



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Dr Joanna Dulińska-Litewka

**KATEDRA BIOCHEMII LEKARSKIEJ
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM W KRAKOWIE**

Autoreferat

Intensyfikacja funkcjonalna kinazy Akt w komórkach prostaty jako efekt utraty androgenozależności w hiperplastycznym i nowotworowym gruczole stercza ludzkiego

KRAKÓW, kwiecień 2019

1. Imię i Nazwisko.

Joanna Dulińska-Litewka

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

2a. Stopień naukowy doktora

Data nadania stopnia naukowego doktora: 20.11.1998.

(Rada Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Jagielloński, Kraków).

Dziedzina i dyscyplina nadanego stopnia: nauki biologiczne, biochemia

Promotor: dr hab. Piotr Laidler

Recenzenci: prof. dr hab. Aleksandra Kubicz; prof. dr hab. Zdzisław Szafran.

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Wpływ hormonów steroidowych na transkrypcje i translacje mRNA dla kwaśnej fosfatazy stercza ludzkiego.**

2b. Tytuł zawodowy magistra

Data nadania tytułu zawodowego magistra: 08.07.1985.

(Rada Wydziału, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie,

praca wykonana w Akademii Medycznej, Instytucie Biochemii Lekarskiej)

Tytuł pracy magisterskiej: Sieciowanie kwaśnej fosfatazy z prostaty szeregiem homologicznym kwasów dwukarboksylowych i diimidoestrów oraz własności katalityczne modyfikowanego enzymu w rozpuszczalnikach niewodnych.

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Włodzimierz S. Ostrowski – Akademia Medyczna

Prof. dr hab. Wanda Żankowska-Jasińska - Uniwersytet Jagielloński

2c. Dyplom teologa

Studium przywydziałowe - Papieska Akademia Teologiczna w Krakowie 1985

2d. Dyplom choreografa

Studium - Kurs kwalifikacyjny choreografa, Instruktor tańca, choreograf 1985

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

X.1985-XII.1985 stażysta, Instytut Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna

I.1986 - X.1987 pracownik naukowo-techniczny, chemik, Instytut Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna

XI.1987 - IX.1998 asystent, Instytut Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna

X.1998 - IX.1999 wykładowca, Instytut Biochemii Lekarskiej, Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

X.1999 - II.2010 adiunkt, Katedra Biochemii Lekarskiej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

III.2010 - obecnie st. wykładowca z dr, Katedra Biochemii Lekarskiej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

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

Podstawą do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego (osiągnięciem naukowym) jest **cykl pięciu powiązanych tematycznie publikacji naukowych**.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Intensyfikacja funkcjonalna kinazy Akt w komórkach prostaty jako efekt utraty androgenozależności w hiperplastycznym i nowotworowym gruczole stercza ludzkiego

4.2. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Zestawienie publikacji wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi oraz informacjami na temat mojego wkładu w powstanie prac przedstawiono w poniższej Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie publikacji stanowiących osiągnięcie

Publikacja	IF z roku opublikowania	Punkty MNiSW
1. Joanna Dulińska-Litewka, James A. McCubrey, Piotr Laidler. Increased AKT signaling resulting from the loss of androgen responsiveness in prostate cancer. Curr. Med. Chem. 2013 : Vol. 20, nr 1, s. 144-157, Mój wkład w przygotowaniu tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, potwierdzeniu wiarygodności przeprowadzonych eksperymentów, opracowaniu i interpretacji wyników badań, na przygotowaniu wszystkich rycin i tabel, na analizie aktualnej literatury i przygotowaniu cytacji. Do każdego badania przeprowadziłam analizę statystyczną. Mój wkład polegał także na zapewnieniu finansowania prowadzonych badań, napisaniu manuskryptu i pełnieniu wszystkich obowiązków wynikających ze statusu <u>autora korespondencyjnego</u>. Swój udział procentowy szacuję na 85%.	3.715	40

2. Joanna Dulińska-Litewka, Gerd Schmitz, Aldona Kieć-Dembińska, Piotr Laidler. Is the effect of β-carotene on prostate cancer cells dependent on their androgen sensitivity? w: Carotenoids and vitamin A in translational medicine.: red. Olaf Sommerburg, Werner Siems, Klaus Boca Raton : CRC Press / Taylor & Francis Group, 2013 s. 203-224 p-ISBN: 978-1-4398-5526-3 Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, określenie wiarygodności prowadzonych eksperymentów, interpretacji wyników badań, wykonaniu doświadczeń, których wyniki zamieszczono na ryc: 2 - 6, analizie danych eksperymentalnych, których wyniki zamieszczono w tabelach 11.2, 11.3, 11.4, 11.5. Mój wkład polegał także na zapewnieniu finansowania prowadzonych badań w zakresie hodowli komórkowej, badaniach proliferacji, cytotoksyczności, migracji, ekspresji genów, izolacji RNA, przeprowadzeniu badań z zastosowaniem RQ-PCR, komory Boydena i techniki Western blotting, napisaniu manuskryptu i pełnieniu wszystkich obowiązków wynikających ze statusu <u>autora korespondencyjnego</u>. Swój udział procentowy szacuję na 75%.	wyniki prezentowane w rozdziale w książce	
3. Piotr Laidler, Joanna Dulińska, Sławomir Mrozicki. Does the inhibition of c-myc expression mediate the anti-tumor activity of PPAR's ligands in prostate cancer cell lines? Arch. Biochem. Biophys. 2007 : Vol. 462, nr 1, s. 1-12, Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wyprowadzeniu linii komórkowych z materiału śródoperacyjnego (współpraca z Kliniką Urologii Szpitala Wojskowego i Patomorfologii Szpitala Klinicznego UJ), prowadzeniu hodowli komórkowych a następnie określeniu wiarygodności prowadzonych eksperymentów i interpretacji wyników badań, które umieszczono na 5 rycinach i schemacie. Mój wkład polegał także na zapewnieniu finansowania prowadzonych badań, napisaniu manuskryptu i pełnieniu wszystkich obowiązków wynikających ze statusu <u>autora korespondencyjnego</u>. Swój udział procentowy szacuję na 65%.	2.578	20
4. Joanna Dulińska, Dorota Gil, Jacek Zagajewski, Jadwiga Hartwich, Marek Bodzioch, Aldona Dembińska-Kieć, Thomas Langmann, Gerd Schmitz, Piotr Laidler.	2.382	20

Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis. 2005 : Vol. 1740, nr 2, s. 189-201 ; Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, zapewnieniu odpowiednich warunków do przeprowadzenia doświadczeń z beta-karotenem, prowadzeniu hodowli komórkowej, traktowaniu komórek zaplanowanymi czynnikami, przeprowadzeniu analizy wiarygodności prowadzonych oznaczeń ze względu na prace z światłoczułymi czynnikami, izolacji białek i RNA a następnie przeprowadzeniu analizy RQ-PCR i Western blotting, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu rysunków, zebraniu literatury i napisaniu manuskryptu. Mój wkład polegał także na zapewnieniu finansowania w zakresie badania ekspresji genów na poziomie białka. Swój udział procentowy szacuję na 65%.		
5. Joanna Dulińska, Piotr Laidler, Maria Łabędź. Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors. Acta Biochim. Pol. 2002 : Vol. 49, nr 2, s. 357-368, Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, i przeprowadzeniu doświadczeń a zwłaszcza precyzyjnym przygotowaniu materiału śródoperacyjnego do hodowli tkankowych jak również wyprowadzeniu komórek pierwotnych z tkanek, enzymatycznym i histochemicznym oznaczaniu PAP w komórkach oraz analizie metodą Northern blotting. Po przeprowadzonej analizie danych przygotowałam rysunki i cytowanie aktualnej literatury. Mój wkład polegał także na napisaniu publikacji jak również zapewnieniu finansowania prowadzonych badań i pełnieniu wszystkich obowiązków wynikających ze statusu <u>autora korespondencyjnego</u>. Swój udział procentowy szacuję na 80%.	0,6	8.00

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

4.3.1. Wprowadzenie

Nowotwór prostaty (prostate cancer; PC), pomimo dynamicznego postępu medycyny, poszukiwania i wprowadzania do leczenia nowych technik terapeutycznych, stanowi drugi

pod względem liczby zachorowań (15,5%) i trzeci pod względem częstości zgonów (11,9%) nowotwór złośliwy wśród mężczyzn w populacji polskiej [1, 2, 3]. Główną przyczyną zgonów u pacjentów nie są jednak guzy pierwotne, lecz przerzuty do innych narządów (*metastasis*) tworzone m.in. przez krążące we krwi komórki nowotworowe. Istotnym elementem leczenia PC jest terapia hormonalna – tzw. blokada (ablacja) androgenowa (*androgen depletion therapy*; ADT) bazująca na pozbawieniu komórek nowotworu stymulującego działania androgenów przez chirurgiczną lub chemiczną kastrację, albo stosowanie antagonistów testosteronu. Pomimo pozytywnego efektu terapii z zastosowaniem ADT w początkowym etapie leczenia (nawet 80% leczonych pacjentów), jej skuteczność wystarcza zaledwie na około 24-30 miesięcy, po czym obserwuje się progresję choroby oznaczającą spadek rokowania [4]. Nowotwór, którego wzrost utrzymuje się pomimo stosowania wydawałoby się skutecznej ADT, określa się mianem raka prostaty opornego na kastrację (*castration-resistant prostate cancer*; CRPC) [4].

Gruzoł prostaty jest narządem pełniącym funkcję wydzielniczą, a prawidłowa regulacja działania gruczołu krokowego determinuje odpowiednie funkcjonowanie plemników i wpływa na płodność u mężczyzn [5]. Wydzielina z gruczołu prostaty zawiera enzymy proteolityczne, mikroseminoproteinę beta (MSMB), cynk, kwaśną fosfatazę prostatową (PAP – *prostatic acid phosphatase*) oraz antygen specyficzny gruczołu stercza (PSA – *prostate specific antigen*), a ich regulacja jest uzależniona od androgenów. PSA należy do rodziny tkankowych kalikrein i jest proteazą serynową produkowaną w komórkach epithelialnych prostaty. Wzmoczona produkcja PSA występuje w raku prostaty (PC), co pozwoliło na wytypowanie PSA jako głównego markera w diagnostyce PC. PSA jest wydzielany w postaci nieaktywnej (proPSA) do przewodów odprowadzających z gruczołu prostaty, które następnie uchodzą do cewki moczowej. Hydrolityczne odszczepienie siedmiu aminokwasów od N-końca z udziałem kalikreiny 2 i 4 aktywuje PSA, który nabiera zdolności degradacji seminogeliny 1 i 2, dzięki czemu upłynnia nasienie [6]. PAP, jako fosfomonoesteraza, powstaje w komórkach epithelialnych prostaty. Po utworzeniu homodimerów z dwóch katalitycznie nieaktywnych podjednostek staje się enzymatycznie aktywna, dzięki czemu może regulować proliferację komórek prostaty przez różne szlaki. Receptor HER (ErB-2), dzięki fosforylacji reszty tyrozynowej we wczesnej fazie rozwoju raka prostaty, jako homodimer, aktywuje kinazę Ser/Thr ERK1/2 oraz MAPK, co prowadzi do proliferacji komórek. Aktywowany HER-2 może także oddziaływać na szlak Akt (poprzez stymulację sygnalizacji PI3K), a ten na podziały komórkowe zależne od receptora androgenowego (AR). PAP bierze udział w hamowaniu szlaków związanych z HER-2 poprzez proces defosforylacji, a jednocześnie hamuje Akt, co wpływa negatywnie na wzrost androgenoniezależnych komórek raka prostaty [7, 8]. Prowadzone badania kliniczne wskazują na negatywną korelację ekspresji PAP z progresją PC [9]. Warto również wspomnieć, że na podstawie ostatnio prowadzonych badań, PAP ma szansę odzyskać dawniej utraconą funkcję markera w PC i odnaleźć zastosowanie jako wskaźnik określający, którzy pacjenci z PC we wczesnej fazie uzyskają korzyści z agresywnej terapii adiuwantowej [9].

Rozwój i funkcja prawidłowych komórek gruczołu krokowego są wysoce zależne od wpływu androgenów, a uniezależnienie od nich (androgenoniezależność) jest następstwem zmian w funkcjonowaniu szlaków molekularnych komórek nowotworu. Przejście na stronę androgenoniezależności jest warunkiem koniecznym do wzrostu CRPC. Do potencjalnych

mechanizmów rozwoju androgenoniezależności należą: mutacja receptora androgenowego (AR), zmiana w poziomie ekspresji białek koregulatorów AR, zwiększona ekspresja enzymów steroidogenezy zapewniająca endogenne źródło androgenów oraz zwiększona sygnalizacja przez ścieżki aktywujące AR niezależnie od liganda lub też omijające działanie AR (bypassing pathways) [10]. Dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych metod terapii PC, nowych związków, które by zapobiegały rozwojowi androgenoniezależności i nieskuteczności terapii pierwszego rzutu.

Pojawia się zatem pytanie, jakiej odpowiedzi, jakiego rozwiązania szukamy, aby zatrzymać obserwowaną lawinę progresji nowotworu?? Które szlaki sygnalizacyjne mogą odpowiedzieć pozytywnie hamując proliferację komórek jednocześnie redukując nowotworzenie komórek prostaty? Poszukiwanie odpowiedniego mechanizmu jak i wyjaśnienie tych zależności stało się celem moich badań.

W swojej dotychczasowej pracy skupiałam się m.in. na regulacji aktywności obu białek PAP i PSA w tkance prawidłowej, hiperplastycznej jak i nowotworowej w zależności od poziomu androgenów jak i stopnia zróżnicowania komórek w badanych tkankach.

4.3.2. Gruczoł stercza – procesy regulacji

4.3.2.1. Receptory jądrowe

Wzrost i funkcja gruczołu stercza zależy od licznych czynników, lecz centralny punkt regulacji to receptor androgenowy (AR) zaliczany do grupy receptorów jądrowych o masie cząsteczkowej 110 kDa, ale wykazano również obecność krótszych form AR o masie cząsteczkowej 80-90 kDa, będących produktami alternatywnego splicingu mRNA AR. Warianty te charakteryzują się niepełną budową AR (najczęściej brakiem LBD), jednak zachowują zdolność wiązania DNA i funkcji transkrypcyjnej, stanowiąc istotny element regulacji androgenoniezależnych komórek raka prostaty (CRPC). Obecność AR potwierdzono w wielu tkankach jak skóra, mięśnie szkieletowe, mózg, serce, gruczoły łzowe [11]. Androgeny są podstawowymi ligandami aktywującymi AR, a najważniejszą rolę odgrywa produkowany w jądrach testosteron, który, docierając do docelowego miejsca, zostaje szybko i nieodwracalnie przekształcony do aktywniejszego dihydrotestosteronu (DHT) przy udziale 5-alfa-reduktazy [12, 13, 14]. AR niezwiązany z ligandem tworzy kompleks z białkami szoku termicznego (Hsp) często pełniącymi funkcję chaperonów (Hsp56, 70, 90 oraz p23), natomiast w obecności liganda AR ulega procesowi translokacji do jądra komórkowego i wpływa na proces transkrypcji [15]. Aktywny jądrowy AR wiąże się z sekwencjami ARE (androgen response element), których obecność wykazano w proksymalnym promotorze PSA na dwóch pozycjach: -170 (ARE-I) i -394 (ARE-II) [16, 17, 18].

Do czynników mogących mieć wpływ na aktywność AR zaliczamy czynniki wzrostu (EGF, IGF-1, czynnik wzrostu keratynocytów), cytokiny (IL-6), szlaki PI3K/Akt i MAPK oraz białka regulatorowe - cykliny [19].

Od początku prowadzonych badań istotne znaczenie ma aktywność AR, dlatego też moje zainteresowania były skoncentrowane szczególnie na ocenie regulacji aktywności tego receptora w korelacji z innymi receptorami jądrowymi m.in. PPAR czy RXR.

Istotnym czynnikiem mającym wpływ na proliferację komórek w przypadku prostaty, a tym samym na hamowanie lub aktywację procesu nowotworowego są receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (peroxisome proliferator-activated receptors; PPARs) należące do rodziny receptorów jądrowych, będących ligandozależnymi czynnikami transkrypcyjnymi. PPARs kontrolują ekspresję wielu genów wpływając na metabolizm, procesy zapalne oraz różnicowanie komórek. Warunkiem wiązania z odpowiednimi sekwencjami DNA - elementami odpowiedzi na proliferatory peroksysomów (peroxisome proliferator response elements; PPREs) jest heterodimeryzacja PPAR z jednym z retinoidowych X receptorów (RXRs). W stanie bez liganda heterodimer związany z korepresorami hamuje transkrypcję, jednak po przyłączeniu liganda do jednego lub obu receptorów dochodzi do rekrutacji koaktywatorów z następującą aktywacją genu docelowego. Wyróżniono trzy białka kodowane przez trzy różne geny w obrębie tej grupy: PPAR α , PPAR δ i PPAR γ ale PPAR γ zyskał szczególną uwagę w badaniach nad nowotworami.

Naturalnymi ligandami PPAR γ są kwasy tłuszczowe, zwłaszcza wielonienasycone i pochodne ikozanoidów będące produktem cyklooksygenaz: COX1 i COX2. PPAR γ wydaje się również wykazywać działanie niezależne od aktywności jako czynnik transkrypcyjny, pośród których należy przede wszystkim wymienić indukowanie proteasomalnej degradacji β -kateniny przez bezpośrednią interakcję.

W celu zrozumienia roli czynników transkrypcyjnych, frakcji jądrowej czy cytoplazmatycznej β -kateniny, w korelacji z receptorami jądrowymi, dla odtwarzania prawidłowego fenotypu komórki prostaty, zastosowałam w moich badaniach naturalne i syntetyczne ligandy PPAR γ oraz przeprowadziłam wyciszenia głównych regulatorów procesu proliferacji komórek prostaty.

4.3.2.2. Regulacja poprzez szlak PI3K/Akt

Serynowo-treoninowa kinaza białkowa Akt, będąca głównym przekaźnikiem sygnału w szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), pełni istotną rolę m.in. w regulacji procesów związanych z proliferacją komórek. Aktywacja szlaku Akt/PI3K może nastąpić w wyniku stymulacji komórek czynnikami wzrostu (PDGF, EGF, VEGF, IGF-1, HGF), cytokinami lub insuliną. Czynniki te, przyłączając się do receptora pełniącego funkcję kinazy tyrozynowej, umożliwiają autofosforylację i rekrutację PI3K do błony komórkowej. Kinaza PI3K przekształca fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2) do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3), który działa aktywująco na kinazę Akt, rekrutując ją do błony komórkowej wraz z jej głównym aktywatorem - kinazą PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1). Cały ten szlak prowadzi do aktywacji kinazy Akt, która jest odpowiedzialna za fosforylację wielu białek biorących udział w różnorodnych procesach regulujących cykl komórkowy, takich jak transkrypcja, proliferacja oraz apoptoza. Zaburzenia w aktywacji szlaku PI3K/Akt mogą występować w wielu nowotworach, również w prostatie, umożliwiając nadmierną proliferację komórek [20, 21]. W mojej dotychczasowej pracy koncentrowałam się na ocenie zależności pomiędzy Akt i AR w regulacji procesu nowotworowego jak i przejściu komórek z androgenozależnych (AS) na androgenoniezależne (AI) m.in. poprzez wyciszenie genów dla AR, AKT czy β -kateniny.

Analiza różnych doniesień literaturowych podejmujących próby wyjaśnienia mechanizmu przejścia komórek z AS na AI przy udziale Akt nie daje jednoznacznego rozwiązania. Ta konkluzja była podstawą moich obecnych dociekań naukowych.

Opisane niżej prace naukowe wchodzą w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego - podstawy postępowania habilitacyjnego.

Geneza cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Jako studentka Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii UJ, kierunku Chemia Stosowana i Teoretyczna, uczestniczyłam, jako wolny słuchacz, w zajęciach prowadzonych dla studentów Kierunku Lekarskiego Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Krakowie, co pozwoliło mi zapoznać się z problemami klinicznymi zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej a od 3-ciego roku, jako studentka na Wydziale Chemii, aktywnie uczestniczyłam w badaniach nad strukturą i funkcją ludzkiej kwaśnej fosfatazy prostatowej prowadzonych w Instytucie Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej w Krakowie, co stanowiło podstawę przygotowania mojej pracy magisterskiej. Bezpośrednio po uzyskaniu tytułu zawodowego magistra chemii, podjęłam w 1985 roku pracę najpierw, jako stażysta, a następnie na stanowisku asystenta w Instytucie Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej w Krakowie, w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. med. W.S. Ostrowskiego, od lat prowadzącym badania nad strukturą i właściwościami biologicznymi kwaśnej fosfatazy prostatowej, uznawanym wówczas za marker procesu nowotworowego ludzkiego gruczołu prostaty.

Celem pierwszej mojej pracy naukowej stała się izolacja kwaśnej fosfatazy prostatowej z płynu nasiennego, a także fizykochemiczna i biochemiczna charakterystyka enzymu, szczególnie w procesach nowotworowych tego gruczołu. Znaczące wzbogacenie mojego warsztatu metodycznego w tej dziedzinie nastąpiło wskutek uzyskania w roku 1986 oraz 1989 stypendium w grupie Prof. V.P. Torchilina w Moskiewskim Uniwersytecie Medycznym (Moscow State University, ZSRR). Równolegle, w ramach prowadzonych badań, rozpoczęłam współpracę z Kliniką i Katedrą Urologii Akademii Medycznej w Krakowie pod kierownictwem doc. dr hab. med. Andrzeja Bugajskiego a także z Kliniką Urologii Szpitala Wojskowego w Krakowie z dr n. med. S. Mrozickim oraz Szpitalem im. G. Narutowicza Oddział Urologii z dr n. med. M. Galką. Wynikiem prowadzonych badań były publikacje (Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Slinkin M.A., Lukyanov A.N., **Dulińska J.**, Ostrowski W.S., *Effect of the lipid bilayer on the enzymatic activity and conformation of acid phosphatase from human prostate*, *Biologicheskije membrany*, 1990, tom 7, no11, 1125-1130; Kuciel R, Mazurkiewicz A, Steuden I, Wasylewska E, Szkudlarek J, **Dulińska J**, Ostrowski WS., *Immunoreactivity of proteolytic degradation products of human prostatic acid phosphatase*, *Acta Biochim Pol.* 1988;35(4):319-30; Wasylewska E, **Dulińska J**, Trubetskoy VS, Torchilin VP, Ostrowski WS., *Stabilization of human prostate acid phosphatase by cross-linking with diimidoesters*, *Acta Biochim Pol.* 1987;34(2):145-56).

Kontynuację tych badań od 1989 roku stanowiły prace eksperymentalne związane z moją rozprawą doktorską pt. „**Wpływ hormonów steroidowych na transkrypcje i translacje mRNA dla kwaśnej fosfatazy stercza ludzkiego**” (promotor: dr hab. Piotr Laidler), którą obroniłam w 1998 roku na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego

Collegium Medicum, uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Od 1999 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w **Instytucie** Biochemii Lekarskiej UJ CM w Krakowie kierowanej przez Pan Prof. dr hab. Piotra Laidlera i równolegle do prowadzonych badań byłam współorganizatorem pracowni hodowli komórkowej i biologii molekularnej w Instytucie Biochemii Lekarskiej, gdzie prowadziłam badania na materiale pooperacyjnych w zakresie regulacji hormonalnej i progresji nowotworu prostaty i kontynuowałam badania nad zagadnieniami molekularnych mechanizmów oddziaływań szlaków sygnalizacyjnych z organizmie ludzkim – gruczołów hormonozależnych – prostaty oraz piersi, ze szczególnym uwzględnieniem gruczołu stercza ludzkiego.

W latach 2000-2001 odbyłam zagraniczny staż w Instytucie Genetyki J. Monod w Uniwersytecie Paris VII, Francja, w zespole Prof. dr hab. F. Chapevilla, gdzie brałam udział w badaniach dotyczących zmian w gruczole prostaty oraz uczestniczyłam w szkoleniach w zakresie hodowli komórkowej, biologii molekularnej, sekwencjonowania i syntezy sond molekularnych do analizy techniką PCR. Doświadczenie to pozwoliło mi w latach kolejnych na stworzenie warunków podobnej pracy w Instytucie w Krakowie.

Po odbytym stażu w Instytucie Genetyki J. Monod, rozpoczęłam razem z Prof. Piotrem Laidlerem przygotowania do założenia pracowni hodowli komórkowej, a także pracowni biologii molekularnej. Obecnie obie pracownie prężnie działają i są wykorzystywane zarówno przez pracowników jak i studentów.

Po obronie doktoratu **i powrocie ze stażów zagranicznych**, moje zainteresowania naukowe pozostały silnie związane z procesem regulacji procesu nowotworowego w sterczu ludzkim poprzez udział czynników wzrostu i hormonów steroidowych. Aby móc prawidłowo określić regulacje markerów nowotworowych, do badań wykorzystywałam tkanki pozyskane śródoperacyjnie. W 2001 roku zostałam kierownikiem projektu badawczego pt. „Badanie zmian fenotypowych komórek nowotworowych prostaty wywołanych ligandami receptorów aktywatorów proliferacji peroksysomów (PPAR)”, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN) (Nr 6 PO5A 074 21). Doświadczenie, które zdobyłam podczas pracy z tkankami można było bezpośrednio wykorzystać do izolacji mRNA dla PSA i PAP, aby następnie wykorzystać produkty do analizy technika Northern blotting. Dzięki temu uzyskałam pierwsze dane o regulacji markerów w hiperplastycznym sterczu ludzkim. Badania te zostały opisane w publikacji: **J. Dulińska, P. Laidler, M. Łabędź, Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors, Acta Biochim. Pol. 2002 : Vol. 49, nr 2, s. 357-368.**

Doświadczenia te pokazały jak istotnym elementem w ekspresji markerów są nie tylko steroidy ale także czynniki wzrostu. Aby móc precyzyjnie określić regulacje komórkowe z udziałem hormonów, postanowiłam wykorzystać do badań tkanki, pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z tkanek (BPH-K, CA-K – nazwy pochodzą od rodzaju tkanki, jaką zastosowałam do izolacji komórek), a także ustabilizowane linie komórkowe (ATCC, USA). Głównym celem zadania badawczego było wykazanie i wyjaśnienie zależności pomiędzy progresją hormonozależnych nowotworów prostaty, a skrzyżowaniem szlaków sygnalizacji komórkowej z udziałem receptorów jądrowych AR i PPAR γ , genami supresorowymi i osi sygnalizacji PI3K/AKT, Wnt/ β -katenina i E-kadheryna- β -katenina, w trakcie nabywania przez komórkę nowotworową hormononiezależności z jednocześnie

nasilającymi się cechami progresji nowotworu. Optymalizację procesu izolacji komórek z tkanki hiperplastycznej i nowotworowej oraz przebieg badań opisano w publikacji: **P. Laidler, J. Dulińska, S. Mroziki**, *Does the inhibition of c-myc expression mediate the anti-tumor activity of PPAR's ligands in prostate cancer cell lines?* *Arch. Biochem. Biophys.* 2007 : Vol. 462, nr 1, s. 1-12, finansowanej także ze środków projektu KBN Nr 6 PO5A 074 21 pt. „Badanie zmian fenotypowych komórek nowotworowych prostaty wywołanych ligandami receptorów aktywatorów proliferacji peroksysomów (PPAR) „, którego byłam kierownikiem.

Posiadanie linii komórkowych o różnej wrażliwości hormonalnej pozwoliło na zastosowanie β -karotenu (BC) jako czynnika mającego wpływ na proces proliferacji. Po wnikliwej analizie okazało się, że komórki hormonozależne wchłaniają zdecydowanie więcej BC niż nie wrażliwe, czego efektem był odpowiedź w ekspresji czynników transkrypcyjnych, regulatorów proliferacji czy genów supresorowych. Wyniki opublikowano w pracy: **J. Dulińska, D. Gil, J. Zagajewski, J. Hartwich, M. Bodzioch, A. Dembińska-Kieć, T. Langmann, G. Schmitz, P. Laidler**, *Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells.* *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 2005 : Vol. 1740, nr 2, s. 189-201., Praca była finansowana m.in. ze środków przyznanych z funduszy Unii Europejskiej (DLARFID); UE:2001-04 European pt. Dietary Lipids as Risk Factors in Development. Mechanistic Issues.; w którym to projekcie byłam jednym z głównych wykonawców.

Efekt dawkozależny był zaskakujący - niskie dawki BC zwiększały proliferację komórek LNCaP, dlatego w kolejnych badaniach zastosowałam także β -karoten ale w obecności androgenów. I tym razem odpowiedź była inna - okazało się, że wysokie stężenie BC przełamuje brak wrażliwości komórek i odpowiadają spadkiem proliferacji i aktywacją kaspaz wprowadzając oba typy komórek na drogę apoptozy. Wyniki opublikowano w pracy: **J. Dulińska-Litewka, G. Schmitz, A. Kieć-Dembińska, P. Laidler**, *Is the effect of β -carotene on prostate cancer cells dependent on their androgen sensitivity?* w: *Carotenoids and vitamin A in translational medicine.*; red. Olaf Sommerburg, Werner Siems, Klaus Boca Raton : CRC Press / Taylor & Francis Group, 2013 s. 203-224, finansowanej ze środków projektu NCN – no N N401 125638 pt. Hamowanie potencjału wzrostowego komórek hormonozależnych nowotworów prostaty i piersi poprzez ingerencję w szlaki sygnalizacji komórkowej z udziałem receptorów jądrowych i supresora PTEN., którego kierownikiem zostałam w 2010 roku.

Wyniki opublikowane w tych 2 publikacjach jednoznacznie wskazują, że musi być jeszcze jakiś dodatkowy regulator w odpowiedzi na działanie hormonów.

Aby wyjaśnić ostatecznie, jaki może być proponowany mechanizm regulacji, zastosowałam w badaniach wyciszenie genów dla AR, Akt, AR+Akt oraz beta-kateniny, a także określiłam wzajemną korelację receptorów jądrowych oraz Akt zaangażowanych w hamowanie potencjału inwazyjnego w komórkach stercza ludzkiego. Znaczący wzrost sygnalizacji z udziałem Akt wystąpił jako efekt utraty androgenozależności. Wyniki opublikowano w pracy: **J. Dulińska-Litewka, J.A. McCubrey, P. Laidler**, *Increased AKT signaling resulting from the loss of androgen responsiveness in prostate cancer*, *Curr. Med. Chem.* 2013 : Vol. 20, nr 1, s. 144-157.

Opisana analiza danych literaturowych pozwala wyciągnąć wniosek, że jednym z powodów, dla których komórki po terapii ADT wracają na drogę proliferacji jest skrzyżowanie regulacji AR/Akt/WNT-kadheryna i β -kateniny zależnie od ich początkowej wrażliwości na androgeny.

Opisane wyżej prace naukowe wchodzą w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego - podstawy postępowania habilitacyjnego.

5. Omówienie głównych wyników cyklu prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego.

5.1. Joanna Dulińska, Piotr Laidler, Maria Łabędź. Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors. *Acta Biochim. Pol.* 2002 : Vol. 49, nr 2, s. 357-368

Główne markery procesu nowotworowego w gruczole stercza to kwaśna fosfataza prostatowa (PAP) i antygen prostatowo specyficzny (PSA). Pomimo powszechnego ich wykorzystania do diagnozowania zmian w gruczole stercza nadal nie jest do końca wyjaśniony udział hormonów steroidowych i czynników wzrostu w ich ekspresji i metabolizmie w stanach patologicznych gruczołu. Do badań wykorzystano tkanki z rozpoznanym histopatologicznie łagodnym rozrostem gruczołu krokowego „BPH” oraz komórki wyizolowane z odpowiednich tkanek. Materiał biologiczny traktowano hormonami steroidowymi: 5 α -dihydrotestosteronem (DHT), estradiolem (E) i czynnikami wzrostu: epidermalnym czynnikiem wzrostu (EGF) i fibroblastycznym czynnikiem wzrostu (bFGF). Do analizy obecności mRNA dla obu markerów zastosowano znakowane fosforem specyficzne sondy oligonukleotydowe. Najwyższy i istotny statystycznie wzrost dla mRNA dla PAP obserwowano przy zastosowaniu DHT + bFGF, podczas gdy dla PSA najwyższa ekspresja była obserwowana w obecności DHT + EGF. Powolny, ale stały spadek poziomów mRNA dla PAP i PSA obserwowano w przypadku braku czynników w pożywce inkubacyjnej. Wyniki sugerują, że wczesna ekspresja mRNA dla genów dla PSA i PAP lub ich stabilność silnie zależy od DHT. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność uruchamiania równoległych szlaków sygnalizacyjnych w odpowiedzi na działanie hormonów.

Zastosowany układ badawczy, tkanki i pierwotne linie komórkowe zostały później wykorzystane do analizy zmian na poziomie mRNA w przypadku traktowania komórek androgenami i w celu wyjaśnienia mechanizmu regulacji komórkowej w tkance hiperplastycznej i nowotworowej gruczołu stercza ludzkiego.

5.2. Joanna Dulińska, Dorota Gil, Jacek Zagajewski, Jadwiga Hartwich, Marek Bodzioch, Aldona Dembińska-Kieć, Thomas Langmann, Gerd Schmitz, Piotr Laidler. Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 2005 : Vol. 1740, nr 2, s. 189-201

Badania epidemiologiczne sugerują, że spożywanie warzyw i owoców zmniejsza ryzyko raka prostaty, jednakże kontrowersyjne doniesienia wskazujące, że suplementacja β -

karotenem (BC) może zmniejszyć ryzyko raka gruczołu krokowego, a z drugiej strony może przyczynić się do jego progresji, skłaniały do poszukiwania przyczyn tak różnej odpowiedzi komórki na ich działanie. Zanim przystąpiono do badań, określono precyzyjnie stężenie BC i przeprowadzono analizę czystości stosowanej próbki BC stosując do badań wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Komórki badanych linii wchłaniały BC z medium hodowlanego w sposób zależny od linii, dawki i czasu, a najwyższych efekt obserwowano dla komórek linii LNCaP. Obserwowano także wzrost ilości wchłanianego BC gdy w pożywce były obecne androgeny. Globalna analiza z zastosowaniem mikromacierzy (Affymetrix HG-U133) wykazała znaczne różnice w liczbie reagujących genów. Obserwowano zwiększoną ekspresję genów odpowiedzialnych za transport retinoli - białka wiążącego retinol (RBP) i komórkowego białka wiążącego retinol (CREBP), jak również kilku genów zaangażowanych w metabolizm BC, takich jak dehydrogenazy retinolu i receptory kwasu retinowego w linii androgenozależnej LNCaP, bez obserwowanego efektu w linii AI. Wyniki jednoznacznie potwierdzają postawioną tezę, że wchłanianie BC przez komórki raka prostaty jest zależne od androgenów. Szczegółowa analiza ekspresji wybranych genów w komórkach LNCaP traktowanych BC na poziomie mRNA i białka wskazuje, że obserwowany wzrost proliferacji może być wynikiem indukcji genów wpływających na proliferację (c-myc, c-jun) i apoptozę (bcl-2) bez znaczącego wpływu na regulację geny kontroli cyklu komórkowego (cdk2, RB, E2F-1). Dla potwierdzenia uzyskanych wyników zastosowano technikę Real-time PCR i Western blotting. Analiza potwierdziła znaczący wzrost c-myc zarówno na poziomie mRNA jak i białka, a dla c-jun na poziomie mRNA. Uzyskane wyniki są pomocne w interpretacji, dlaczego pomimo tego samego kierunku zmian inicjowanych przez niskie dawki BC efekt działania BC na proliferację wrażliwych na androgeny komórek LNCaP jest zdecydowanie bardziej wyraźny niż w przypadku PC-3. Badania te potwierdziły, że mniejsza dawka BC może wpływać promująco na rozwój nowotworu przez aktywację procesu z udziałem c-myc, który może być wspierany przez równoległe uruchamianie metabolizmu steroidów przez BC, jak również przez aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak c-jun lub c-fos. Jednakże w dalszym ciągu mechanizm takiego działania pozostaje nie wyjaśniony.

Udział receptorów retinoidowych w aktywności proapoptotycznej jest złożony ze względu na to, że niektóre retinoidy działają w sposób niezależny od receptora retinoidu. Pomimo to wiele badań sugeruje kluczową rolę RAR β w modulacji apoptozy indukowanej retinoidem w badanych komórkach prostaty. W przeprowadzonych badaniach obserwowano zwiększoną ekspresję zarówno RAR α , jak i RAR β po traktowaniu komórek LNCaP 10 μ M BC. Jednakże to stężenie BC raczej prowadziło do zmniejszenia aktywności kaspaz w komórkach LNCaP, co wskazuje, że stosunkowo niskie stężenia BC ma raczej wpływ na efekt proliferacji komórek nowotworowych, na co wskazuje wzrost ekspresji białka Bcl-2 po traktowaniu komórek BC. Uzyskane wyniki potwierdzają szczególną rolę androgenów dla wchłaniania BC, procesów proliferacji i apoptozy.

5.3. Piotr Laidler, Joanna Dulińska, Sławomir Mrozicki. Does the inhibition of c-myc expression mediate the anti-tumor activity of PPAR's ligands in prostate cancer cell lines? Arch. Biochem. Biophys. 2007 : Vol. 462, nr 1, s. 1-12

Ligandy receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (PPAR γ) wydają się wywoływać działanie przeciwnowotworowe w komórkach raka prostaty, ale ich mechanizm też nie jest do końca poznany. Wpływ ligandów PPAR γ - kwasów tłuszczowych ω -6 i ciglitazonu na szlaki metaboliczne, rozwojowe i różnicujące, a także proliferację komórek i apoptozę pozwoliły na wykorzystanie tych cząsteczek do analizy zmian regulacyjnych w komórkach prostaty AS i AI. Wyniki badań sugerują, że aktywność PPAR γ w regulacja układu kadheryna / katenina jest bardzo istotna a ekspresja E-kadheryny, uznanego supresora nowotworzenia i różnicowania, powinna wzrastać po zastosowaniu w terapii ligandów PPAR γ . W wielu nowotworach utrata E-kadheryny jest silnie skorelowana ze zwiększoną ekspresją N-kadheryny. Dodatkowo powstanie tzw. „przełączenia” kadherynowego może prowadzić do zmniejszenia kontroli poziomu β -kateniny, a konsekwencji do wzrostu jądrowej formy β -kateniny, co może skutkować progresją nowotworu.

Do przeprowadzania badań wykorzystano ustabilizowane linie komórkowe, ale także wyprowadzono nowe układy badawcze - pierwotne linie komórkowe z tkanki hiperplastycznej BPH-K oraz z tkanki nowotworowej CA-K. Uzyskane pierwotne komórki były pochodzenia nabłonkowego, w których w obecności 20 mM fosforanu p-nitrofenylu (p-NPP) czy też w obecności chlorowodoru pararozaniliny oznaczono enzymatyczne i histochemiczne obecność kwaśnej fosfatazy prostatowej. Dodatkowo we wszystkich zastosowanych układach badawczych badano poziom enzymu 5 α -reduktazy (badano typ I i II) odpowiedzialnego za konwersję testosteronu do DHT. 5 α -reduktaza typu I była obecna we wszystkich układach badawczych, natomiast ekspresja 5 α -reduktazy II była charakterystyczna dla komórek nowotworowych DU145, CA-K oraz w tkance CA. Ekspresja AR była obserwowana w linii LNCaP, w komórkach BPH-K i tkankach pochodzenia hiperplastycznego (BPH).

Efekt traktowania komórek ligandami PPAR γ możemy obserwować w dwóch grupach komórek. W komórkach LNCaP i BPH-K nie obserwowano dużych zmian w proliferacji, a efekt był bardziej widoczny po traktowaniu komórek naturalnym ligandem, kwasem linolowym (LA), natomiast druga grupa komórek, takich jak DU145, PC-3 i CA-K, odpowiedziała znacznym zmniejszeniem proliferacji po 48–72-godzinny traktowania 15 μ M roztworem LA lub ciglitazonu. Nawet do 50% zahamowania proliferacji obserwowano w przypadku komórek nie wykazujących wrażliwości na działanie androgenów (PC-3, DU145) i pierwotnych komórek (CA-K) w porównaniu z komórkami nietraktowanymi, natomiast komórki wrażliwe na androgeny LNCaP charakteryzowały się co najwyżej 20% redukcją proliferacji po traktowaniu LA, z jeszcze mniejszym efektem po zadziałaniu cyglitazonu. Efekt hamowania proliferacji został odwrócony po zastosowaniu selektywnego antagonisty PPAR γ - GW9662. Przeprowadzone badania w kierunku apoptozy wskazały, że tylko komórki raka prostaty, w pierwotnej linii CA-K, zareagowały uruchomieniem ścieżki apoptozy; w tej linii obserwowano zwiększoną aktywność kaspaz.

Dodatkowo, znaczny wzrost ekspresji BAX i niewielki spadek ekspresji BCL-2 potwierdzają obserwowany spadek proliferacji i aktywację szlaku apoptozy. Analogiczne badania przeprowadzono we wszystkich innych liniach komórkowych ludzkiego raka prostaty. Podobny efekt – zwiększenia ekspresji BAX i zmniejszenia ekspresji genów BCL-2

po traktowaniu komórek ciglitazonem - obserwowano w przypadku komórek PC-3. Jednak ta linia komórkowa nie wykazywała żadnej aktywności kaspaz. Obserwowane efekty zmiany w ekspresji BAX i BCL-2 nie korelowały jednoznacznie z aktywnością kaspaz. Ekspresja BAX w DU145 po leczeniu ligandami PPAR γ był niska, a nietraktowane komórki nie wykazywały ekspresji BAX. Wszystkie linie zareagowały wzrostem ekspresji PPAR γ , zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, podczas gdy nie zaobserwowano takiego efektu po traktowaniu komórek w obecności antagonisty PPAR γ - GW9662.

Jako że PPAR γ może indukować różnicowanie, jak i hamowanie wzrostu u niektórych nowotworów, postanowiłam sprawdzić efekt jego działania. Komórki PC-3 i CA-K charakteryzują się ekspresją N-kadheryny i nie wykazują ekspresji E-kadheryny, podczas gdy komórki DU145, LNCaP i BPH-K posiadają E-kadherynę bez ekspresji N-kadheryny. Po traktowaniu komórek ligandami PPAR γ zaobserwowano wzrost ekspresji E-kadheryny w linii LNCaP i BPH-K, oraz reekspresję w liniach PC-3 i CA-K. W liniach CA-K i PC-3 dodatkowo obserwowano spadek ekspresji N-kadheryny. Przywrócenie ekspresji E-kadheryny w linii komórkowej PC-3 i zwiększonej ekspresji tego białko w linii komórkowej LNCaP po stymulacji komórek ciglitazonem i kwasem linolowym, wraz z redukcją ekspresji N-kadheryny zarówno na poziomie mRNA jak i białka wydają się być najbardziej znaczącą obserwacją. Z uzyskanych wyników można wnioskować, że ligandy PPAR γ inicjują zmiany w kierunku prawdopodobnie mniej inwazyjnego fenotypu w przypadku ludzkich nowotworowych komórek prostaty PC-3 i CA-K.

Aby scharakteryzować sposób działania ligandów PPAR γ , oceniono ich wpływ na poziom β -kateniny. Aktywność β -kateniny jest skorelowana z aktywnością kadheryn, a jego frakcja jądrowa jest powszechnie uważana za onkogen dla ludzi. Traktowanie komórek ligandami PPAR γ wpływało na zmniejszenie ekspresji β -kateniny w wszystkich badanych liniach komórkowych. Dodatkowo, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, obserwowano zmniejszoną ekspresję antygenu prostatowo specyficznego (PSA) w linii LNCaP typu AS, jak również najwyższy spadek ekspresji c-myc, obserwowany w tej linii po traktowaniu komórek ciglitazonem. Wyniki te dobrze korelują z omawianymi wcześniej badaniami (5.2) opartymi na analizie mikromacierzy dla linii komórkowej LNCaP traktowanej kwasem arachidonowym, gdy wykazano zwiększoną ekspresję genu dla E-kadheryny i zmniejszoną ekspresję genu PSA w linii LNCaP. Wyniki badań ekspresji wybranych genów w komórkach LNCaP traktowanych BC na poziomie mRNA i białka potwierdziły wzrost proliferacji ale także ekspresji c-myc. Wydaje się, że istnieje możliwość połączenia ścieżek sygnalizacji komórkowej pomiędzy kadherynami i c-myc, szczególnie w kontekście działania androgenów.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że hamowanie β -kateniny i w efekcie hamowanie ekspresji c-myc poprzez aktywację PPAR γ może być pomocne w hamowaniu progresji nowotworowej i przyczynić się do przywrócenia cech fenotypu typowych dla prawidłowej komórki prostaty.

5.4. Joanna Dulińska-Litewka, Gerd Schmitz, Aldona Kieć-Dembińska, Piotr Laidler. Is the effect of β -carotene on prostate cancer cells dependent on their androgen sensitivity?

w: Carotenoids and vitamin A in translational medicine.: edited by Olaf Sommerburg, Werner

Siems, Klaus Boca Raton : CRC Press / Taylor & Francis Group, 2013 s. 203-224 p-
ISBN: 978-1-4398-5526-3 Publikacja nie posiada IF, ponieważ wyniki zostały opublikowane
w książce, w rozdziale 11, na zaproszenie wydawcy.

W badaniach po raz kolejny zastosowano karotenoidy, które wykazując właściwości antyoksydacyjne chronią komórki przed wolnymi rodnikami, które mogą uszkadzać DNA. Ponieważ stres oksydacyjny wzrasta wraz z narażeniem na działanie androgenów, jak również z wiekiem, karotenoidy mogą być szczególnie istotne w zapobieganiu rakowi prostaty [22, 23]. Pomimo szerokiej wiedzy na temat roli BC w głównych procesach komórkowych, istnieją pewne kontrowersje w odniesieniu do jego potencjalnego wpływu na progresję raka [24]. Dieta bogata w warzywa, witaminy E i C, likopen, selen i zielona herbata są związane z niższym ryzykiem raka prostaty [25]. Prowadzona randomizowana próba PLCO (prostate, lung, colorectal, ovarian) nie potwierdziła ich pozytywnego działania, a dane sugerują, że korzyść z likopenu jest mała i że BC, przeciwutleniacz związany z likopenem, nawet zwiększa ryzyko agresywnego raka prostaty [25].

W publikacji [5.2.] uzyskane wyniki potwierdziły, że niższe stężenie BC (3-10 μM) bardziej stymulują wzrost komórek wrażliwych na androgeny (LNCaP) niż komórek niewrażliwych na androgeny (PC-3). W przeciwieństwie do tego wyniku, po traktowaniu komórek PC-3 20 μM BC, zaobserwowano znaczne zahamowanie wzrostu komórek PC-3, ale nie zaobserwowano większego wpływu na wzrost komórek LNCaP [5.2]. Biorąc pod uwagę znaczące różnice w wychwycie BC i proliferacji komórek raka prostaty, starałam się wyjaśnić wpływ androgenów, jak również określić funkcję AR w regulacji proliferacji komórek raka prostaty po traktowaniu 10 μM i 20 μM BC. Analiza wchłaniania samego BC czy też w obecności DHT potwierdziła wychwyt BC zarówno przez komórki wrażliwe na androgeny, jak i niewrażliwe, ale efekt był zależny od linii, dawki i czasu prowadzonej reakcji. Znaczący wpływ DHT na wchłanianie BC przez komórki obu linii sugeruje, że absorpcja BC przez komórki prostaty może być zależna od steroidów i może wymagać również udziału AR, co wyjaśniałoby znacznie większy wychwyt BC przez komórki LNCaP androgenozależne niż komórki niewrażliwe na androgeny PC-3. Eliminacja steroidów z surowicy (stan SF) wyraźnie zmieniła wchłanianie w obu typach komórek, ale w większym stopniu w linii komórkowej zależnej od androgenów.

Traktowanie komórek PC-3 10 μM BC nie miało wpływu na ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm BC, takie jak: białko wiążące retinol (RBP lub CREBP), dehydrogenaza retinolowa (RDH11, RDH14) czy receptory retinoiczne (RARA, RARB, RXRA). ale zmieniło ekspresję tych samych genów w komórkach LNCaP (5.2). Komórki LNCaP traktowane 5 nM DHT, jak również 10 μM BC + 5 nM DHT wykazały znaczące zmiany w indukcji genów po traktowaniu komórek androgenami w porównaniu z tymi komórkami traktowanymi tylko BC. Analiza z zastosowaniem mikromacierzy potwierdziła istotny wpływ DHT na ekspresję genów dla białek odpowiedzialnych za transport i wiązanie retinalu - RBP i CREBP, a także niektórych genów zaangażowanych w metabolizm BC w linii komórkowej wrażliwej na androgeny. Nie zaobserwowano takiego efektu w komórkach pozbawionych wrażliwości na androgeny. Dodatkowo zaobserwowano indukcję genów c-myc, c-jun wpływających na proliferację i apoptozę (bcl-2) bez znaczącego

wpływu na główne geny kontroli cyklu komórkowego (cdk2, RB, E2F-1) w komórkach LNCaP i brak efektu na PC-3.

Zaskakujące zmiany profilu proliferacji obserwowano po traktowaniu obu typów komórek, bowiem komórki androgenoniezależne stymulowane 20 μ M BC w obecności DHT odpowiadały spadkiem proliferacji. Komórki LNCaP traktowane 5 nM DHT lub 10 μ M BC zwiększały migrację przez komorę Boydena około 1,5-2,5 razy, a traktowane 10 μ M BC + 5 nM DHT – o mniej niż 50%, ale zastosowanie 20 μ M BC + 5 nM DHT zmniejszało migrację przez Matrigel i to w obu liniach komórkowych, przy czym efekt był bardziej widoczny w linii komórkowej niewrażliwej na androgeny. Obserwowano również zmiany w aktywności metaloproteinaz (MMP). Brak wrażliwości na / zależności od androgenów w przypadku PC-3 jest w świetle przedstawionych danych raczej teoretyczny i może odzwierciedlać wpływ androgenów na zachowanie komórki w odniesieniu do roli receptora androgenowego. Porównanie genów, których ekspresja była zmieniona w komórkach LNCaP i PC-3 jako efekt traktowania DHT lub BC wskazuje, że obserwowane zmiany odpowiedzi między dwiema liniami komórkowymi nowotworów prostaty były najprawdopodobniej spowodowane innym statusem AR. Sposób, w jaki DHT zwiększa wychwyt BC w komórkach, pozostaje do wyjaśnienia, ale nie ma wątpliwości, że oprócz głównego wkładu AR w wychwyt BC przez komórkę LNCaP, istnieje nieznany mechanizm, co wyjaśniałoby efektywny wzrost wewnątrzkomórkowego BC w komórkach LNCaP. Należy zaznaczyć, że prezentowane dane dotyczące wpływu androgenów na wchłanianie BC w komórkach prostaty są pierwszym takim opublikowanym raportem.

Z uzyskanych wyników wnioskuję, że 30 μ M BC wpływał na spadek proliferacji komórek raka gruczołu krokowego *in vitro* przez konwersję BC do retinolu i pokrewnych związków występujących w komórkach prostaty, co powodowało zmiany stężenia wewnątrzkomórkowych ligandów dla receptorów retinoidowych, wpływając na ekspresję genów i efekty biologiczne regulowane przez nadgodzinę receptora steroidowego [26]. Wyniki publikowane w pracy [5.3], potwierdzają, że ligandy PPAR γ wymagają do swojej aktywności transkrypcyjnej aktywności receptora retinoidowego (RXR), i były bardziej efektywne jako czynnik przeciwnowotworowy w wrażliwych na androgeny komórkach LNCaP. Wyniki sugerują, że efekt hamowania β -kateniny i w konsekwencji ekspresji c-myc poprzez aktywację PPAR γ może pomóc komórkom raka gruczołu krokowego przywrócić kilka cech fenotypu prawidłowego komórek prostaty. Jest to dodatkowy dowód na różną odpowiedź komórek na BC, jak i na ligandy PPAR γ , która wynika z różnych wrażliwości na androgeny komórek prostaty i udziału w tym mechanizmie dodatkowych regulatorów.

Zaobserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję ufosforylowanej formy Akt (S473) [p-Akt] i AR w komórkach LNCaP po traktowaniu 20 μ M BC i w konsekwencji z obniżonym poziomem β -kateniny, c-myc i zwiększoną aktywnością kaspazy 3- i 9. Warto też podkreślić, że traktowanie komórek DHT spowodowało duży wzrost poziomu białka AR i znaczną akumulację jądrową β -kateniny. Chociaż traktowanie komórek DU-145 i PC-3 roztworem DHT nie spowodowało stymulacji aktywności AR, knockdown ekspresji AR w komórkach PC-3 spowodował spadek poziomów białka p21^{CIP1} i mierzalny spadek w aktywność regulatora cyklu komórkowego p21. Jednak nie zaobserwowano ekspresji AR w linii komórkowej PC-3, ale zaobserwowano wpływ DHT na wychwyt BC i proliferację, jak również efekt apoptozy w komórkach PC-3 niewrażliwych na androgeny.

Przedstawione wyniki wskazują na powiązania między BC a sygnalizacją steroidową nie tylko w komórkach wrażliwych na androgeny. Biorąc pod uwagę znaczenie prognostyczne enzymów lipogenicznych i ich potencjalną rolę jako celów terapii przeciwnowotworowej, uzyskane wyniki dotyczące regulacji tych enzymów przez BC mogą dostarczyć nowego spojrzenia w złożone mechanizmy, przez które androgeny wpływają na komórki raka prostaty.

5.5. Joanna Dulińska-Litewka, J.A. McCubrey, Piotr Laidler. Increased AKT signaling resulting from the loss of androgen responsiveness in prostate cancer. *Curr. Med. Chem.* 2013 : Vol. 20, nr 1, s. 144-157

Mechanizm odpowiedzialny za przełączenie nowotworu typu androgenowrażliwego (AS) na androgenoniewrażliwy (SI) nie jest do końca poznany, jednakże związany jest m.in. z ekspresją receptora androgenowego. Regulacji AR, przez który androgeny kontrolują ekspresję genów biorących udział w proliferacji, migracji i śmierci komórki, jest zależna od innych szlaków sygnalizacyjnych, czynników transkrypcyjnych i białka regulatorowego β -kateniny, ale także Akt. W celu ustalenia możliwej roli β -kateniny w indukcji przełączenia formy AS do postaci AI, przeprowadzono wyciszenie genów dla AR, Akt i β -kateniny z wykorzystaniem odpowiednich siRNA [AMBION]. Traktowanie komórek nowotworu prostaty (LNCaP) siRNA dla genu AR zmniejsza ich proliferację (o 45-70 %), ekspresję frakcji jądrowej β -kateniny, cykliny D1, cykliny - G1, c-myc, jak i aktywność metaloproteinaz (MMP) -2, -7, -9 i migrację komórek. Nieoczekiwanie, po dłuższym czasie wyciszanie AR w komórkach LNCaP (ponad 72 godzin) wpływało na wzrost poziomu p-Akt i obserwowano zwiększenie proliferacji, jak również ekspresji frakcji jądrowej β -kateniny, cykliny D1, c-myc i aktywności MMP. Efektów tych nie obserwowano w liniach komórkowych androgenoniewrażliwych jak PC-3 lub DU145. Jednakże wyciszenie Akt lub β -kateniny w linii androgenozależnej LNCaP prowadziło do wzrostu proliferacji i migracji. Uzyskane wyniki sugerują, że w komórkach nowotworowych dominujące działanie w sygnalizacji należy do AR lub Akt, w zależności od początkowej wrażliwości androgenowej. W komórkach raka prostaty AI, Akt przejmuje rolę AR i skutecznie przyczyniają się za pośrednictwem tej samej cząsteczki sygnałowej, β -kateniny, progresji raka androgenoniezależnego. Wyciszenie genu AR (siRNA-AR) w liniach komórkowych prostaty z AR+ znacząco redukowało proliferację, ekspresję frakcji jądrowej β -kateniny, metaloproteinaz i wzrost ekspresji p21, p27 a także E-kadheryny. Wzrost ekspresji N-kadheryny w przypadku nieobecności androgenów w nowotworach pierwotnych wskazuje na potencjalne zaangażowanie AR w ekspresji N-kadheryny. Jej ekspresja związana jest także ze stopniem procesu nowotworowego (skala Gleasona) i wzrost jej ekspresji obserwuje się u pacjentów z przerzutami. Wyciszenie N-kadheryny w linii androgenoniezależnej (PC-3) skutkowało reekspresją E-kadheryny.

Aby ocenić rzeczywiste zmiany w ekspresji AR, Akt, β -kateniny, E- i N-kadheryn, cykliny-D1, c-myc, jak również aktywności MMP i inhibitorów cyklu komórkowego p21^{Cip-1} i p27^{Kip-1}, w badaniach zastosowałam ustalone linie komórkowe raka gruczołu krokowego: LNCaP (AS wrażliwe na androgeny), PC-3 i DU145 (AI niewrażliwe na androgeny), jak i komórki pierwotne pochodzące z próbek tkanek: jednego raka prostaty (CA-K) i jednej

łagodnej linii rozrostu prostaty (BPH-K) [*sposób izolacji komórek został przedstawiony w pracy 5.2*] i odpowiednie tkanki z różnym stopniem zróżnicowania nowotworu. Podwyższoną ekspresję PSA, β -kateniny, cykliny-D1 i c-myc oraz zmniejszoną lub brak ekspresji E-kadheryny obserwowano w komórkach AI i tkankach nowotworowych. Ekspresja AR zależała również od stadium guza, ale nie obserwowano typowej korelacji między stopniem złośliwości a ekspresją AR. Obserwowana różna ekspresja badanych białek w różnych liniach komórkowych i tkankach wskazywała na zmiany fenotypowe z powodu progresji nowotworu. Linie komórkowe PC-3, CA-K i rakowa tkanka CA nie wykazywały ekspresji E-kadheryny, natomiast obserwowana była ekspresja N-kadheryny, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Dodatkowo, w tych samych komórkach i odpowiednich próbkach tkanek ekspresja β -kateniny, cykliny D1 i c-myc wykazywała podobne tendencje wzrostowe. Ekspresji AR w komórkach AI nie zaobserwowano. Tak jak wcześniej opisałam, pojawia się różnicowa odpowiedź komórek prostaty na leczenie ligandami PPAR γ (kwasy tłuszczowe, ciglitazon) lub rybozyd kinetyny w odniesieniu do ich wrażliwości na androgeny [5.2; 27]. W opisanych badaniach [5.4] obserwowano także istotny wpływ testosteronu [T] i DHT na ekspresję genów / białek związanych z proliferacją i apoptozą w ludzkich komórkach raka prostaty AS. Dlatego też w kolejnym etapie badań starałam się ustalić, czy zachowanie komórek może być modulowane w odpowiedzi na wyciszenie aktywności AR.

Komórki AS LNCaP traktowane T lub DHT wykazywały podwyższoną proliferację i wysoki poziom β -kateniny jądrowej i AR, jak również nasiloną migrację; nie obserwowano takich efektów dla komórek AI DU145 i PC-3. Co ciekawe w komórkach LNCaP, zwiększonemu poziomowi β -kateniny w jądrze towarzyszył podwyższony poziom AR. Obserwacje dotyczące interakcji między β -kateniną i AR sugerują możliwy mechanizm wzajemnej korelacji między szlakami β -kateniny i sygnalizacją AR. Ponadto DHT ma większy wpływ na proliferację za pośrednictwem AR i transport β -kateniny do jądra w porównaniu z T, dlatego do dalszej analizy zastosowano DHT jako ligand AR, w badaniach proliferacji i migracji za pośrednictwem AR. DHT znacząco wpływał na migrację i aktywność MMP w linii komórkowej LNCaP. Ponieważ MMP są zaangażowane w migrację komórek do innych tkanek, porównałam ich konstytutywny poziom ekspresji dla genów dla MMP w liniach komórkowych raka prostaty o różnych potencjałach przerzutowania. Znacznie wyższy poziom ekspresji genu MMP-9 obserwowano w komórkach PC-3 i DU145 w porównaniu z komórkami LNCaP. Aktywność MMP-9 w linii komórkowej LNCaP wzrosła po ich traktowaniu DHT. Wyciszenie genu AR poprzez zastosowanie siRNA w komórkach gruczolu krokowego linii LNCaP znacząco zmniejszyło: proliferację (o 45-70%), ekspresję białek cyklu komórkowego - cykliny D1 i cykliny G1, c-myc, migrację komórek i aktywność MMP po 72 godzinach. Dodatkowo komórki LNCaP transfekowane siRNA specyficznym dla AR całkowicie utraciły zdolność do migracji w porównaniu z odpowiednimi komórkami kontrolnymi. Równolegle obserwowano zwiększoną ekspresję E-kadheryny, p21^{Cip-1} i p27^{Kip-1} w komórkach LNCaP, bez obserwowanego wpływu na procesy proliferacji i migracji w komórkach PC-3 i DU145. Zaobserwowano, że zwiększenie ekspresji N-kadheryny w gruczole krokowym jest istotne w odniesieniu do regulacji migracji komórek, inwazji, proliferacji i przeżycia. Wyciszenie AR w istotny sposób wpłynęło na zwiększenie ekspresji E-kadheryny w komórkach LNCaP a także pierwotnych komórkach BPH-K. Ponieważ kadheryny są kluczowe dla regulacji β -kateniny, zbadano wpływ wyciszenia AR na funkcję

β -kateniny. Wyniki potwierdziły udział AR w translokacji β -kateniny, ponieważ traktowanie DHT zwiększyło poziomy β -kateniny w jądrze, podczas gdy wyciszenie AR doprowadziło do obniżenia ekspresji β -kateniny w jądrze komórkowym. Dość zaskakująca okazała się obserwacja nagłego wzrostu proliferacji komórek LNCaP po ponad 96 godzinach wyciszenia AR, co korelowało z podwyższoną ekspresją p-Akt i aktywności MMP. Dodatkowo w komórkach AS, po 120 godzinach wyciszenia AR, obserwowano znacząco wyższy poziom ufosforylowanej frakcji β -kateniny/Ser 552 oraz znacznie zwiększoną migrację komórek LNCaP przez komorę Boydena pokrytą Matrigelem, w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Aby potwierdzić rolę Akt w progresji raka prostaty jako głównego mediatora funkcji β -kateniny w komórkach z wyciszeniem AR, wyciszono również gen dla Akt. W tym przypadku istotne zmiany zaobserwowano w komórkach AI - zahamowanie proliferacji (50-60%) w linii komórkowej AI i zaskakująco tylko 10-20% w AS LNCaP. Wyciszenie genu Akt spowodowało zahamowanie zarówno ekspresji Akt, jak i β -kateniny w komórkach AI PC-3 i DU145. Przeciwnie, wyciszenie Akt w komórkach AS LNCaP nie spowodowało zmiany w ekspresji β -kateniny. Traktowanie komórek LNCaP z wyciszonym Akt roztworem DHT doprowadziło do zwiększenia proliferacji i ekspresji β -kateniny, jak również jej translokacji do jądra. Wyniki wskazują, że translokacja β -kateniny do jądra zależy w większym stopniu od aktywności AR niż aktywności Akt w komórkach AS, natomiast translokacja β -kateniny do jądra w komórkach AI zależała głównie od aktywności Akt.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że proliferacja w liniach komórkowych raka prostaty zależy zarówno od regulacji AR, jak i Akt. Aby potwierdzić te wyniki, wyciszyłam AR i Akt jednocześnie, co spowodowało 70-85% zahamowania proliferacji w komórkach AS LNCaP i około 50% w AI, zahamowanie ekspresji Akt i frakcji jądrowej β -kateniny bardziej w AS niż w komórkach AI PC-3 i DU145. Ponadto zaobserwowano zmniejszoną ekspresję cykliny D1 i zwiększone poziomy p21^{Cip-1}. Wyniki te wskazują, że zarówno AR, jak i Akt regulują raka prostaty, a jednym z ich głównych celów jest β -katenina. Dlatego też, aby potwierdzić, że zarówno AR, jak i Akt używają β -kateniny jako ważnego czynnika biorącego udział w regulacji transkrypcji genów, zastosowałam siRNA dla β -kateniny. Transfekcja β -kateniny spowodowała znaczne zahamowanie proliferacji w liniach komórkowych prostaty z jednoczesnym obniżeniem ekspresji cykliny D1, c-myc i zwiększenia ekspresji p21^{Cip-1}, ale największe efekty obserwowano w komórkach LNCaP.

Omówienie ewentualnego wykorzystania wyników prac.

Przedstawiony powyżej cykl prac miał na celu wytypowanie głównego regulatora w obserwowanej oporności komórek nowotworowych stercza leczonych hormonalnie. Wprowadzenie do badań różnych układów badawczych, takich jak komórki z ustabilizowanych linii komórkowych, wyizolowane przeze mnie komórki pierwotnych linii komórkowych, a także tkanki pochodzące od pacjenta ze zmianami nowotworu gruczołu stercza, pozwoliły na pełniejszą obserwację zjawiska rodzaju „przełączenia” AR/Akt w komórkach prostaty. W celu określenia możliwego wkładu w wytworzeniu zmiany z formy androgenozależnej (AS) na androgenoniezależną (AI), która zachodzi podczas terapii z wykorzystaniem ADHT – wyciszano ekspresję AR, Akt i β -kateniny odpowiednim siRNA.

Uzyskane wyniki sugerują, że w komórkach raka prostaty przeważa sygnalizacja AR lub Akt, w zależności od ich początkowej wrażliwości na androgeny i dostępności tych czynników. W komórkach raka prostaty AI Akt przejmuje rolę AR i skuteczniej przyczynia się, poprzez tę samą cząsteczkę sygnalizacyjną - β -kateninę, do progresji raka AI.

Zastąpienie funkcji AR przez Akt w sygnalizacji z udziałem β -kateniny może bezpośrednio przyczynić się do progresji nowotworu w przypadku utraty wrażliwości/uzależnienia od androgenów. Stosując indukowalny system aktywacji Akt, wnioskuję że Akt odgrywa funkcjonalną rolę w progresji AI raka prostaty. Transdukcja sygnału z udziałem Akt wydaje się być powiązana z modulacją poprzez AR podstawowych właściwości komórkowych z udziałem jak dotąd nie do końca poznanego mechanizmu. Wyniki mogą stanowić nowy cel modulatorów receptora jądrowego i wskazywać ich potencjał do celów terapeutycznych w leczeniu raka prostaty.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Możliwość wykorzystywania w eksperymentach badawczych linii komórkowych zwróciło moją uwagę na szersze podejście kliniczne, dlatego też przy prowadzonej współpracy z Kliniką Urologiczną UJCM, mając możliwość weryfikacji uzyskanego materiału biologicznego przez patologa – współpraca z Kliniką Patologii UJCM, posiadając zgodę komisji bioetycznej, wykorzystałam pozyskany materiał do wyprowadzenia pierwotnych linii komórkowych, które pozwoliły mi na szersze podejście w próbie zrozumienia dość skomplikowanego szlaku sygnalizacji komórkowej w gruczole stercza. W wyniku współpracy z Katedrą Biochemii i Neurologii UJ udało się przeprowadzić analizę profilu białkowego komórek prostaty o różnej wrażliwości androgenowej. Powstała praca:

A. Drabik, D. Ciołczyk-Wierzbicka, J. Dulińska-Litewka, A. Bodzoń-Kulakowska, P. Suder, J. Silberring, P. Laidler, A comparative study of glycoproteomes in androgen-sensitive and -independent prostate cancer cell lines, Mol Cell Biochem (2014) 386:189–198.

Prowadząc badania w zakresie zmian nowotworowych, rozpoczęłam w 2004 roku współpracę z Kliniką i Katedrą Ginekologii, Patologii i Położnictwa UJCM w Krakowie, gdzie prowadziłam badania w zakresie patologii szyjki macicy jako główny wykonawca projektu przyznanego przez NCN Nr 2 P05C 018 pt. „Ekspresja czynników proangiogennych VEGF i ich receptorów oraz markerów limfoangiogenezy: podoplaniny, prox-1 w śródbłonkowej neoplazji (CIN) i raku wczesno-inwazyjnym szyjki macicy u kobiet nie będących w ciąży i ciężarnych" (Kierownik - dr n. med. Robert Jach, Katedra Ginekologii i Położnictwa, Collegium Medicum UJ, Termin: 2004-2006). Prowadzone badania nad ekspresją czynników wzrostu śródbłonka naczyń VEGF-C i D, VEGFR-3 jako czynników prognostycznych w śródnabłonkowej neoplazji sromu (VIN) i inwazyjnym raku sromu zaowocowały powstaniem publikacji:

B. Bystrowska, E. Gomółka, A. Szczudrawa, J. Brandys, M. Pawlik, T. Milewicz, J. Dulińska-Litewka, R. Jach, Rapid HPLC method for the determination of vitamin A and E

and cotinine concentration in human serum in women with CIN and cervical cancer, Ginekol. Pol. 2009 : T. 80, nr 4, s. 256-262;

R. Jach, J. Dulińska-Litewka, P. Laidler, A. Szczudrawa, A. Kopera, Ł. Szczudlik, M. Pawlik, K. Zając, M. Mak, A. Basta, Expression of VEGF, VEGF-C and VEGFR-2 in situ and invasive SCC of cervix, Front. Biosci. (Elite ed.) 2010 : Vol. 2, s. 411-423;

R. Jach, M. Dumin, M. Radoń-Pokracka, A. Basta, Z. Kojs, K. Karolewski, M. Klimek, P. Blecharz, G. Ziętański, J. Dulińska-Litewka, HPV infection and HPV-related malignancies, Current Gynecologic Oncology 2010, vol 8, no3;

R. Jach, G. Dyduch, M. Radon-Pokracka, P. Przybylska, M. Mika, J. Dulińska-Litewka, K. Zajac, H. Huras, J. Streb, K. Stangel-Wojcikiewicz, O. Dziadek, B. Galarowicz. Tytuł oryginału: Expression of vascular endothelial growth factors VEGF- C and D, VEGFR-3, and comparison of lymphatic vessels density labeled with D2-40 antibodies as a prognostic factors in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and invasive vulvar cancer. Neuroendocrinol. Lett. 2011 : Vol. 32, nr 4, s. 530-539.

Istotnym elementem prowadzonych badań było też określenie roli czynników wpływające na ludzkiego wirusa brodawczaka, określenie m.in. czynników morfologicznych i biochemicznych mających wpływ na proces kancerogenezy w obrębie szyjki macicy. Badania miały także na celu wyjaśnienie roli wysoko onkogennych cząsteczek E6/E7 HPV na śródbłonkową neoplazję szyjki macicy. Badania te zostały opublikowane w pracy:

B. Galarowicz, R. Jach, J. Kędzierska, G. Dyduch, K. Zając, K. Pityński, T. Banaś, H. Huras, J. Streb, J. Dulińska-Litewka, V. Hosiawa, M. Juszcak, T. Milewicz, The role of mRNA E6/E7 HPV high oncogenic risk expression in colposcopy of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), Przegląd Lekarski. 2012 : T. 69, nr 9, s. 651-657.

Praca z komórkami wymaga ciągle nowych wyzwań, dlatego też bardzo ważnym elementem mojej działalności naukowej jest współpraca z Instytutem Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie, dzięki której istnieje możliwość oznaczania elastyczności pojedynczej żywej komórki poprzez zastosowanie mikroskopu sił atomowych (Atomic Force Microscopy, AFM). Metoda ta pozwoliła na precyzyjne scharakteryzowanie komórek stercza ludzkiego zarówno w tkance prawidłowej jak i zmienionej nowotworowo. Współpraca zaowocowała publikacją:

M. Lekka, D. Gil, K. Pogoda, J. Dulińska-Litewka, R. Jach, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, K. Okon., P. Laidler, Cancer cell detection in tissue sections using AFM, Arch. Biochem. Biophys. 2012 : Vol. 518, nr 2, s. 151-156.

Równolegle do badań uwzględnionych w przewodzie habilitacyjnym, prowadziłam badania mające na celu zbadanie ekspresji antygenu membranowo specyficznego w

komórkach prostaty (PSMA). Podczas progresji raka prostaty ogólna ekspresja swoistego dla prostaty antygenu błonowego PSMA wzrasta wraz z jego pojawieniem się w błonie komórkowej. Jednakże, zaskakująco, niektóre niezależne od androgenów linie komórkowe raka prostaty nie wykazują ekspresji tego białka. Dlatego też zastosowano estradiol i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów jako czynniki mające wpływ na reekspresję białka w wyraźnie odróżnionych komórkach raka gruczołu krokowego PC-3 i w Du 145. Białko to można zaproponować jako marker do szacowania zmian nowotworowych w gruczole stercza. Wyniki zostały opublikowane w pracy:

P. Laidler, J. Dulińska, M. Lekka, J. Lekki, Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3, Arch. Biochem. Biophys. 2005 : Vol. 435, nr 1, s. 1-14.

Połączenie współpracy z Kliniką Urologii, Patomorfologii i Katedrą Biochemii Lekarskiej pozwala mi na realizację tematów dotyczących właściwości badanych komórek zarówno prostaty jak i pęcherza. W wyniku prowadzonej współpracy powstały publikacje:

M. Lekka, D. Gil, K. Pogoda, J. Dulińska-Litewka, R. Jach, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, K. Okoń, P. Laidler, Cancer cell detection in tissue sections using AFM, Arch. Biochem. Biophys. 2012 : Vol. 518, nr 2, s. 151-156;

M. Lekka, P. Laidler, J. Dulińska, M. Łabędź, G. Pyka, Probing molecular interaction between concanavalin A and mannose ligands by means of SFM, Eur. Biophys. J. 2004 : Vol. 33, nr 7, s. 644-650.

Dodatkowo współpraca także z Instytutem Fizyki Jądrowej PAN pozwoliła na zbadanie kolejnych bardzo ważnych elementów regulacji komórkowej w gruczole stercza m.in. jonów cynku bardzo istotnych dla pełnionej funkcji gruczołu, a także zbadanie odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia indukowane w komórkach raka gruczołu krokowego PC-3 przez napromienianie wiązką protonów.

Badania były realizowane ze środków przyznanych z Unii Europejskiej w 6 Programie Ramowym – European Community under the Contract RII3-CT-2004-506008 (IA-SFS) (Hasylab project No I-20070071 EC) – oraz dotacji na badania w Karlsruhe Institute of Technology – Application for Beamtime at ANKA; 2011. W obu projektach byłam głównym wykonawcą. W wyniku tej współpracy powstały prace:

M. Podgórczyk W. M. Kwiatek, W. M. Zając, J. Dulińska-Litewka, E. Welter and D. Grolimund, Zinc in native tissues and cultured cell lines of human prostate studied by SR-XRF and XANES X-Ray Spectrom. 2009, 38, 557–562;

E. W. Lipiec, A. Wiecheć, J. Dulińska-Litewka, M. Kubicka, J. Lekki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, W. M. Kwiatek, Changes in cellular response to the damage induced in PC-

3 prostate cancer cells by proton microbeam irradiation, Gen. Physiol. Biophys. (Online) 2012 : Vol. 31, nr 1, s. 11-18;

J. Czapla, W. M. Kwiatek, J. Lekki, J. Dulińska-Litewka, R. Steininger, J. Gottlicher, Chemical species of sulfur in prostate cancer cells studied by XANES spectroscopy, Radiat. Phys. Chem. 2013 : Vol. 93, s. 154-159.

Moje zainteresowania badawcze są także związane z wpływem składników diety na metabolizm komórki prawidłowej i zmienionej nowotworowo. W cyklu prac związanych z opisanym dziełem stosowałam beta-karoten i kwas linolowy, ale doświadczenia te przeniosłam także na badania realizowane we współpracy z Akademią Rolniczą, z Wydziałem Technologii Żywności i Żywnienia, prowadząc badania z wykorzystaniem linii komórkowych prostaty i piersi. W wyniku współpracy opublikowano prace:

A. Koronowicz, J. Dulińska-Litewka, P. Pisulewski, P. Laidler, Wpływ lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego w izomery sprzężonego kwasu linolowego na proliferację komórek MCF-7, ŻYWNOSĆ, Nauka, Technologia, Jakość, 2009, 4 (65), 53-59;

A. Koronowicz, J. Dulińska-Litewka, P. Pisulewski, P. Laidler, Wpływ lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego w izomery sprzężonego kwasu linolowego na proliferację komórek MCF-7. Effect of lipids originating from egg yolk enriched with conjugated linoleic acid isomers on proliferation on mammary cancer cells. Żywność Nauka Technologia Jakość 2009 : R. 16, nr 4, s. 53-59;

A. Koronowicz, M. Drozdowska, B. Wielgos, E. Piasna-Shupecka, D. Domagała, J. Dulińska-Litewka, T. Leszczyńska, The effect of "NutramilTM Complex," food for special medical purpose, on breast and prostate carcinoma cells, Plos one. 2018 : Vol. 13, No 2; art. no. e0192860, 1-19.

Badania z wykorzystaniem beta-karotenu [BC] w odniesieniu do sygnalizacji komórkowej pozwoliły mi w 2005 roku na podjęcie kolejnego etapu pracy z BC w projekcie Europejskiej Korporacji w Nauce i Technice COST EUROCAROTENOID CA15136 pt: European Network to Advance Carotenoid Research and Applications in Agro-food and Health, gdzie pełnię funkcję vice lidera sekcji G3 zajmującej się wpływem karotenoidów występujących w żywności na zdrowie człowieka. W wyniku współpracy byłam współorganizatorem konferencji międzynarodowych dotyczących karotenoidów.

W wyniku współpracy w COST jestem zaangażowana jako koordynator pracy w przygotowanie pracy przeglądowej dotyczącej roli karotenoidów w regulację szlaków sygnalizacyjnych w różnych tkankach w organizmie człowieka mających powiązanie z powstającymi procesami nowotworowymi.

Inne prace dotyczące działania BC na komórki ludzkie powstały w wyniku współpracy z Kliniką Hematologii UJ CM czy Katedrą Biochemii Klinicznej UJCM:

T. Sacha, M. Zawada, **J. Dulińska-Litewka**, Z. Lach, M. Szostek, M. Bodzioch, P. M. Laidler, A. Dembińska-Kieć, I. Florek, S. Czekalska, A. B. Skotnicki, *Wpływ beta-karotenu na ekspresję proapoptotycznych genów BAX i CAPN2 w komórkach linii ostrej białaczki szpikowej HL-60, U-937 i TF-1; analiza techniką mikromacierzy, ilościowej PCR i Western Blot.: Beta-carotene regulates the Expression of proapoptotic BAX and CAPN2 in HL-60, U-937 and TF-1 - human acute myeloid leukemia cell lines; microarray, RQ-PCR and Western Blot analysis*, *Przegląd Lekarski*. 2011 : T. 68, nr 5, s. 258-262;

M. Bodzioch, A. Dembinska-Kiec, J. Hartwich, K. Lapicka-Bodzioch, A. Banas, A. Polus, J. Grzybowska, I. Wybranska, **J. Dulinska**, D. Gil, P. Laidler, W. Placha, M. Zawada, A. Balana-Nowak, T. Sacha, B. Kiec-Wilk, A. Skotnicki, C. Moehle, T. Langmann, G. Schmitz, *The microarray expression analysis identifies BAX as a mediator of β -carotene effects on apoptosis*, *Nutr. Cancer* 2005 : Vol. 51, nr 2, s. 226-235.

Od 2007 roku prowadzę współpracę z Instytutem Chemii Uniwersytet Jagiellońskiego oraz Akademią Górniczo-Hutniczą. Naszym celem jest opracowanie zaawansowanego układu w postaci nanocząstek magnetycznych, który przyłączany byłby w sposób selektywny do powierzchni krążących komórek nowotworowych (CTCs – circulating tumour cells), co pozwoli na ich detekcję i wychwyt z wykorzystaniem pola magnetycznego. W wyniku prowadzonej współpracy udało się zaprezentować wyniki na kilku konferencjach międzynarodowych.

Współpraca zaowocowała ponadto powstaniem pracy przeglądowej dotyczącej roli nanocząsteczek tlenku żelaza SPION i możliwości ich wykorzystania w aplikacji medycznej.

J. Dulińska-Litewka, A. Łazarczyk, P. Hałubiec, O. Szafranski, K. Karnas, A. Karewicz, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications*, *Materials* 2019 : Vol. 12, nr 4 art. no. 617, s. 1-26.

Od początku swojej kariery jako badacz zajmuję się różnym podejściem eksperymentalnym aby móc rozwiązać podstawowy problem, jakim jest brak możliwości leczenia nowotworu stercza. Odnalezienie mechanizmu regulacji ekspresji nie tylko kadheryn prostatowo-swoistych czy też metaloproteinaz ale także ingerencja w szlaki z udziałem MAPK/ERK1/2 w obu typach nowotworu stwarzają szansę na zrozumienia zależności zmian w ekspresji tych grup białek i inwazyjności nowotworu, a także stwarza szansę zastosowania odpowiednich markerów procesu nowotworowego dla nowotworów hormonozależnych. W wyniku współpracy z Instytutem Zoologii powstała praca:

E. Górowska-Wójtowicz, A. Hejmej, A. Kamińska, L. Pardyak, M. Kotula-Balak, **J. Dulińska-Litewka**, P. Laidler, B. Bilińska, *Anti-androgen 2-hydroxyflutamide modulates cadherin, catenin and androgen receptor phosphorylation in androgen-sensitive LNCaP and androgen-independent PC3 prostate cancer cell lines acting via PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 pathways*. *Toxicology in Vitro*. 2017 : Vol. 40, s. 324-335.

W Katedrze Biochemii Lekarskiej, gdzie jestem zatrudniona, także prowadzę szeroką współpracę z różnymi zespołami badawczymi głównie w zakresie mechanizmów regulacji procesów nowotworowych, ponieważ współpraca w zakresie sygnalizacji komórkowej w różnych nowotworach jest szczególnie bliska moim zainteresowaniom i prowadzonym badaniom z wykorzystaniem komórek prostaty, piersi czy też pęcherza. Dodatkowo w obecnie prowadzonych badaniach interesuje mnie mechanizm regulacji przejścia epithelialno-mezenchymalne [EMT].

W wyniku współpracy w tym zakresie powstały prace:

D. Gil, D. Ciołczyk-Wierzbička, J. Dulińska-Litewka, P. Laidler, Integrin-linked kinase regulates cadherin switch in bladder cancer, Tumor Biology. 2016, Vol 37; 15185–15191;

D. Gil, D. Ciołczyk-Wierzbička, J. Dulińska-Litewka, K. Żwawa, J. A. McCubrey, P. Laidler, The mechanism of contribution of integrin linked kinase (ILK) to epithelial-mesenchymal transition (EMT), Adv. Enzyme Regul. 2011 : Vol. 51, nr 1, s. 195-207;

Innym ciekawym zagadnieniem jest wpływ związków zawierających siarkę na progresję procesów nowotworowych. W wyniku współpracy z Zespołem badającym związki tiolowe W Katedrze Biochemii lekarskiej UJCM powstała praca:

J. Dulińska-Litewka, P. Bronowicka-Adamska, M. Wróbel, Comparative effect of diallyl disulphide, cystathionine, N-acetylcysteine and thiosulfate on PC-3 cells proliferation, sulfurtransferases expression and sulfane sulfur levels, International Journal of Indigenous Medicinal Plants. 2014 : Vol. 47, nr 2, s. 1660-1668;

Od 2005 roku kontynuuję współpracę z zespołem Katedry Biochemii Lekarskiej UJCM na temat określenia roli chitozanu na proliferację jak i szlaki sygnalizacji komórkowej w metabolizmie glukozy jak również regulacji związanej z hamowaniem procesu nowotworowego z udziałem AKT w komórkach mysich i ludzkich. W wyniku tej współpracy powstały prace:

J. Ignacak, J. Dulińska-Litewka, I. Pałka, The effect of highly deacetylated microcrystalline chitosan on the pyruvate kinase gene expression in normal mouse mammary epithelial cells and Ehrlich ascites tumor (EAT) cells, Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv. 2006 : Vol. 11, s. 137-143;

J. Ignacak, J. Dulińska-Litewka, I. Pałka, M. Wiśniewska-Wrona, A. Niekraszewicz, The effect of microcrystalline chitosan on the activity of pyruvate kinase M2 isoenzyme involved in regulating proliferation of Ehrlich ascites tumor (EAT) cells in vitro, Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv. 2009 : Vol. 14, s. 111-120;

J. Ignacak, M. Wiśniewska-Wrona, J. Dulińska-Litewka, I. Pałka, J. Zagajewski, A. Niekraszewicz, Effect of oligochitosans on expression of iNOS gene in Ehrlich ascites tumour in vitro, Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv. 2012 : Vol. 17, s. 137-144;

J. Ignacak, M. Wiśniewska-Wrona, J. Dulińska-Litewka, I. Pałka, M. Kucharska, The role of oligochitosans in AKT kinase regulation. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, Volume XX, 2015; 73-81;

J. Ignacak, M. Wiśniewska-Wrona, J. Dulińska-Litewka, I. Pałka, M. Kucharska, J. Kazimierski, The role of chitosan in akt kinase regulation activity, Prog.Chem Appl. Chitin Deriv. 2016 : Vol. 21, 73-82;

Dodatkowo współpraca z Instytutem Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, w zakresie zmian proliferacji i regulacji procesów apoptozy w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo pod wpływem rybozydu kinetyny, zaowocowała powstaniem pracy:

P. Dudzik, J. Dulińska-Litewka, E. Wyszko, P. Jędrychowska, M. Opalka, J. Barciszewski, P. Laidler, Effects of kinetin riboside on proliferation and proapoptotic activities in human normal and cancer cell lines, J. Cell. Biochem. 2011: Vol. 112, nr 8, s. 2115-2124.

W ramach współpracy z Engelhardt Institute of Molecular Biology (EIMB) Moscow, jako opiekun naukowy doktoranta, przeprowadziłam cykl badań mających na celu analizę porównawczą nowych wariantów alleli w obserwowanych w hodowlach komórkowych prostaty. W wyniku współpracy powstała praca:

L.I. Kovalev, A.A. Makarov, E.A. Cherkašin, J. Dulinska, M.A. Kovaleva, K.V. Lisickaja, A.V. Ivanov, I. Ju. Toropygin, M.V. Serebrjakova, P. Laidler, S.S. Šiškin. Novyj allelnyj variant triozofosfatizomerazy, vyjavlennyj b kultiviruemych kletkach paka predstatelnoj železy čeloveka. A novel allelic variant of the triosophosphate isomerase found in cultured cells of human prostate cancer. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011, nr 1, s. 14-19.

Dodatkowo w wyniku współpracy z Department of Microbiology and Immunology, Brody School of Medicine, USA, jestem współautorem prac przeglądowych, które dotyczą szeroko pojętego problemu regulacji komórkowej w różnych typach nowotworów:

J. A. McCubrey, K. Lertpiriyapong, L. S. Steelman, S.L. Abrams, Li V. Yang, R.M. Murata, P. L. Rosalen, A. Scalisi, L. M. Neri, L. Cocco, S. Ratti, A.M. Martelli, P. Laidler, J. Dulińska-Litewka, D. Rakus, A. Gizak, P. Lombardi, F. Nicoletti, S. Candido, M. Libra, G. Montalto, M. Cervello. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. Aging (Albany, N.Y. Online) 2017 : Vol. 9, nr 6, s.1477-1536;

N. M. Davis, M. Sokolosky, K. Stadelman, S. L. Abrams, M. Libra, S. Candido, F. Nicoletti, J. Polesel, R. Maestro, A. D'Assoro, L. Drobot, D. Rakus, A. Gizak, P. Laidler, J. **Dulińska-Litewka**, J. Basecke, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, G. Montalto, M. Cervello, T. L. Fitzgerald, Z. N. Demidenko, A. M. Martelli, L. Cocco, L. S. Steelman, J. A. McCubrey. *Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. Oncotarget 2014 : Vol. 5, nr 13, s. 4603-4650;*

J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, L. Sun, N. M. Davis, S. L. Abrams, R. A. Franklin, L. Cocco, C. Evangelisti, F. Chiarini, A. M. Martelli, M. Libra, S. Candido, G. Ligresti, G. Malaponte, M. C. Mazzarino, P. Fagone, M. Donia, F. Nicoletti, J. Polesel, R. Talamini, J. Basecke, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, M. Milella, A. Tafuri, **J. Dulińska-Litewka**, P. Laidler, A. B. D'Assoro, L. Drobot, K. Umezawa, G. Montalto, M. Cervello, Z. N. Demidenko. *Advances in targeting signal transduction pathways. Oncotarget 2012 : Vol. 3, nr 12, s. 1505-1521,*

Podsumowanie

Moje obecnie zainteresowania koncentrują się nad wyjaśnieniem mechanizmów zaangażowanych w regulację komórki prawidłowej i zmienionej nowotworowo. Badania prowadzone w licznych układach badawczych, łącznie z materiałem pochodzącym od pacjenta, dają możliwość w przyszłości zastosowania uzyskanych wyników w diagnostyce, czy też terapii klinicznej.

6. Bibliografia:

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, wydanie 68 (6), (2018), strony 394-424
2. American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures 2018*, American Cancer Society, Atlanta 2018, dostępne na stronie:
3. Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 05/04/2019.
4. Heidenreich A., Bolla M., Joniau S., Mason M. D., Matveev V., Mottet N., Schmid H.-P., van der Kwast T. H., Wiegel T., Zattoni F., *Wytyczne postępowania u chorych na raka stercza*, opracowane i przyjęte przez Polskie Towarzystwo Urologiczne, Warszawa 2011, dostępne na stronie: <https://pturol.org.pl/Image/files/Guidelines%20WYTYCZNE%20rak%20stercza.pdf>
5. Mattsson JM, Ravela S, Hekim C, Jonsson M, Malm J, Närvänen A, Stenman UH, Koistinen H. Proteolytic activity of prostate-specific antigen (PSA) towards protein substrates and effect of peptides stimulating PSA activity. *PLoS One*. 2014 Sep 19;9(9)

6. Denmeade SR, Sokoll LJ, Chan DW, Khan SR, Isaacs JT (2001) Concentration of enzymatically active prostate-specific antigen (PSA) in the extracellular fluid of primary human prostate cancers and human prostate cancer xenograft models. *Prostate* 48: 1–6.
7. Wen Y1, Hu MC, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, Yan DH, Hung MC. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):6841-5.
8. M Siampanopoulou, G Galaktidou, N Dimasis, and A Gotzamani-Psarrakou. Profiling serum HER-2/NEU in prostate cancer. *Hippokratia.* 2013 ; 17(2): 108–112.
9. Taira A1, Merrick G, Wallner K, Dattoli M. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park).* 2007 Jul;21(8):1003-10.
10. Saraon P., Drabovich A. P., Jarvi K. A., Diamandis E. P., *Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer*, *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory*, wydanie 25, (2014), strony 42-54
11. Koryakina Y., Ta H. Q., Gioeli D., *Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences*, *Endocrine-Related Cancer*, wydanie 21(4): T131–T145, (2015)
12. Faris Azzouni, Alejandro Godoy, Yun Li, and James Mohler . The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. *Advances in Urology.* 2012. 2012, 18 pagesReview Article
13. G. L. Andriole, P. Humphrey, P. Ray et al., “Effect of the dual 5 α -reductase inhibitor dutasteride on markers of tumor regression in prostate cancer,” *Journal of Urology*, vol. 172, no. 3, pp. 915–919, 2004.
14. 5-alfa-reductaze deficiency <https://emedicine.medscape.com/article/924291-overview>
15. Roxanne Toivanen, Michael M. Shen. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Review. Development* 2017 144: 1382-1398
16. Yeung F, Li X, Ellett J, Trapman J, Kao C, Chung LW. Regions of prostate-specific antigen (PSA) promoter confer androgen-independent expression of PSA in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29;275(52):40846-55.
17. John Lai Mary-Anne Kedda Kimberly Hinze Robert L.G. Smith John Yaxley Amanda B. Spurdle C.Phillip Morris Jonathan Harris Judith A. Clements. PSA / KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility . *Carcinogenesis*, Volume 28, Issue 5, May 2007, Pages 1032–1039,
18. Medeiros R, et al. Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells, *Prostate* , 2002, vol. 53 (pg. 88-94)
19. Lei Zhang Xiao-Wen Zhang Chun-Hui Liu Kai Lu Ye-Qing Huang Yi-Duo Wang Li Xing Li-Jie Zhang Ning Liu Hua Jiang Chao Sun Yu Yang Shu-Qiu Chen Ming Chen Bin Xu. miRNA-30a functions as a tumor suppressor by downregulating cyclin E2 expression in castration-resistant prostate cancer, *Medicine report.* 2016: 2077-2084
20. Crumbaker M., Khoja L., Joshua A. M., *AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer*, *Cancers (Basel)*, wydanie 9(4): 34, (2017)
21. Olokpa E., Moss P. E., Stewart L. V., *Crosstalk between the Androgen Receptor and PPAR Gamma Signaling Pathways in the Prostate*, *PPAR research*, wydanie 2017: 9456020, (2017)

22. Daniels G., Pei Z., Logan S. K., Lee P., *Mini-review: androgen receptor phosphorylation in prostate cancer*, American Journal of Clinical and Experimental Urology, wydanie 1(1):25–29, (2013)
23. Clinic of the National Cancer Institute: history, organization, and status. Control Clin Trials. 2000 Dec;21(6 Suppl):251S-272S.
24. Bohn, T., Desmarchelier, C., Dragsted, L.O., Nielsen, C.S. *et al.* Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Mol Nutr Food Res* 2017, 61,
25. Gohagan JK1, Prorok PC, Hayes RB, Kramer BS; Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial Project Team. The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial
26. Louise M. Freeman, S. Marc Breedlove, Receptors: Model Systems and Specific Receptors in Methods in Neurosciences, 1993
27. P. Dudzik, **J. Dulińska-Litewka**, E. Wyszko, P. Jędrychowska, M. Opalka, J. Barciszewski, P. Laidler, Effects of kinetin riboside on proliferation and proapoptotic activities in human normal and cancer cell lines, J. Cell. Biochem. 2011: Vol. 112, nr 8, s. 2115-2124.

7. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Dydaktyka stanowi bardzo ważny element mojej pracy zawodowej i jednocześnie dostarcza mi dużo satysfakcji. Szczególnie cenię sobie możliwość wykorzystania posiadanego wykształcenia chemicznego oraz biochemicznego w procesie nauczania. Bardzo ważnym elementem w procesie nauczania, zwłaszcza w pracy ze studentami Wydziału Lekarskiego, jest wiedza w zakresie medycyny, którą nabyłam jako wolny słuchacz, co zdecydowanie ułatwia mi przekazywanie wiedzy biochemicznej z możliwością wskazania studentom późniejszego wykorzystania nauk biochemicznych w praktyce medycznej, zwłaszcza do interpretacji wyników biochemicznych celem postawienia odpowiedniej diagnozy. Umiejętność łączenia tych aspektów zdobyłam między innymi poprzez prowadzenie zajęć ze studentami II roku Wydziału Lekarskiego UJCM, w języku polskim i angielskim „Wstęp do Nauk Klinicznych” a także zajęć zintegrowanych w zakresie biochemii i ginekologii ze studentami IV roku Kierunku Lekarskiego i studentami IV roku Szkoły anglojęzycznej, UJ CM.

Zajęcia w języku polskim i angielskim z chemii, biochemii, biochemii zintegrowanej z nefrologią a także ginekologią w szczególności są to wykłady, seminaria, konwersatoria i zajęcia laboratoryjne:

1. Biochemia z elementami Chemii dla studentów 1-go roku kierunku Lekarskiego Wydziału Lekarskiego UJ CM
2. Biochemia z elementami Chemii dla 1-go roku kursu sześcioletniego Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców w j. angielskim
3. Biochemia z elementami Chemii dla 1-go roku kursu pięcioletniego Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców w j. angielskim
4. Chemia Żywności dla studentów 1-go roku kierunku dietetyka Wydziału Lekarskiego UJ CM – *koordynator kursu* – opracowanie ćwiczeń, wykładów, prezentacji z zakresu Chemia żywności jako wprowadzenie do Biochemii Żywności

5. Biochemii dla studentów 2-go roku kierunku lekarsko-dentystycznego Wydziału Lekarskiego UJ CM
6. Biochemii jamy ustnej dla studentów 3 i 4-go roku kierunku lekarsko-dentystycznego Wydziału Lekarskiego UJ CM
7. Biochemii dla studentów 1-go roku kursu czteroletniego Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców w j. angielskim
8. Biochemii na I i II roku Kierunku Weterynaria – Akademia Rolnicza z UJCM
9. Wstęp do nauk Klinicznych – II rok Kierunek Lekarski, Wydział Lekarski
10. Zajęcia zintegrowane Ginekologia w aspekcie biochemicznym, implantacja, zapłodnienie- regulacja hormonalna, diagnostyka biochemiczna, molekularna, badania przesiewowe - IV rok w ramach zajęć zintegrowanych dla studentów lat 4-6 kierunku lekarskiego Wydziału Lekarskiego UJ CM także dla studentów Szkoły Medycznej dla obcokrajowców w j. angielskim – *koordynator kursu dla WL UJCM oraz Szkoły Medycznej*
11. Biochemia ze studentami I roku Analityki Medycznej – studia podyplomowe, Wydział Farmacji UJCM
12. Biologia komórki – hodowle komórkowe, wnikanie nanocząstek do komórki prawidłowej i zmienionej nowotworowo - dla studentów AGH na Wydziale Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Inżynierii Biomedycznej

Dodatkowo moje zainteresowania biologią molekularną pozwoliły mi na opracowanie cyklu ćwiczeń w zakresie genetyki, które wykorzystano w przygotowaniu prac:

Joanna Dulińska, Piotr Laidler. Kwasy nukleinowe, w *Ćwiczenia z chemii i biochemii dla studentów medycyny i stomatologii pod red. Teresy Stelmaszyńskiej-Zgliczyńskiej i Piotra Laidlera*, Kraków : Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2001s. 88-102 Rozdział w podręczniku, praca oryginalna

Piotr Laidler, Radosława Kuciel, Joanna Dulińska, Dorota Gil, Aleksandra Mazurkiewicz, Maria Wróbel. From gene to protein : prostatic acid phosphatase. Structure and expression of gene and protein. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2004 : Vol. 32, nr 6, s. 400-409, Praca przeglądowa

Dodatkowo opracowane materiały zostały wykorzystane do przygotowania skryptu:

Joanna Dulińska-Litewka, Piotr Laidler, Sławomir Olszowski, Barbara Piekarska, Barbara Stopa, Maria Wróbel, pod red. Piotra Laidlera, Barbary Piekarskiej, Marii Wróbel; Kraków *Ćwiczenia z biochemii : dla studentów Wydziału Lekarskiego: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2014 – wydanie, monografia oraz wydaniem monografii uzupełnionej w 2018 roku*

Od 2013 roku pełnię funkcję opiekuna naukowego studentów przystępujących do Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej dla studentów Uczelni Medycznych „SUPERHELISA ” . Prowadząc zajęcia przygotowawcze w zakresie biochemii uzyskali liczne nagrody np. 2013 I miejsce drużynowo, II, III i IV Indywidualnie; 2016 IV miejsce ZESPOŁOWO 5 i 7 indywidualnie; 2017 II MIEJSCE w klasyfikacji Zespołowej oraz III, IV i VII miejsce w klasyfikacji indywidualnej.

Za uzyskanie wysokiej punktacji od studentów za prowadzone zajęcia w j. polskim i angielskim zostałam w 2014 roku wliczona w poczet nauczycieli akademickich Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum posiadających wybitne kwalifikacje i osiągnięcia dydaktyczne i jednocześnie jestem członkiem Wydziałowego Klubu „Laudatio Docendi”.

Za osiągnięcia dydaktyczne otrzymałam także Indywidualną Nagrodę Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2016 i 2017 roku. W roku 2017 zostałam zaliczona przez studentów Szkoły Anglojęzycznej do grupy najlepszych asystentów z zakresu biochemii. KURS I-VI w latach 2011-2017 a w roku 2010 i 2012 dostałam nagrodę indywidualną za zajęcia ze studentami w Szkole Anglojęzycznej.

Od 2013 roku jestem koordynatorem kursu Chemia Żywności na Kierunku Dietetyka UJCM – w 2018 roku kurs poddany ocenie przez Komisję Oceniającą Efekty nauczania został oceniony na najwyższym poziomie. W ramach kursu prowadzę wykłady, seminaria i zajęcia laboratoryjne.

W ramach współpracy z Wydziałem Chemii wypromowałam 6 magistrantów i byłam opiekunem naukowym 5 prac magisterskich. Obecnie jestem opiekunem naukowym doktorantki ze Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed, przygotowującej pracę nt. „Opracowanie cząstek magnetycznych modyfikowanych przeciwciałami monoklonalnymi do zastosowania w selektywnym wychwycie komórek nowotworowych”.

W roku 2014/2015 zainicjowałam działanie Koła Naukowego Biochemii Lekarskiej, pełniąc funkcję opiekuna Studenckiego Naukowego Koła Biochemii Lekarskiej UJCM. W tym samym roku został zgłoszony pierwszy projekt badawczy studentów „Rola statyn w regulacji potencjału inwazyjnego ludzkich komórek nowotworu prostaty” który uzyskał finansowanie na realizację badań. Studenci rozpoczęli badania, a kolejne lata przyciągają coraz to nowych młodych badaczy. Uzyskane wyniki badawcze są licznie prezentowane na Międzynarodowych Konferencjach w kraju i za granicą, gdzie uzyskują liczne nagrody i wyróżnienia, czy też są przygotowywane w formę publikacji. Obecnie główne zadania badawcze są realizowane w zakresie biologii molekularnej, sygnalizacji komórkowej w prawidłowej i zmienionej nowotworowo tkance gruczołu stercza, piersi czy raka jelita grubego. Do realizacji tematów badawczych wprowadzone są najnowsze techniki badawcze (m.in. hodowle komórkowe, RT-PCR, RQ-PCR, WB, migracja, siRNA, zymogramy) pozwalające na analizę sygnalizacji komórkowej po zastosowaniu specyficznych regulatorów, inhibitorów badanych szlaków. Realizacja postawionych zadań badawczych jest możliwa dzięki współpracy z Jednostkami Klinicznymi UJ CM - Klinikami Urologii, Onkologii, Chirurgii, Ginekologii. W SNKBL integruje działania studentów Wydziału lekarskiego, farmacji, analityki UJCM także Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców oraz studentów AGH Kierunku Inżynierii Biomedycznej,

Praca w Kole Naukowym pozwoliła mi na wypromowanie aktywnych studentów, którzy wzięli udział w wymianie międzynarodowej i krajowej (MOSTUM) m.in. Erasmus Monachium 2016, Esmo kurs dla studentów Walencja 2016, Eso-esso - estro kurs Poznań 2016; Erasmus Jena, Niemcy, 2016; Erasmusie w Wiedniu 2016 Stypendium DAAD Würzburgu - l2019, a także mogli uczestniczyć w kursach i praktykach z zakresu medycyny m.in. ESO-ESSO-ESTRO Multidisciplinary Course in Oncology w Poznaniu, praktyki na oddziale chirurgii plastycznej i rekonstrukcyjnej w Wiedniu, Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien Laureat Projektu "GoGreat" , we Lwowie czy Niemczech. Byli też laureatami nagród za działalność naukową.

Od 2015 roku jestem opiekunem naukowym studentów zrzeszonych w Międzynarodowym Stowarzyszeniu Studentów IFMSA, odbywających praktyki medyczne w Katedrze Biochemii Lekarskiej UJCM. W ramach praktyk studenci realizują zadania badawcze pt. Prostate cancer progression – epithelial transition. Studenci z IFMSA to studenci z Międzynarodowych Jednostek Klinicznych jak Tajlandia, lipiec 2018; Kanada, Lipiec 2017; Oman, Lipiec 2017; Belgrade, Serbia - Sierpień 2017; Portugalia, Sierpień 2017; Bułgaria, Lipiec 2016; Finlandia, Lipiec 2016; Hiszpania, Sierpień 2016; Rosja lipiec 2015.

Jestem także zaangażowana w organizację Festiwalu Nauki w Krakowie, gdzie ze studentami z Koła Naukowego aktywnie uczestniczymy w jego prowadzeniu.

5. Podsumowanie całości dorobku

Jestem współautorem 38 oryginalnych prac badawczych, 8 publikacji przeglądowych, 4 rozdziałów w monografiach i 165 doniesień zjazdowych, większość prezentowana powyżej. Wśród wszystkich prac, które powstały przy moim udziale, byłam dziesięciokrotnie pierwszym autorem i dwunastokrotnie autorem korespondencyjnym.

Wypromowałem 6 magistrantów. W przewodzie doktorskim jestem opiekunem naukowym oraz pięciokrotnie pełniłam funkcje opiekuna naukowego prac magisterskich

Podsumowanie danych bibliograficznych przedstawia Tabela 2.

	Przed doktoratem			Po doktoracie			ŁĄCZNIE		
	Liczba	IF	MNiSW	liczba	IF	MNiSW	liczba	IF	MNiSW
Oryginalne	5	2.013	-	33	47,961	447	39	49,974	447
Przeglądowe	-	-	-	8	17,306	220	7	16,616	220
Rozdziały w monografii	-	-	-	4	-	-	4	-	-
Łącznie	5	2.013	-	45	65,267	667	50	67,27	667
Indeks Hirscha									13
Liczba cytowań						całkowita		568	
						Bez autocytowań		530	

