Agnieszki Wolnickiej-Głubisz z Zakładu Biofizyki WBBiB UJ.

Publikacja z tej tematyki:

Wolnicka-Głubisz A, Pecio A, Podkowa D, Plonka PM, **Grabacka M.** (2013) HGF/SF increases number of skin melanocytes but does not alter quality or quantity of follicular melanogenesis. PLoS One 8:e74883. (IF 3,534; 40 pkt MNiSW)

Krótko po obronie pracy doktorskiej, znalazłam zatrudnienie w Katedrze Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego, gdzie pracuję do dzisiaj. Zmiana otoczenia była dla mnie okazją do poszerzenia horyzontów naukowych o tematykę z zakresu nauk o żywności i żywieniu, oraz zagadnienia bliżej związane z przemysłem. Udało mi się aktywnie włączyć w projekty koleżanek i kolegów z Katedry i wziąć udział w badaniach dotyczących:

- opracowania metod hodowli organoidów uzyskiwanych z nabłonka jelita zarodków kurzych, jako modelu do analizy fizjologii przewodu pokarmowego:

Pierzchalska M., **Grabacka M.**, Michalik M., Zyla K., Pierzchalski P. (2012) Prostaglandin E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. Biotechniques 5: 307 – 315. (IF 2,399; 25 pkt MNiSW)

Pierzchalska M., **Grabacka M.** (2016) The potential role of some phytochemicals in recognition of mitochondrial damage-associated molecular patterns. Mitochondrion. 30:24-34. (IF 3,704; 30 pkt MNiSW)

Pierzchalska M., Panek M., Czyrnek M., **Grabacka M.** (2016) The Three-Dimensional Culture of Epithelial Organoids Derived from Embryonic Chicken Intestine. Methods Mol Biol (Clifton, N.J.) (IF brak, pkt MNiSW brak)

Pierzchalska M., Panek M., **Grabacka M.** (2017) Probiotic Lactobacillus acidophilus bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and myofibroblasts. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 53:7-18. (IF 1,875; 30 pkt MNiSW)

Panek M., **Grabacka M.**, Pierzchalska M. (2018) The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture. Cytotechnology *in press*. DOI: 10.1007/s10616-018-0194-8. (IF 1,857; 20 pkt MNiSW)

- wpływu suplementacji pasz w mio-inozytol, fitazy oraz produkty enzymatycznej hydrolizy fitynianów na fizjologię kur niosek i kurcząt brojlerów:

Zyla K., **Grabacka M.**, Pierzchalska M., Dulinski R., Starzynska - Janiszewska A. (2013) Effect of inositol and phytases on hematological indices and α -1 acid glycoprotein levels in laying hens fed

phosphorus-deficient corn-soybean meal based diets. Poultry Sci 91: 199-204. (IF 1,544; 40 pkt MNiSW)

Zyla K, Dulinski R, Pierzchalska M., **Grabacka M.**, Jozefiak D, Swiatkiewicz S. (2013) Phytases and myo-inositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers J Anim Feed Sci 22: 56-62. (IF 0,591; 20 pkt MNiSW)

- optymalizacji ekstrakcji pektyn w wytlóków jabłkowych przy użyciu wieloaktywnościowych preparatów enzymatycznych:

Wikiera A., Mika M., **Grabacka M.** (2015) Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. Food Hydrocolloids 44: 156-161. (IF 3,858; 45 pkt MNiSW)

- wpływu dodatku antyutleniaczy stabilizujących tłuszcze (butylohydroksytoluen BHT, tokoferol, katechiny pochodzące z herbaty zielonej) na trawienie i biodostępność związków odżywczych:

Mika M., Wikiera A., Antonczyk A., **Grabacka M.** (2017) Food stabilizing antioxidants increase nutrient bioavailability in the in vitro model. J Am Col Nutr 36:579-585. (IF 2,107; 30 pkt MNiSW)

Jednocześnie w 2015 roku nawiązałam współpracę z doc. inż. Marcelą Capcarovą (Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Nitra, Słowacja), której grupa zajmuje się badaniem działania toksyn pochodzenia mikrobiologicznego, które mogą zanieczyszczać żywność, na fizjologię organizmu i komórki. W ramach programu środkowoeuropejskiej wymiany naukowej CEEPUS III w naszym laboratorium gościła doktorantka z Nitry, a nasza współpraca zaowocowała wspólną publikacją na temat działania cytryniny i resweratrolu na proliferujące oraz zróżnicowane komórki linii Caco-2, stanowiące model nabłonka jelita:

Bovdisova I., **Grabacka M.**, Capcarova M. (2016) Interaction of citrinin and resveratrol and their effect on Caco-2 cell growth. J Centr Eur Agric 17: 1287-1297. (IF brak; 14 pkt MNiSW)

6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

W moim życiu zawodowym działalność dydaktyczna znajduje ważne miejsce, nie tylko z powodu poczucia misji, ale też z racji niebagatelnych nakładów czasowych (330-450 zrealizowanych godzin dydaktycznych rocznie, na etacie adiunkta). Uważam, że kontakt z ciekawymi świata młodymi ludźmi jest przywilejem nauczyciela akademickiego, który pomaga zachować otwarty umysł, ale też wymaga nieustannej pracy w zakresie samokształcenia. Staram się stale podnosić swoje kwalifikacje w zakresie prowadzenia zajęć dydaktycznych, m.in. poprzez ukończenie rocznego studium pedagogicznego (rok akad. 2011/2012), organizowanego przez Centrum Pedagogiki i Psychologii Politechniki Krakowskiej.

W ramach realizacji zadań dydaktycznych prowadzę zajęcia (w formie wykładów, ćwiczeń laboratoryjnych, ćwiczeń terenowych oraz seminariów) dla studentów różnych kierunków, studiujących na Wydziale Technologii Żywności i Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego, studentów zagranicznych przyjeżdżających w ramach programu Erasmus oraz studentów biotechnologii Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej (Tabela 2). Część z tych zajęć przygotowałam samodzielnie i jest to mój autorski wkład w ofertę dydaktyczną uczelni.

Tabela 2. Zestawienie prowadzonych zajęć dydaktycznych

Przygotowane samodzielnie wykłady	Wymiar godzinowy
Enzymy żywności i ich analityka	15
Zastosowanie preparatów enzymatycznych w technologii żywności	20
Biochemia białek	15
Immunologia	15
Wprowadzenie do technik manipulacji DNA	15
Nowoczesne techniki analityczne w biotechnologii	5
Przygotowane samodzielnie ćwiczenia laboratoryjne w ramach kursów	
Biotechnologia żywności	5
Nowoczesne techniki analityczne w biotechnologii	15
Immunologia	15
Food enzymes	10
Projektowanie technologiczne zakładów przemysłu spożywczego - produkcja biotechnologiczna	30
Inne prowadzone zajęcia	
Biochemia	60
Wybrane zagadnienia z enzymologii w przetwórstwie surowców pochodzenia roślinnego i zwierzęcego	30
Technologia enzymów	15

Jedną z najbardziej twórczych dziedzin aktywności dydaktycznej jest opieka nad magistrantami oraz studentami wykonującymi prace inżynierskie. Uważam, że jest to również ważna ścieżka rozwoju naukowego dla uczonego. Do chwili obecnej liczba wypromowanych przeze mnie magistrów wynosi 22 (w tym 13 uzyskujących stopień magistra inżyniera biotechnologii oraz 9 magistra inżyniera technologii żywności), natomiast 33 studentów uzyskało

pod moim kierunkiem stopień inżyniera (11 z biotechnologii, 22 z technologii żywności i pokrewnych kierunków realizowanych na Wydziale Technologii Żywności). Dwie promowane przeze mnie studentki otrzymały II nagrody w konkursie na najlepszą pracę magisterską w konkursie im. prof. Franciszka Nowotnego, organizowanym przez Małopolski Oddział Wojewódzkiego Stowarzyszenia Naukowo-Technicznego Inżynierów i Techników Przemysłu Spożywczego (rok 2013 i 2015). Część z tych studentów była przeze mnie zaangażowana w realizację projektów i zostali współautorami publikacji. Dzięki ciągłej współpracy w pracownikami Zakładu Biofizyki WBBiB Uniwersytetu Jagiellońskiego zdarza mi się recenzować prace magisterskie tam realizowane: pod kierunkiem dr hab. Przemysława Płonki (2 prace) oraz dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker (1 praca).

Oprócz opieki indywidualnej nad studentami, biorę również udział w pracach komisji przeprowadzających egzaminy inżynierskie dla studentów kierunków: *Technologia żywności i żywienie człowieka*, *Bioinżynieria i bioprocesy* oraz *Biotechnologia*, oceniając odpowiedzi z dziedziny biotechnologii żywności. Włączyłam się także we współpracę z kołem naukowym studentów Biotechnologii „Helisa”, z siedzibą na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa UR, a także z Samorządem Doktorantów Uniwersytetu Rolniczego podczas organizacji IV Międzynarodowej Konferencji Doktorantów „Wielokierunkowość badań w rolnictwie i leśnictwie” w 2015 roku. W ramach działalności popularyzatorskiej brałam udział w przygotowaniu w naszej Katedrze warsztatów laboratoryjnych dla dzieci w wieku szkolnym, obejmujących izolację DNA z żywności przetworzonej i nieprzetworzonej, prowadzonych podczas „Małopolskiej Nocy Naukowców”, 27.09.2013.

W ramach obowiązków nauczyciela akademickiego brałam lub obecnie biorę udział w działalności organizacyjnej prowadzonej na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego, jako członek komisji:

- Wydziałowej Komisji ds. Funduszu Stypendialnego (2009-12, 2012-15)
- Wydziałowej Komisji ds. Współpracy Międzynarodowej (2016-20)
- Grupy Inicjatywnej ds. Pozyskiwania Funduszy

Oprócz tego, jednym z moich osiągnięć była organizacja Wydziałowej Pracowni Biologii Molekularnej i Pracowni Hodowli Komórkowych, stworzonej w 2008 roku. Byłam odpowiedzialna m.in. za plan aranżacji pomieszczeń, sporządzenie listy niezbędnego wyposażenia i aparatury o określonych parametrach, a także współpracę z pracownikami Działu Aparatury, Działu Zamówień Publicznych oraz przedstawicielami firm oferujących poszukiwane przez nas urządzenia, w trakcie finalizowania zakupu sprzętu.

7. Podsumowanie całości dorobku naukowego

Wśród wszystkich wymienionych w tym autoreferacie publikacji, które powstały przy moim udziale, autorem pierwszym i korespondencyjnym byłam w 9 pracach, pierwszym autorem (ale nie korespondencyjnym) w 1 pracy, autorem nadrzędnym (ang. *senior author*) w 5 pracach.

Podsumowanie danych bibliograficznych dorobku przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Zestawienie dorobku publikacyjnego

	Cykl publikacji (osiągnięcie naukowe)			Pozostałe prace			Łączny dorobek naukowy		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Doświadczalne	5	17,867	124	18	53,921	455	22	69,931	559
Teoretyczne	0	-	-	1	-	3	1	-	3
Przeglądowe	4	5,768	60	2	5,067	40	6	10,804	100
Rozdziały w monografiach anglojęzycznych	0	-	-	1	-	-	1	-	-
Doniesienia konferencyjne opublikowane w czasopismach, widoczne w bazie Web of Science	0			4			4		
Razem	9	23,635	184	26	58,988	498	35	82,623	682
W tym: dorobek przed doktoratem	-	-	-	9	19,105	94	9	19,105	94
Pod doktoracie	9	23,635	184	17	39,883	404	26	63,518	588
Indeks Hirscha							13		
Całkowita liczba cytowań (wg Web of Science, 7.03.2018)							593		
Bez autocytaowań							542		

Małgorzata Griebel

Bibliografia

1. Anbalagan, M., B. Huderson, L. Murphy and B. G. Rowan (2012). "Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease." *Nucl Recept Signal* **10**: e001.
2. Berger, J. and D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." *Annu Rev Med* **53**: 409-435.
3. Bhaskara, V. K., I. Mohanam, J. S. Rao and S. Mohanam (2012). "Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells." *PLoS One* **7**(2): e30905.
4. Boiko, A. D., O. V. Razorenova, M. van de Rijn, S. M. Swetter, D. L. Johnson, D. P. Ly, P. D. Butler, G. P. Yang, B. Joshua, M. J. Kaplan, M. T. Longaker and I. L. Weissman (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." *Nature* **466**(7302): 133-137.
5. Bradshaw, A. R., A. C. Wickremesekera, H. D. Brasch, A. M. Chibnall, P. F. Davis, S. T. Tan and T. Itinteang (2016). "Glioblastoma Multiforme Cancer Stem Cells Express Components of the Renin-Angiotensin System." *Front Surg* **3**: 51.
6. Brem, H., S. Piantadosi, P. C. Burger, M. Walker, R. Selker, N. A. Vick, K. Black, M. Sisti, S. Brem, G. Mohr and et al. (1995). "Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group." *Lancet* **345**(8956): 1008-1012.
7. Brozyna, A. A., W. Jozwicki, J. A. Carlson and A. T. Slominski (2013). "Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma." *Hum Pathol* **44**(10): 2071-2074.
8. Brozyna, A. A., L. VanMiddlesworth and A. T. Slominski (2008). "Inhibition of melanogenesis as a radiation sensitizer for melanoma therapy." *Int J Cancer* **123**(6): 1448-1456.
9. Burk, D. and A. L. Schade (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 270-272.
10. Cheli, Y., S. Giuliano, N. Fenouille, M. Allegra, V. Hofman, P. Hofman, P. Bahadoran, J. P. Lacour, S. Tartare-Deckert, C. Bertolotto and R. Ballotti (2012). "Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells." *Oncogene* **31**(19): 2461-2470.
11. Chen, K. G., J. C. Valencia, B. Lai, G. Zhang, J. K. Paterson, F. Rouzaud, W. Berens, S. M. Wincovitch, S. H. Garfield, R. D. Leapman, V. J. Hearing and M. M. Gottesman (2006). "Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 9903-9907.
12. DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli and C. B. Thompson (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19345-19350.
13. Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." *Endocr Rev* **20**(5): 649-688.
14. Grabacka, M., W. Placha, P. M. Plonka, S. Pajak, K. Urbanska, P. Laidler and A. Slominski (2004). "Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate." *Arch Dermatol Res* **296**(2): 54-58.
15. Grabacka, M., P. M. Plonka, K. Urbanska and K. Reiss (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt." *Clin Cancer Res* **12**(10): 3028-3036.
16. Gupta, S. C., B. Sung, S. Prasad, L. J. Webb and B. B. Aggarwal (2013). "Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs." *Trends Pharmacol Sci* **34**(9): 508-517.
17. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
18. Huang, T. Li, X. Li, L. Zhang, L. Sun, X. He, X. Zhong, D. Jia, L. Song, G. L. Semenza, P. Gao and H. Zhang (2014). "HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression." *Cell Rep* **8**(6): 1930-1942.
19. Icard, P. and H. Lincet (2012). "A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1826**(2): 423-433.
20. Issemann, I. and S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." *Nature* **347**(6294): 645-650.
21. Kersten, S., B. Desvergne and W. Wahli (2000). "Roles of PPARs in health and disease." *Nature* **405**(6785): 421-424.
22. Kersten, S., J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting." *J Clin Invest* **103**(11): 1489-1498.
23. Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza and C. V. Dang (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia." *Cell Metab* **3**(3): 177-185.
24. LeBleu, V. S., J. T. O'Connell, K. N. Gonzalez Herrera, H. Wikman, K. Pantel, M. C. Haigis, F. M. de Carvalho, A. Damascena, L. T. Domingos Chinen, R. M. Rocha, J. M. Asara and R. Kalluri (2014). "PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis." *Nat Cell Biol* **16**(10): 992-1003, 1001-1015.

25. Liu, J. and S. R. Farmer (2004). "Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes." *J Biol Chem* **279**(43): 45020-45027.
26. Liu, J., H. Wang, Y. Zuo and S. R. Farmer (2006). "Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin." *Mol Cell Biol* **26**(15): 5827-5837.
27. Maurer, G. D., D. P. Brucker, O. Bahr, P. N. Harter, E. Hattingen, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, J. P. Steinbach and J. Rieger (2011). "Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy." *BMC Cancer* **11**: 315.
28. Mohlin, S., C. Wigerup, A. Jogi and S. Pahlman (2017). "Hypoxia, pseudohypoxia and cellular differentiation." *Exp Cell Res* **356**(2): 192-196.
29. Mullen, A. R., W. W. Wheaton, E. S. Jin, P. H. Chen, L. B. Sullivan, T. Cheng, Y. Yang, W. M. Linehan, N. S. Chandel and R. J. DeBerardinis (2011). "Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria." *Nature* **481**(7381): 385-388.
30. Najib, J. (2002). "Fenofibrate in the treatment of dyslipidemia: a review of the data as they relate to the new suprabioavailable tablet formulation." *Clin Ther* **24**(12): 2022-2050.
31. Plonka, P. M. and M. Grabacka (2006). "Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects." *Acta Biochim Pol* **53**(3): 429-443.
32. Poulos, S. P., M. V. Dodson, M. F. Culver and G. J. Hausman (2016). "The increasingly complex regulation of adipocyte differentiation." *Exp Biol Med (Maywood)* **241**(5): 449-456.
33. Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly and C. K. Glass (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* **391**(6662): 79-82.
34. Robey, R. B. and N. Hay (2009). "Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis." *Semin Cancer Biol* **19**(1): 25-31.
35. Rozanowska, M., T. Sarna, E. J. Land and T. G. Truscott (1999). "Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals." *Free Radic Biol Med* **26**(5-6): 518-525.
36. Sarraf, P., E. Mueller, D. Jones, F. J. King, D. J. DeAngelo, J. B. Partridge, S. A. Holden, L. B. Chen, S. Singer, C. Fletcher and B. M. Spiegelman (1998). "Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma." *Nat Med* **4**(9): 1046-1052.
37. Seyfried, T. N., R. Flores, A. M. Poff, D. P. D'Agostino and P. Mukherjee (2015). "Metabolic therapy: a new paradigm for managing malignant brain cancer." *Cancer Lett* **356**(2 Pt A): 289-300.
38. Seyfried, T. N., M. A. Kiebish, J. Marsh, L. M. Shelton, L. C. Huysentruyt and P. Mukherjee (2011). "Metabolic management of brain cancer." *Biochim Biophys Acta* **1807**(6): 577-594.
39. Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* **63**(18): 5821-5828.
40. Svensson, S. P., S. Lindgren, W. Powell and H. Green (2003). "Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells." *Pigment Cell Res* **16**(4): 351-354.
41. Tordjman, J., G. Chauvet, J. Quette, E. G. Beale, C. Forest and B. Antoine (2003). "Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells." *J Biol Chem* **278**(21): 18785-18790.
42. Valtonen, S., U. Timonen, P. Toivanen, H. Kalimo, L. Kivipelto, O. Heiskanen, G. Unsgaard and T. Kuurne (1997). "Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study." *Neurosurgery* **41**(1): 44-48; discussion 48-49.
43. Wagstaff, A. J. and K. L. Goa (2002). "Rosiglitazone: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus." *Drugs* **62**(12): 1805-1837.
44. Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-314.
45. Weinhouse, S. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 267-269.
46. Xie, T., T. Nguyen, M. Hupe and M. L. Wei (2009). "Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes." *Cancer Res* **69**(3): 992-999.