

Program IV ŚSN 24-25.03.2017

VI Śląskie Spotkania Naukowe

Podlesice, 10-11 Maja 2019 r.



**Politechnika
Śląska**



**CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARIII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ODDZIAŁ W GLIWICACH**

**Hotel Ostaniec ul. Podlesice 82, 42-425 Kroczyce,
Polska Recepcja+48 34 315 50 01+48 604 196 148
repcja@ostaniec.com.pl**

opracowanie: Magdalena Skonieczna

Piątek, 10.05.2019

12:30-13:30 Rejestracja

13:30-14:30 Obiad

**Rzeszowska
Joanna**Politechnika
Śląska**Otwarcie Konferencji**

:

SESJA 1 – Procesy komórkowe**14:30-17:30** czas
(min)

Adam Konka	Kardio-Med Silesia	Kardio-Med Silesia - badania i nauka	14:30-14:45	15
Agnieszka Gdowicz-Kłosok	Instytut Onkologii	Analiza wariantów genów związanych z angiogenezą jako czynników modulujących proces progresji i rokowanie w raku regionu głowy i szyi	14:45-15:00	15
Magdalena Olbryt	Instytut Onkologii	Wykorzystanie techniki sekwencjonowania nowej generacji w poszukiwaniu genów oporności na terapię celowaną w czerniaku skóry – wyniki i doświadczenia własne	15:00-15:15	15
Wojciech Pięgowski	Instytut Onkologii	Sekwencjonowanie genów BRCA1/2 w raku piersi i raku jajnika z użyciem systemu Ion Torrent - wnioski po 2 latach działania pracowni NGS	15:15-15:30	15
Małgorzata Adamiec	Politechnika Śląska	Ferroptoza - śmierć komórkowa w liniach prawidłowych i nowotworowych	15:30-15:45	15
Patrycja Niesłoń	Politechnika Śląska	Badanie procesów adhezji i migracji komórek Me45 pod wpływem promieniowania UV i IR	15:45-16:00	15
Daniel Fochtman	Politechnika Śląska	Migracja komórek nowotworowych i prawidłowych w warunkach stresu oksydacyjnego	16:00-16:15	15
Patryk Bil	Politechnika Śląska	Syntaza tlenu azotu - istotny element mechanizmu ograniczającego stres oksydacyjny w komórkach	16:15-16:30	15
Rafał Bułdak	Śląski Uniwersytet Medyczny	Immunolokalizacja visfatyny/Nampt w tkance guza oraz jej ilościowa ocena w osoczu pacjentów z nowotworami jelita grubego	16:30-16:45	15
Izabella Ślęzak- Prochazka	Politechnika Śląska	Analiza biogenezy miRNA w chłoniakach B-komórkowych	16:45-17:00	15
Piotr Widłak	Instytut Onkologii	Profil miRNA - jak interpretować wyniki?	17:00-17:15	15
Wojciech Bieniek	Perlan Technologies	Badania transkryptomiczne i genomyczne z rozdzielczością pojedynczej komórki – analiza heterogenności nowotworu z wykorzystaniem platformy Chromium	17:15-17:30	15

Śląska Nauka w dobie reformy – Dyskusja 17:30-18:30**Kolacja – jurajskie pieczonki i grill****19:00 -**

Sobota, 11.05.2019

Śniadanie

7:00-9:00

SESJA 2 – Komórkowa odpowiedź na stres

9:00 -12:00

Vira Chumak	Instytut Onkologii	Czy HSPA2 jest powiązane z regulacją gospodarki wapniowej w keratynocytach	9:00-9:15	15
Patryk Janus	Instytut Onkologii	HSF1 pozytywnie wpływa na zdolność komórek MCF7 do migracji pod wpływem 17beta-estradiolu	9:15-9:30	15
Damian Matyśniak	Instytut Onkologii	Rola białek opiekuńczych z rodziny HSPA (HSP70) w etiopatogenezie łuszczycy	9:30-9:45	15
Damian Sojka	Instytut Onkologii	Udział czynnika transkrypcyjnego Sp1 w regulacji ekspresji genów z rodziny HSPA (HSP70)	9:45-10:00	15
Agnieszka Gogler-Pigłowska	Instytut Onkologii	W poszukiwaniu optimum; czy system hodowli komórek glejaka wielopostaciowego ma znaczenie w ujawnianiu się zmian fenotypu zależnego od białka opiekuńczego HSPA2?	10:00-10:15	15
Katarzyna Mrowiec	Instytut Onkologii	Detekcja białek oddziałujących z mysim białkiem LOC66598	10:15-10:30	15
Wiesława Widłak	Instytut Onkologii	Zwiększona ekspresja PHLDA1 nie indukuje apoptozy zależnej od kaspazy-3 lecz prowadzi do utraty kontaktu komórek z podłożem	10:30-10:45	15
Aleksandra Poterała-Hejmo	Politechnika Śląska	Białko P53 jako regulator warunków oksydoredukcyjnych w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego	10:45-11:00	15
Miriam Dawidowicz	Śląski Uniwersytet Medyczny	The impact of CMKLR1 on angiogenesis	11:00-11:15	15
Joanna Jazowiecka-Rakus	Instytut Onkologii	Wirus myksomatozy w terapii czerniaka	11:15-11:30	15
Marcelina Jureczko	Politechnika Śląska	Ocena potencjału sorpcyjnego cytostatyków wybranych grzybów nadrzewnych	11:30-11:45	15

Dyskusja i przerwa kawowa

11:45-12:00

SESJA 3 – Diagnostyka i terapie eksperymentalne**12:15-15:30**

Andrzej Bąk	Uniwersytet Śląski	Novel Benzene-based Carbamates for AChE/BChE Inhibition: Synthesis and Ligand/Structure-oriented SAR study	12:15-12:30	15
Robert Gawecki	Uniwersytet Śląski	Nowe chelatory żelaza z grupy tiosemikarbazonu w terapii fotodynamicznej	12:30-12:45	15
Violetta Kozik	Uniwersytet Śląski	Wybrane aspekty terapii fotodynamicznej	12:45-13:00	15
Michał Kuczak	Uniwersytet Śląski	Mechanizm działania pochodnych styrylochinazoliny w indukcji stresu oksydacyjnego.	13:00-13:15	15
Katarzyna Malarz	Uniwersytet Śląski	Wielocelowe inhibitory kinaz tyrozynowych w terapii antynowotworowej	13:15-13:30	15
Daria Gendosz	Uniwersytet Śląski Medyczny	Wpływ minocykliny na następstwa krwotoku podpajeczynówkowego u szczurów	13:30-13:45	15
Dorota Kula	Instytut Onkologii	Związek wariantów c.444+1G>A i c.1100delC genu CHEK2 z rakiem brodawkowatym tarczycy – badania własne i meta-analiza	13:45-14:00	15
Katarzyna Lisowska	Instytut Onkologii	Molecular background of lung cancer cells resistance against novel FGFR inhibitor: aCGH and RNA-seq analysis	14:00-14:15	15
Agnieszka Mazurek	Instytut Onkologii	Analiza porównawcza raka gardła środkowego i raka odbytu – podobieństwa i różnice	14:15-14:30	15
Mateusz Smolarz	Instytut Onkologii	Wykrywanie i charakteryzowanie egzosomów w oparciu o cytometrię przepływową	14:30-14:45	15
Anna Glodek	Politechnika Śląska	Metody identyfikacji obwiedni izotopowych w danych z obrazowania molekularnego MALDI-ToF"	14:45-15:00	15
Aleksander Sochanik	Instytut Onkologii	Nośniki polimerowe i komórkowe w skojarzonej terapii nowotworów	15:00-15:15	15

Dyskusja - zakończenie konferencji**15:15-15.30****Obiad 15.30**

SESJA 1 – PROCESY KOMÓRKOWE

KARDIO-MED SILESIA - BADANIA I NAUKA

Adam Konka

Śląski Park Technologii Medycznych, Kardio-Med Silesia, Zabrze

ANALIZA WARIANTÓW GENÓW ZWIĄZANYCH Z ANGIOGENEZĄ, JAKO CZYNNIKÓW MODULUJĄCYCH PROCES PROGRESJI I ROKOWANIE W RAKU REGIONU GŁOWY I SZYI

Agnieszka Gdowicz-Kłosok¹, Małgorzata Krześniak¹, Tomasz Rutkowski², Barbara Łasut-Szyska¹, Iwona Domińczyk¹, Iwona Matuszczyk¹, Krzysztof Składowski², Dorota Butkiewicz¹

¹ Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, ² I Klinika Radioterapii i Onkologii Klinicznej, Centrum Onkologii- Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest niezbędnym etapem we wzroście i progresji guzów litych. Unaczynienie i stopień niedotlenienia guza mają również podstawowe znaczenie dla skuteczności radio- (RT) i chemioterapii (CT), metod standardowo wykorzystywanych w leczeniu m.in. raka regionu głowy i szyi (HNC). Pomimo ciągłego postępu w diagnostyce i terapii, wyniki leczenia w HNC są niezadowolające, a uznane czynniki kliniczne nie pozwalają na ustalenie indywidualnego rokowania. Dlatego celem naszego projektu jest zbadanie, czy dziedziczne czynniki genetyczne, takie jak polimorfizm typu SNP, mają wpływ na przebieg choroby i skuteczność leczenia chorych na HNC. W tym celu przeanalizowaliśmy związek 22 funkcjonalnych SNP w genach kodujących kluczowe białka zaangażowane w proces angiogenezy z ryzykiem wznowy, rozsiewu i z przeżyciem całkowitym w dużej grupie chorych na płaskonabłonkowego, HNC w zaawansowaniu T1-4N0-3M0, poddanych samodzielnej RT lub w skojarzeniu z CT.

Analiza wieloczynnikowa pojedynczych SNP wykazała statystycznie istotny wpływ 11 z nich na ryzyko wznowy, rozsiewu, nawrotu i/lub zgonu w badanej grupie. Poza cechami klinicznymi, takimi jak stopień zaawansowania czy obecność wznowy, cztery SNP, tj. *VEGFR2* rs2071559, *MMP2* rs243865, *TIMP3* rs9619311 i *VEGF* rs2010963, stanowiły niezależne czynniki prognostyczne. Model kumulatywny wykazał, że ryzyko wznowy lokoregionalnej jest 7-krotnie wyższe w przypadku współistnienia trzech niezależnych czynników rokowniczych, takich jak genotyp *VEGFR2* CC, allel *MMP2* T oraz wysokie zaawansowanie kliniczne (HR 7,06, p=0,00002). Jednoczesne występowanie genotypu *TIMP3* CC i wznowy podnosiło 3-krotnie ryzyko rozsiewu do narządów odległych (HR 3,05, p=0,00004). Trzykrotnie wzrastało także ryzyko nawrotu choroby u nosicieli allelu *MMP2* T z wysokim stopniem zaawansowania i spożywających alkohol (HR 2,91, p=0,000001). Genotyp *VEGF* CC, palenie tytoniu, wysoki stopień zaawansowania i wystąpienie wznowy wpływały istotnie na skrócenie czasu przeżycia (HR 6.55, 95% CI 4.56-9.42).

Uzyskane wyniki sugerują, że czynniki genetyczne, takie jak niektóre SNP w obszarach regulatorowych genów związanych z angiogenezą, mogą umożliwić w przyszłości identyfikację podgrup chorych o wyjątkowo wysokim ryzyku niepowodzenia terapii, co może doprowadzić do modyfikacji procedur leczniczych w wybranych przypadkach, a obecnie stać się wskazówką do szczegółowego monitoringu. Powyższe obserwacje wymagają walidacji w licznych, niezależnych grupach chorych.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, grant nr 2016/23/B/NZ5/03470.

WYKORZYSTANIE TECHNIKI SEKWENCJONOWANIA NOWEJ GENERACJI W POSZUKIWANIU GENÓW OPORNOŚCI NA TERAPIĘ CELOWANĄ W CZERNIAKU SKÓRY – WYNIKI I DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Magdalena Olbryt¹, Wojciech Pięglowski^{2,3}, Marcin Rajczykowski⁴, Aleksandra Pfeifer⁵, Anna Fiszler-Kierzkowska²

¹Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów; ²Laboratorium Diagnostyki Molekularnej ³Zakład Patologii Nowotworów; ⁴II Klinika Radioterapii i Chemioterapii; ⁵Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej

Technika sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing; inaczej głębokiego sekwencjonowania) jest jedną z wysokoprzepustowych metod wykorzystywanych między innymi do analizy genomu i transkryptomu komórek różnego typu. W onkologii jest coraz powszechniej stosowana w diagnostyce oraz badaniach naukowych. Wysoka czułość oraz przepustowość pozwala w krótkim czasie zidentyfikować wiele zmian genetycznych w wielu próbkach, dlatego technika ta jest chętnie wykorzystywana w poszukiwaniu nowych, rzadszych wariantów genetycznych o potencjalnym znaczeniu klinicznym.

Takie też zastosowanie ma NGS w naszym projekcie, którego celem jest identyfikacja genetycznej sygnatury oporności pierwotnej na terapię celowaną w zaawansowanym czerniaku skóry.

W projekcie wykorzystano platformę do głębokiego sekwencjonowania firmy Ion Torrent oraz program Ion Reporter 5, 6 do wstępnej analizy danych. W dalszych analizach korzystano z programu Alamut Visual, Varsome, OncoCNV i innych. Analiza dotyczyła sekwencji kodujących lub wybranych miejsc „hotspot” panelu 23 genów i została wykonana w 46 próbkach DNA pochodzących z czerniaka skóry oraz 2 próbek DNA kontrolnego (linia komórkowa oraz obwodowa krew osoby zdrowej).

Spośród 46 analizowanych próbek, 39 (82, 6%) spełniało założone kryteria techniczne i zostało wziętych do dalszej analizy. We wszystkich próbkach zidentyfikowano od 2 do 7 zmian genetycznych innych niż mutacja onkogenu BRAF, natomiast ponad połowa posiadała warianty genetyczne o potencjalnym znaczeniu klinicznym w 16 spośród 23 genów panelu. Najwięcej zmian było zlokalizowanych w genach: *PTEN*, *CDKN2A*, *MITF* i *CDK4*. Niewykluczone, że niektóre z wykrytych wariantów są powodem oporności pierwotnej na terapię celowaną u wybranych pacjentów. Wyniki są nadal analizowane.

Podczas realizacji projektu, oprócz wyników, zyskaliśmy również cenne doświadczenie w wykorzystaniu techniki NGS w badaniach naukowych, którym również chcielibyśmy się z Państwem podzielić.

Projekt jest finansowany ze środków NCN: grant nr 2018/02/X/NZ7/00606.

**SEKWENCJONOWANIE GENÓW BRCA1/2 W RAKU PIERSI I RAKU
JAJNIKA Z UŻYCIEM SYSTEMU ION TORRENT - WNIOSKI PO
2 LATACH DZIAŁANIA PRACOWNI NGS**

Wojciech Pięłowski

Laboratorium Diagnostyki Molekularnej, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii
Molekularnej Nowotworów.

FERROPTOZA - ŚMIERĆ KOMÓRKOWA W LINIACH PRAWIDŁOWYCH I NOWOTWOROWYCH

Małgorzata Adamiec^{1,2}, Dorota Hudy^{1,2}, Daria Gendosz de Carriello^{3,4}, Magdalena Skonieczna^{1,2}

¹ Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice; ² Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice; ³ Zakład Fizjologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; ⁴ Katedra i Zakład Histologii i Patologii Komórki w Zabrze

Komórki, zarówno nowotworowe jak i prawidłowe, ulegać mogą różnym rodzajom regulowanych śmierci (ang. Regulated Cell Death, RCD). RCD odgrywa znaczącą rolę w homeostazie organizmu, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Niewystarczająca lub nadmierna RCD może powodować choroby, np. neurodegeneracyjne, czy nowotworowe. Śmierć ta może przybrać różne formy, m.in. apoptozy, nekrozy czy ferroptozy.

Cel: Różne linie komórkowe badano *in vitro* pod kątem wywołania w nich śmierci związanej z żelazem – ferroptozy, na skutek promieniowania jonizującego i UV lub podania induktorów i inhibitorów ferroptozy. Z literatury wiadomo, że niektóre linie komórkowe są bardziej lub mniej wrażliwe na indukcję tego rodzaju śmierci, co z kolei w połączeniu z zastosowanymi czynnikami fizyko-chemicznymi czyni je mniej lub bardziej podatnymi na stosowane terapie.

Materialy i metody: Badania prowadzone były na liniach komórkowych HCT116, Me45, K562, HL60 oraz HaCaT. Komórki poddawane były promieniowaniu UVA w dawce 10 KJ/m². Badano w jakim stopniu dodanie induktorów (RSL3 lub erastyny) i inhibitora (ferrostatyny-1) ma wpływ na uruchomienie lub zahamowanie ścieżki ferroptozy.

Wyniki: Z literatury wiadomo, że HL60 (ostra białaczka) jest linią komórkową wrażliwą na indukcję ferroptozy, co potwierdziły wykonane badania MTT po dodaniu do komórek erastyny. Z kolei komórki K562 (przewlekła białaczka) okazały się być odporne na ten rodzaj śmierci. Podobnie linie komórkowe Me45 (czerniak) i HCT116 (nowotwór jelita grubego) wykazały także odporność na indukcję ferroptozy. Dopiero w połączeniu z promieniowaniem UV uruchomiona została w tych liniach ferroptoz. Promieniowanie UV, we wszystkich liniach (poza HaCaT), wpłynęło na zmniejszenie przeżywalności komórek, zatem jedynie keratynocyty nie były podatne na indukcję ferroptozy, zarówno po dodaniu erastyny, jak i po zastosowaniu promieniowania.

Prace wykonano w ramach grantów nr 02/010/BK_18/0102 (Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna) z Politechniki Śląskiej i UMO-2015/19/B/ST7/02984 (Dorota Hudy) z Narodowego Centrum Nauki.

BADANIE PROCESÓW ADHEZJI I MIGRACJI KOMÓREK ME45 POD WPLYWEM PROMIENIOWANIA UV I IR

Patrycja Niesłoń¹, Małgorzata Adamiec², Daniel Fochtman¹, Patryk Bil², Magdalena Skonieczna^{2,3}

¹ Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice; ² Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice; ³ Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice

Komórki nowotworowe posiadają trudne do opanowania cechy tj. oddziałują na macierz zewnątrzkomórkową, tworzą przerzuty, prezentując fenotyp inwazyjny nowotworu. Radiowrażliwość określa się na podstawie analizy markerów procesów przerzutowania oraz ich ekspresji w różnych warunkach stresu. W raku jelita grubego najczęściej obserwuje się przerzuty do wątroby i węzłów chłonnych zlokalizowanych w jamie brzusznej. Tylko wybrane komórki posiadają zdolność do migracji, a dzięki obecności powierzchniowych enzymów proteolitycznych mają duży stopień inwazyjności.

Obecnie problem nowotworów i przerzutowania jest problemem cywilizacyjnym. Identyfikacja markerów predykcyjnych inwazyjności i migracji w komórkach Me45 jest jednym z głównych celów tego projektu. Błona podstawna ogranicza ruchliwość zdrowych komórek zakotwicząc je poprzez receptory różnych białek. Komórki nowotworowe rozkładają składniki ECM błony, co wyznacza potencjał przerzutowania. Embriogeneza, angiogeneza, krzepnięcie i hemostaza czy gojenie ran, oparte są na procesach adhezji i migracji komórek, co jest związane z oddziaływaniem integryn powierzchniowych z białkami macierzy pozakomórkowej. Integryny poza tym biorą udział w adhezji komórek do podłoża, są również przekaźnikami sygnałów do wnętrza. Kadheryny odpowiedzialne są za prawidłowy kontakt i adhezję komrek epitelialnych. Wiele MT-MMP znajduje się na powierzchni bardzo ruchliwych komórek nowotworowych. W wyniku aktywacji receptorów związanych z białkiem G (GPCR) uruchamiają się szlaki związane z wewnątrzkomórkowymi przekaźnikami sygnałowymi. Nadmierna produkcja metaloproteinaz mogłaby prowadzić np. do powstania nowotworu. Aktywne metaloproteinazy macierzowe mogą być inaktywowane przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMP.

IR jest niebezpieczne dla tkanek szybko proliferujących (komórki nowotworowe też mogą wykazywać radiowrażliwość), może zaburzać cykl komórkowego i prowadzić do apoptozy. Spórbujemy wykazać związek pomiędzy radioopornością a wzmocnieniem/osłabieniem adhezji komórek i inwazyjnością w napromienianych komórkach. Oznaczyliśmy zdolności proliferacyjne komórek (Cell Index, CI), co pomogło określić toksyczny wpływ IR na komórki prawidłowe NHDF i nowotworowe Me45. Analizy wykonano na podstawie wyników z przyżyciowego systemu pomiaru impedancji, gdzie opór przepływu prądu przez komórki wyznacza ich kondycję, ilość i adhezję.

Prace wykonano w ramach grantów nr 02/010/BK_18/0102 (Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna) z Politechniki Śląskiej i UMO-2015/19/B/ST7/02984 (Patryk Bil) z Narodowego Centrum Nauki.

MIGRACJA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH I PRAWIDŁOWYCH W WARUNKACH STRESU OKSYDACYJNEGO

Daniel Fochtman¹, Małgorzata Adamiec², Patrycja Niesłoń¹, Dorota Hudy², Patryk Bil², Magdalena Skonieczna^{2,3}

¹Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice; ²Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice; ³Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice

Promieniowanie jonizujące to czynnik fizyczny wykorzystywany w radioterapii przy leczeniu, lub coraz częściej, w uzupełnianiu leczenia nowotworów (terapię skojarzone). Istotną częścią w opracowaniu takiej terapii dla danego pacjenta jest określenie dawki, jaka powinna zostać użyta w skutecznym leczeniu tak, aby nie uszkadzać zdrowych tkanek sąsiadujących z nowotworem.

Celem pracy było określenie dawek promieniowania jonizującego (IR), które oddziałują stymulująco oraz wyciszająco na ruchliwość komórek normalnych (NHDF - fibroblasty) i nowotworowych skóry (Me45 - czerniak). W tym celu wykonano długoterminowy i przyżyciowy test zdrapaniowy (Wound Healing Assay) dla komórek, które wystawione były na promieniowanie jonizujące w dawkach 0,2-12 Gy. Wound Healing Assay to prosta, tania i bardzo bezpośrednia metoda badania ruchliwości komórek *in vitro*, co pozwala na oszacowanie zdolności danej linii nowotworowej do wzmożonej inwazyjności i ewentualnie tworzenia przerzutów. Im większa ruchliwość, tym większa szansa, iż dane komórki przedostaną się poza obszar, w którym znajdowały się pierwotnie i utworzą przerzuty w innych tkankach czy organach.

Wyniki, które uzyskano wskazują na fakt, iż działanie promieniowaniem na komórki powoduje zmianę ich ruchliwości. Dawki działające stymulująco i wyciszająco nie pokrywały się jednak pomiędzy dwoma typami komórek. O ile NHDF osiągnęły ogólną wyższą konfluencję w porównaniu do Me45 w trakcie trwania eksperymentu, to były bardziej wrażliwe na działanie promieniowania w stosunku do swojej kontroli (wyciszenie dla NHDF ~8Gy; dla Me45 ~12Gy). Zebrane zdjęcia mikroskopowe pozwoliły na znalezienie różnic tkankowych dla danych linii komórkowych: o ile NHDF wykazywały się większą ruchliwością przy niższej proliferacji, to Me45 – zmniejszoną ruchliwością przy wyższej proliferacji.

W połączeniu z innymi metodami (np. badaniem proliferacji w trakcie trwania testu), Wound Healing Assay może mieć szczególne znaczenie w wielu dziedzinach m.in. w medycynie do określania skutecznych dawek promieniowania w leczeniu nowotworów; jako technika wymagająca jedynie podstawowego sprzętu laboratoryjnego może zostać w łatwy sposób zautomatyzowana, a w połączeniu z narzędziami stosowanymi w informatyce – może umożliwić przewidywanie zachowania komórek traktowanych różnymi czynnikami (chemicznymi, fizycznymi, czy mechanicznymi); w biochemii leków i biologii molekularnej

może pozwalać na określanie toksyczności różnych związków chemicznych, itp. Z kolei zastosowanie obserwacji przyżyciowych pozwala na śledzenie pojedynczych komórek i zmian behawioralnych w całych populacjach.

Prace wykonano w ramach grantów nr 02/010/BK_18/0102 (Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna) z Politechniki Śląskiej i UMO-2015/19/B/ST7/02984 (Dorota Hudy, Patryk Bil) z Narodowego Centrum Nauki.

SYNTAZA TLENKU AZOTU - ISTOTNY ELEMENT MECHANIZMU OGRANICZAJĄCEGO STRES OKSYDACYJNY W KOMÓRKACH

Patryk Bil^{1,2}, Sylwia Ciesielska^{1,2}, Joanna Rzeszowska-Wolny^{1,2}

¹ Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice; ² Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice;

Syntazy tlenu azotu pełnią ważną rolę w ograniczaniu stresu oksydacyjnego w ludzkich komórkach. Tetrahydrobiopteryna (BH4) jest kofaktorem wszystkich trzech izoform NOS występujących u ludzi (nNOS, iNOS i eNOS), wiązanie się jej z NOS warunkuje produkcję tlenu azotu. Tetrahydrobiopteryna konkuruje o miejsce wiązania ze swoją utlenioną formą dihydrobiopteryną (BH2), która po związaniu z syntazą tlenu azotu, prowadzi do przełączenia się NOS na produkcję anionorodnika ponadtlenkowego. Kiedy dochodzi w komórkach do wystąpienia stresu oksydacyjnego, przekłada się to na przyrost ilości dihydrobiopteryny względem całkowitej puli komórkowej biopteryny. Zwiększona biodostępność anionorodnika ponadtlenkowego dla dysmutaz anionorodnika ponadtlenkowego (SOD), przekłada się na zwiększoną produkcję nadtlenu wodoru, który z kolei indukuje cyklohydrolazę GTP, przekształcającą GTP w BH4. Wzrastająca ilość BH4 względem BH2 ogranicza działanie stresu oksydacyjnego i ułatwia odzyskanie równowagi oksydoredukcyjnej w komórce.

Prowadzone badania mają na celu znalezienie wszystkich istotnych elementów tego procesu metodami eksperymentalnymi i opierając się na danych literaturowych, a także stworzenie modelu procesów zachodzących w obrębie pojedynczej komórki, uwzględniającego cykl komórkowy. Identyfikacja kluczowych elementów mechanizmu związanego z syntazami tlenu azotu w odpowiedzi na stres oksydacyjny, powinna pozwolić na podstawie pomiaru poziomu tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego dokonać predykcji modelem, czy komórka ma szansę odzyskać równowagę oksydoredukcyjną, czy też stres oksydacyjny doprowadzi do jej śmierci.

Prace wykonano w ramach grantu nr 02/010/BK_18/0102 (Patryk Bil) z Politechniki Śląskiej.

**IMMUNOLOKALIZACJA VISFATYNY/NAMPT W TKANCE GUZA
ORAZ JEJ ILOŚCIOWA OCENA W OSOCZU PACJENTÓW
Z NOWOTWORAMI JELITA GRUBEGO**

Rafał Bułdak

Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w
Zabrzu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ANALIZA BIOGENEZY MIRNA W CHŁONIAKACH B-KOMÓRKOWYCH

Izabella Ślęzak-Prochazka

Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice;

MikroRNA to małe (~22nt) jednoniciowe niekodujące RNA, które hamują ekspresję genów poprzez represję translacji i/lub destabilizację transkryptów docelowych. MiRNA mogą być zlokalizowane w intronach lub eksonach genów kodujących i niekodujących białka, jak również w regionach międzygenowych. Kanoniczna biogeneza miRNA składa się z dwóch etapów. Transkrypcja genów kodujących miRNA skutkuje powstaniem długich pierwotnych transkryptów (pri-miRNA) ulegających obróbce przez kompleks Drosha-DGCR8 do prekursorowego miRNA (pre-miRNA), które są eksportowane do cytoplazmy i ulegają dalszej obróbce przez endonukleazę Dicer do dojrzałych miRNA. Biogeneza miRNA podlega ścisłej kontroli, co powoduje, że profil ekspresji miRNA jest specyficzny dla tkanek i komórek na różnym stadium rozwoju.

Celem badań była analiza biogenezy miRNA poprzez porównanie poziomów pri-miRNA do dojrzałego miRNA. W badaniach określiliśmy poziom pri-miRNA i miRNA w prawidłowych limfocytach B oraz 3 liniach komórkowych chłoniaka Burkitta (CA46, Ramos i ST486) oraz 3 liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina (L1236, L428 i SupHD1). Poziom miRNA został zbadany przy pomocy macierzy miRNA. By określić poziom pri-miRNA, zaprojektowano macierz ekspresji genów, która zawierała 3421 sondy dla 662 pri-miRNA, dla których posiadaliśmy dane dotyczące poziomu dojrzałego miRNA w badanych próbkach. Sondy dla pri-miRNA pokrywały region „wsuwki do włosów” i region bezpośrednio sąsiadujący. Dla każdej struktury „wsuwki do włosów” zostało zaprojektowanych maksymalnie 6 sond.

Spośród 662 badanych pri-miRNA, 334 było ekspresjonowanych przynajmniej w 1 próbce (przynajmniej 2 z 6 sond), ale tylko dla 190 wykryto mierzalny poziom dojrzałego miRNA w przynajmniej jednej próbce. Pozostałe 144 pri-miRNA nie było ekspresjonowanych na poziomie miRNA. Co ważne, poziom tych 144 pri-miRNA nie różnił się znacząco od poziomu pri-miRNA, dla których wykryto dojrzałe miRNA. Zatem brak mierzalnej ekspresji miRNA nie wynika z niskiego poziomu pri-miRNA w komórkach, lecz wskazuje na możliwy brak dojrzewania tych pri-miRNA w badanych komórkach. Dodatkowo, pokazaliśmy, iż wśród pri-miRNA niepodlegających obróbce 68 (43%) jest wspólnych dla wszystkich badanych komórek, a kolejne 40 (25%) jest wspólnych dla 6 linii chłoniaków Burkitta i Hodgkina, ale nie dla limfocytów B. Te wyniki sugerują, iż część pierwotnych transkryptów jest ekspresjonowana, ale nie podlega obróbce to dojrzałych miRNA w limfocytach B czy chłoniakach B-komórkowych.

Następnie wyciszyliśmy kluczowe dla biogenezy białko DGCR8 w komórkach L1236 za pomocą shRNA, co spowodowało 2,4-krotny spadek jego ekspresji w porównaniu do komórek transdukowanych wektorem kontrolnym. Wyciszenie DGCR8 doprowadziło do przynajmniej 2-krotnego wzrostu poziomu pri-miRNA jedynie dla 177 sond dla 63 pri-miRNA. Natomiast poziom ogromnej większości pri-miRNA nie zmienił się. Najsilniejszy, 10 do 90-krotny, wzrost intensywności sygnału wykazały 34 sondy należące do 6 miRNA z klastra miR-17~92a. Zatem, wyciszenie DGCR8 powoduje akumulację tylko części pri-miRNA, które są bardziej wrażliwe na zmiany poziomu DGCR8.

Badania realizowane w ramach grantu nr 2015/19/D/NZ1/03443 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

PROFIL miRNA - JAK INTERPRETOWAĆ WYNIKI?

Piotr Widlak

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże AK 15, Gliwice

Mamy informację o poziomie miRNA zmierzonych w doświadczeniu biologicznym. Co dalej? Jak zdecydować o progu szumu? Jak zdecydować o progu obserwowanej zmiany? Jak bioinformatycznie powiązać zaobserwowane zmiany w poziomie miRNA z funkcjami biologicznymi?

Prezentacja odpowiada na te i inne pytania na podstawie doświadczenia badającego profil miRNA w egzosomach uwalnianych przez napromienione komórki.

BADANIA TRANSKRYPTOMICZNE I GENOMICZNE Z ROZDZIELCZOŚCIĄ POJEDYNCZEJ KOMÓRKI – ANALIZA HETEROGENNOŚCI NOWOTWORU Z WYKORZYSTANIEM PLATFORMY CHROMIUM

Wojciech Bieniek

Perlan Technologies Polska Sp. z o.o.

Złożone struktury biologiczne, takie jak guzy nowotworowe, składają się z populacji komórek cechujących się różnymi profilami ekspresji genów, czy różnym poziomem ploidalności. Standardowe techniki analiz transkryptomocnych i genomicznych oparte na materiale genetycznym pochodzącym z różnych typów komórek dają wyniki stanowiące uśrednioną informację, która nie oddaje rzeczywistej złożoności procesów biologicznych zachodzących w badanych strukturach.

System Chromium firmy 10x Genomics służy do analizy ekspresji genów, zmian liczby kopii, czy dostępności chromatyny z rozdzielczością pojedynczej komórki w tysiącach komórek, co otwiera możliwości szybkiej i wiarygodnej analizy heterogenności nowotworu.

SESJA 2 – KOMÓRKOWA ODPOWIEDŹ NA STRES

CZY HSPA2 JEST POWIĄZANE Z REGULACJĄ GOSPODARKI WAPNIOWEJ W KERATYNOCYTACH?

Vira Chumak, Damian Matyśniak, Agnieszka Gogler-Piğłowska, Zdzisław Krawczyk, Krystyna Klyszcz, Dorota Ścieglińska

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Centrum Badan Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów

HSPA2 (Heat Shock Protein A2) należy do białek opiekuńczych z rodziny HSPA (HSP70). Funkcje tego białka zostały najszerzej poznane w kontekście spermatogenezy u gryzoni i człowieka, natomiast rola HSPA2 w innych tkankach jest zbadana słabo. Ścieglińska i wsp. wykazali obecność HSPA2 w orzęsionym nabłonku dróg oddechowych, wielowarstwowym nabłonku przełyku i skóry człowieka. Ciekawym jest to, że HSPA2 znajdują się głównie w komórkach warstwy podstawnej tych nabłonek, które jak wiadomo, jedyne zachowują zdolność do proliferacji. Wcześniejsze nasze badania pokazały, że HSPA2 może uczestniczyć w regulacji podejmowania przez keratynocyty warstwy postawnej naskórka decyzji o rozpoczęciu terminalnego różnicowania.

Jednym z czynników regulujących różnicowanie keratynocytów są jony wapnia. Ponieważ w naskórku występuje gradient jonów wapnia, który wzrasta w kierunku warstw coraz bardziej zróżnicowanych keratynocytów, celem tego badania było pokazanie, czy poziom HSPA2 w keratynocytach jest uzależniony od stężenia jonów wapnia w środowisku komórek. Ludzkie spontanicznie immortalizowane keratynocyty linii *HaCaT* były hodowane w warunkach niskiego (> 0,06 mM) i wysokiego (1,8 mM) stężenia jonów wapnia. Wykazano, że nagła zmiana stężenia zewnątrzkomórkowego wapnia, zarówno z niskiego na wysokie, jak też odwrotnie dochodzi do wzrostu ilości białka HSPA2 w komórkach. Dla potwierdzenia hipotezy, że HSPA2 może mieć związek z gospodarką wapniową w keratynocytach, przeprowadziliśmy porównawczą analizę sygnalizacji wapniowej. W tym celu wykorzystaliśmy immortalizowane ludzkie keratynocyty linii *KerCT* z normalnym poziomem HSPA2 oraz ze stabilnie zahamowaną ekspresją genu *HSPA2* na drodze mechanizmu RNAi. Stosując komercyjną sondę FURA-2AM wykazaliśmy, że keratynocyty z obniżoną ilością HSPA2 cechuje niższy wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia niż komórki kontrolne.

Uzyskane wyniki sugerują, że białko HSPA2 może być jednym z elementów łańcucha przekazywania sygnału wapniowego w keratynocytach. Ponieważ wapń jest ważnym czynnikiem regulującym różnicowanie keratynocytów i utrzymującym homeostazę naskórka, zbadanie roli HSPA2 w kontekście sygnalizacji wapniowej poszerzy rozumienie procesów fizjologicznych i patofizjologicznych zachodzących w skórze.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o numerze 2017/25/B/NZ4/01550 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, Polska.

HSF1 POZYTYWNIIE WPLYWA NA ZDOLNOŚĆ KOMÓREK MCF7 DO MIGRACJI POD WPLYWEM 17BETA-ESTRADIOLU

Patryk Janus¹, Agnieszka Toma-Jonik¹, Tomasz Stokowy², Wiesława Widlak¹, Natalia Vydra¹

¹ Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże AK 15, Gliwice;

² Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen, Norway

Czynnik transkrypcyjny HSF1 jest znany, jako główny regulator ekspresji genów *HSP* (ang. heat shock protein) w odpowiedzi na działanie podwyższonej temperatury. Poza aktywacją ekspresji genów *HSP*, HSF1 może wpływać na ekspresję innych genów oraz poprzez oddziaływania z innymi białkami uczestniczyć w różnych procesach komórkowych, np. remodelowaniu chromatyny, poliadenylacji, transporcie mRNA do cytoplazmy. Nie do końca poznane mechanizmy zależne od HSF1 mogą mieć również wpływ na powstanie fenotypu nowotworowego, wzrost i przeżywalność komórek nowotworowych.

Celem naszych badań jest poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do aktywacji HSF1 w komórkach nowotworowych piersi i jej biologicznego znaczenia. Wykazaliśmy, że HSF1 jest aktywowany (fosforylacja w pozycji Ser326) przez estrogen (17-estradiol, E2) za pośrednictwem ER (ang. estrogen receptor), ale nie ER lub GPER1. Traktowanie estrogenem ER-pozytywnych komórek MCF7 zwiększa ich tempo proliferacji oraz migracji w komorze Boydena. Obniżenie ekspresji HSF1 za pomocą swoistych shRNA lub systemu edycji genomu CRISPR/Cas9 nie wpływało na tempo proliferacji pod wpływem E2, ale hamowało migrację w komorze Boydena. W poszukiwaniu zmian ekspresji genów indukowanych przez E2 wykonaliśmy RNA-Seq w komórkach z obniżoną ekspresją HSF1. Wśród procesów biologicznych, na które wpływa estrogen, najbardziej zależne od HSF1 są procesy związane z adhezją komórek i angiogenezą. Uzyskane wyniki wskazują na udział aktywowanego przez E2 HSF1 w nabywaniu fenotypu ułatwiającego tworzenie przerzutów nowotworowych.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantów 2014/13/B/NZ7/02341, 2015/17/B/NZ3/03760.

ROLA BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH Z RODZINY HSPA (HSP70) W ETIOPATOGENEZIE ŁUSZCZYCY

Damian Matyśniak¹, Vira Chumak¹, Agnieszka Gogler-Pigłowska¹, Damian Sojka¹, Marek Michalski², Urszula Bojko¹, Dorota Ściegłińska¹

¹Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Gliwice, Polska; ² Katedra i Zakład Histologii i Patologii Komórki, Śląski Uniwersytet Medyczny w Zabrze, Zabrze, Polska

Łuszczyca to zapalna choroba skóry o słabo poznanej etiopatogenezie. Keratynocyty łuszcycowe charakteryzują się nadmierną proliferacją stymulowaną przez interleukiny prozapalne, wytworzone przez komórki Th1 i Th17. W efekcie prowadzi to do zmian w stratyfikacji naskórka i powstania blaszki łuszcycowej.

Wyniki dotychczasowych badań wskazują na możliwy wpływ białek opiekuńczych z rodziny HSPA (HSP70) na regulację odpowiedzi prozapalnej w skórze łuszcycowej. Białka te po wydzieleniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą, jako sygnały ostrzegawcze wpływać na układ odpornościowy informując o zaburzeniu stanu homeostazy lub uszkodzeniu komórki. W zmienionych przez chorobę warstwach skóry obserwowano zmienioną lokalizację białek rodziny HSPA, takich jak: HSPA5 (GRP78) i HSPA1. Co istotne, keratynocyty łuszcycowe cechuje zwiększona zdolność do wydzielania białka HSPA1 do otoczenia zewnątrzkomórkowego oraz jego internalizacji, co może sugerować udział tych białek w komunikacji międzykomórkowej oraz transdukcji sygnałów prozapalnych.

Wykazaliśmy, że w skórze łuszcycowej dochodzi także do silnej nadprodukcji jednego ze słabiej poznanych przedstawicieli rodziny HSPA, a mianowicie białka HSPA2. W prawidłowej skórze HSPA2 lokalizuje się selektywnie w warstwie podstawnej naskórka, natomiast w zmianach łuszcycowych białko to pojawia się też w komórkach otaczających naczynia krwionośne oraz hiperproliferujących keratynocytach. Obserwowaliśmy też, że zahamowaniu ekspresji genu *HSPA2* w spontanicznie unieśmiertelniczonych keratynocytach linii HaCaT towarzyszył wzrost ekspresji genów *S100A8* i *S100A9*, uznanych markerów łuszcycowych. Wyniki te sugerują, że funkcje białka HSPA2 mogą być powiązane z etiopatogenezą łuszczyca.

W celu zbadania roli HSPA2 w powstawaniu zmian łuszcycowych wykorzystamy ludzkie prawidłowe unieśmiertelnione keratynocyty naskórkowe (HaCaT, KerCT) oraz keratynocyty pierwotne z normalnym, endogennym poziomem ekspresji genu *HSPA2* oraz warianty ze stabilnie obniżoną i/lub podwyższoną ekspresją. Do indukcji fenotypu łuszcycowego zastosujemy standardowo stosowane metody:

- stymulacja mieszaniną rekombinowanych interleukin i cytokin (IL-1a, IL-17A, IL-22, Oncostatin M, TNF α , INF- γ);
- stymulacja kondycjonowaną pożywką z nadkomórek jednojądrzastych z krwi obwodowej aktywowanych lipopolisacharydem.

Zamierzamy zbadać wpływ indukcji stanu zapalnego towarzyszącego łuszczyca na zmiany ekspresji genu *HSPA2*, zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka oraz poziom jego sekrecji z keratynocytów, a także potencjalny wpływ HSPA2 na profil cytokin wydzielanych przez stymulowane keratynocyty. Przeprowadzone badania pomogą nam lepiej zrozumieć rolę białka HSPA2 w etiopatogenezie łuszczyca. Wiedza ta może wpływać na powstanie nowatorskich terapii opartych na inhibitorach białek z rodziny HSPA.

UDZIAŁ CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO SP1 W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW Z RODZINY *HSPA* (*HSP70*)

Damian Sojka¹, Sylwia Hasterok^{1,2}, Agnieszka Gogler-Pigłowska¹, Anna Wieczorek³,
Krystyna Klyszcz¹, Dorota Ściegłińska¹

¹ Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Gliwice, Polska; ² Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Katowice, Polska; ³ Zakład Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Kielce, Polska

Rodzina białek szoku cieplnego HSPA/HSP70 (ang. *heat shock protein*, HSPA) grupuje białka opiekuńcze o masie około 70 kilodaltonów charakteryzujące się wysokim poziomem podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Białka HSPA ulegają nadprodukcji w wielu typach nowotworów i są często uważane ze niekorzystny czynnik rokowniczy. Dane literaturowe sugerują, że HSPA mogą podtrzymywać agresywny fenotyp komórek nowotworowych oraz uczestniczyć w odpowiedzi na chemioterapię zwiększając oporność komórek. W związku z powyższym, białka te zaczęły być traktowane, jako potencjalny punkt uchwytu dla nowych leków przeciwnowotworowych.

Celem niniejszej pracy była scharakteryzowanie odpowiedzi komórek niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) na zastosowanie Manumycyny A, antybiotyku produkowanego przez *Streptomyces parvulus*. Związek ten wykazuje działanie przeciwnowotworowe i jest znany, jako inhibitor transferazy farnesylowej RAS oraz czynnika transkrypcyjnego Sp1 (ang. *specificity protein 1*).

W niniejszej pracy wykazaliśmy, że (1) traktowanie komórek NDRP Manumycyną A skutkuje obniżeniem poziomu czynnika transkrypcyjnego Sp1, czemu towarzyszyły zróżnicowane zmiany w poziomie białek z rodziny HSPA, a mianowicie zmniejszenie produkcji kilku przedstawicieli tej rodziny i silna nadprodukcja pozostałych: m.in. HSPA1 oraz HSPA6. Manumycyna A (2) ma silne działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne w NDRP, co może mieć związek z hamowaniem ekspresji genów z rodziny *HSPA* ważnych dla przeżycia komórki. Co więcej (3), skojarzenie Manumycyny A ze swoistym chemicznym inhibitorem białek HSPA VER 155008 ma działanie synergistyczne. Działanie to wyraża się m.in. poprzez zahamowanie cyklu komórkowego oraz aktywację apoptozy.

W celu weryfikacji hipotezy jakoby Sp1 był czynnikiem ważnym w regulacji ekspresji genów z rodziny *HSPA* zastosowany został kolejny inhibitor tego czynnika, a mianowicie antybiotyk mitramycyna A. Zaobserwowano, że (4) mitramycyna hamuje produkcję wielu białek rodziny HSPA, czemu towarzyszy obniżenie poziomu czynnika transkrypcyjnego Sp1 we wszystkich analizowanych liniach komórkowych NDRP. Mitramycyna, podobnie jak Manumycyna A, wykazuje działanie toksyczne dla komórek NDRP.

Podsumowując, uważamy, że czynnik transkrypcyjny Sp1 jest zaangażowany w regulację ekspresji wielu genów/białek z rodziny HSPA, a zahamowanie jego aktywności skutkuje drastycznym spadkiem żywotności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/21/N/NZ5/01917 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

W POSZUKIWANIU OPTIMUM; CZY SYSTEM HODOWLI KOMÓREK GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO MA ZNACZENIE W UJAWNIANIU SIĘ ZMIAN FENOTYPU ZALEŻNEGO OD BIAŁKA OPIEKUŃCZEGO HSPA2?

Agnieszka Gogler-Pigłowska, Anita Strączyńska-Niemiec, Damian Sojka, Mykola Chekan, Urszula Bojko, Dorota Ściegłńska

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach

Glejak wielopostaciowy (łac. *glioblastoma multiforme*, *GBM*) jest pierwotnym nowotworem wewnątrzczaszkowym klasyfikowanym, jako najbardziej złośliwa postać zmian wywodzących się z gleju gwiaździstego. GBM jest nowotworem o skrajnie niekorzystnym rokowaniu; czas przeżycia pacjentów od rozpoznania wynosi zwykle kilkanaście miesięcy. Powodowane jest to zarówno lokalizacją nowotworu (ważne fizjologicznie struktury mózgowia), jak i jego niezwykle dynamicznym wzrostem. Ponadto, komórki nowotworowe cechuje wysoka inwazyjność, co jest główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu chorych na GBM.

Dane literaturowe wskazują na udział białek opiekuńczych rodziny HSPA (HSP70) w modulowaniu wzrostu i ruchliwości komórek nowotworowych. Do wspomnianej rodziny należy białko HSPA2, którego ekspresję i funkcje przez lata wiązano z regulacją procesu spermatogenezy oraz z płodnością mężczyzn. Obecnie wiadomo, również dzięki naszym badaniom, że gen *HSPA2* jest aktywny w niektórych populacjach komórek somatycznych. Ponadto badania *in vitro* nad rolą HSPA2 w komórkach nowotworowych pochodzenia nabłonkowego wskazują na jego istotną rolę w utrzymywaniu złośliwego fenotypu. Natomiast rola białka HSPA2 w biologii nowotworów ośrodkowego układu nerwowego jest nieznaną.

W prezentowanych badaniach podjęliśmy się opisanie udziału białka opiekuńczego HSPA2 w modulacji fenotypu komórek glejaka wielopostaciowego. Wyniki badań immunohistochemicznych pokazały zmienioną lokalizację białka HSPA2 w ludzkich glejakach *in vivo* w odniesieniu do prawidłowej tkanki mózgowej – wzrost poziomu białka towarzyszył zwiększeniu złośliwości histologicznej guza, co może sugerować udział białka HSPA2 w modulowaniu fenotypu komórek glejaka wielopostaciowego. Przeprowadziliśmy analizy funkcjonalne *in vitro*, które objęły manipulację poziomem HSPA2 i określenie, czy i w jaki sposób niedobór białka wpływa na wzrost i ruchliwość komórek glejaka wielopostaciowego *in vitro*. Obniżenie poziomu białka HSPA2 w komórkach GBM utrzymywanych w standardowej dwuwymiarowej hodowli *in vitro* nie skutkowało zmianą tempa namnażania oraz ruchliwości komórek, w odpowiedzi na obecne w otoczeniu chemokiny. Przeprowadziliśmy ponadto badania w układzie trójwymiarowym (3D) symulującym stan guza *in vivo* i obserwowaliśmy zależne od poziomu HSPA2 zmiany morfologii komórek GBM oraz zmiany rozległości obszaru inwazyjnego, które nie były zauważalne w doświadczeniach prowadzonych na komórkach hodowanych w monowarstwie (2D). Powyższe obserwacje pokazują, że zmiany fenotypu komórek glejaka wielopostaciowego spowodowane deficytem białka HSPA2 mogą być zależne od organizacji przestrzennej komórek.

W świetle powyższych danych, zasadnym wydaje się być prowadzenie przyszłych badań, mających na celu wyjaśnienie roli białka HSPA2 w biologii GBM na trójwymiarowych modelach

in vitro oraz na zwierzęcych modelach *in vivo*. Wskazanie roli białka opiekuńczego HSPA2 np. w modulowaniu ruchliwości komórek glejaka wielopostaciowego wzbogaci wiedzę o biologii tego najbardziej agresywnego nowotworu ośrodkowego układu nerwowego i pozwoli na poszukiwane w przyszłości nowych przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych.

Praca powstała w wyniku realizacji zadania badawczego 2017/01/X/NZ3/01753 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

DETEKCJA BIAŁEK ODDZIAŁUJĄCYCH Z MYSIM BIAŁKIEM LOC66598

Katarzyna Mrowiec, Marek Chadalski, Monika Pietrowska, Anna Paszek, Agnieszka Tomajonik, Patryk Janus, Natalia Vydra, Wiesława Widlak

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże AK 15, Gliwice

Mysi gen *311000I122Rik* kodujący białko LOC66598 znajduje się w pierwszym intronie genu *Bfar* (bifunkcyjny regulator apoptozy). Myszy z nokautem genu *311000I122Rik* nie wykazują żadnych znaczących zmian fenotypowych, a funkcja tego genu jest nieznana. Odkryliśmy, że białko LOC66598 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym, a jego nadekspresja może indukować apoptozę. Aby uzyskać umiarkowany poziom ekspresji białka fuzyjnego LOC66598/EGFP w komórkach NIH3T3, zastosowaliśmy lentiwirusowy system ekspresji indukowany doksycykliną.

Poszukując białek oddziałujących z LOC66598 wykonaliśmy koimmunoprecypitację (GFP-trap, Chromotek), a następnie analizę białek na spektrometrze Orbitrap. Wstępna analiza wskazuje na oddziaływanie LOC66598 z białkami rybosomalnymi 40S (S25, S27, S14, S19, S3), histonami (H1.2, H1.4, H3.3C), białkami zaangażowanymi w splicing (SFPQ, SNRPA1, HNRNPA3, NONO, KHDRBS3) oraz w sygnalizację wapniową (HPCAL1, PTK2B). Co ciekawe, wiadomo, że białka SFPQ i NONO należące do rodziny DBHS białek wiążących RNA działają jako heteromer i są zaangażowane w rozwijanie i naprawę DNA przez łączenie niehomologicznych końców (NHEJ) oraz mogą odgrywać rolę w retencji jądrowej wadliwych cząsteczek RNA. Nasze wyniki sugerują, że LOC66598 może być dodatkowym składnikiem tego kompleksu. Zaobserwowane oddziaływanie LOC66598 z histonami mogłyby zachodzić przez jego domenę LGE (wiadomo, że domena tego typu może być zaangażowana w ubikwitynację histonów).

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantu 2014/13/B/NZ3/04650.

ZWIĘKSZONA EKSPRESJA PHLDA1 NIE INDUKUJE APOPTOZY ZALEŻNEJ OD KASPAZY-3 LECZ PROWADZI DO UTRATY KONTAKTU KOMÓREK Z PODŁOŻEM

Katarzyna Mrowiec, Patryk Janus, Agnieszka Toma-Jonik, Natalia Vydra, Wiesława Widłak

Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże AK 15, Gliwice

PHLDA1 (pleckstrin-homology-like domain family A, member1, znany również jako TDAG51, T-cell death-associated gene 51 protein) jest ewolucyjnie konserwowanym białkiem bogatym w prolinę-histydynę i prolinę-glutaminę. PHLDA1 może działać zarówno pro- jak i antyapoptotycznie, a jego dokładna rola w apoptotycznej śmierci komórki pozostaje kontrowersyjna. Między innymi postulowano, że PHLDA1 jest aktywowany przez czynnik transkrypcyjny HSF1 i może być odpowiedzialny za śmierć komórek indukowaną szokiem termicznym w komórkach termo-wrażliwych. Badając korelacje pomiędzy aktywacją genu *Phlda1* przez szok termiczny a wrażliwością komórek na stres (ocenianą testem Tunel) w narządach myszy nie zaobserwowaliśmy jednak takiej zależności. W spermatocytach i okrągłych spermatydach, które są najbardziej wrażliwe na stres termiczny, białko PHLDA1 nie ulega ekspresji. Co więcej, mimo aktywacji transkrypcji, poziom białka PHLDA1 obniża się po szoku termicznym we wrażliwych na stres komórkach HECa10.

W celu zbadania zdolności do indukcji apoptozy przez PHLDA1 sprawdziliśmy poziom aktywnej kaspazy-3 i kaspazy-7 po przejściowej transfekcji wektorów kodujących białka fuzyjne EGFP/PHLDA1 i PHLDA1/EGFP w porównaniu do proapoptotycznego PMAIP1/NOXA, również indukowanego przez HSF1. Jedynie nadekspresja PMAIP1 prowadziła do aktywacji kaspaz 3 i 7, natomiast nadekspresja PHLDA1 wywołuje aktywację kaspazy 7, która jest odpowiedzialna za utratę kontaktu z podłożem. Dodatkowo obserwowaliśmy komórki NIH3T3 po przejściowej transfekcji wektorów kodujących białka fuzyjne z EGFP przy użyciu mikroskopii przyżyciowej. Nadekspresja PMAIP1/EGFP wywołuje apoptozę i zielone komórki znikają z pola widzenia wkrótce po typowym fragmentowaniu komórki trwającym 40-60 minut. Białka fuzyjne PHLDA1 z EGFP prowadziły do oderwania komórek od podłoża i prawie wszystkie zielone komórki nadal były obecne do końca obserwacji przez 48 godzin.

PHLDA1 nie jest więc odpowiedzialne za inicjację zależnej od HSF1 apoptozy indukowanej szokiem termicznym, a może być odpowiedzialne za indukcję anoikis.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr grantu 2014/13/B/NZ3/04650.

BIAŁKO P53 JAKO REGULATOR WARUNKÓW OKSYDOREDUKCYJNYCH W KOMÓRKACH LUDZKIEGO NOWOTWORU JELITA GRUBEGO

Aleksandra Poterala-Hejmo¹, Sebastian Wołkowicz¹, Dorota Hudy¹, Tomasz Hejmo², Sylwia Ciesielska¹, Joanna Rzeszowska¹

¹ Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechnika Śląska, Gliwice; ² Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Warunki oksydoredukcyjne to ogół procesów utleniania i redukcji zachodzących w komórce. Kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania komórki równowaga pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) i aktywnością neutralizujących je systemów antyoksydacyjnych określana jest jako równowaga oksydoredukcyjna. Zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej prowadzą do uszkodzeń białek, lipidów i kwasów nukleinowych, mutacji i apoptozy (w przypadku nadprodukcji RFT) lub zaburzenia cyklu komórkowego i funkcji odpornościowych (niedobór RFT).

Brak pełnej izoformy białka p53 w komórkach nowotworu jelita grubego linii HCT116 p53^{-/-} oraz RKO E6 wiąże się z zaburzeniem równowagi oksydoredukcyjnej i wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu (w warunkach kontrolnych, przy braku zewnętrznych źródeł indukujących stres oksydacyjny). W komórkach tych zaobserwowano deregulację ścieżki FOXO, w tym istotnie statystycznie obniżenie ekspresji genu *FOXO1* kodującego czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów związanych z regulacją warunków oksydoredukcyjnych: dysmutazy ponadtlenu 1 i 2 (*SOD1*, *SOD2*), tioredoksyny 2 (*TXN2*), peroksyredoksyny 3 i 5 (*PRDX3*, *PRDX5*), oraz selenoproteiny P (*SEPP1*). Ekspresja tych genów jest również wyraźnie obniżona w komórkach pozbawionych pełnej izoformy białka p53, co może wpływać na zmniejszenie zdolności komórki do neutralizacji reaktywnych form tlenu.

Co ciekawe, mimo wzrostu całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu, zaobserwowano spadek poziomu anionorodnika ponadtlenu i aktywności enzymów odpowiedzialnych za jego dysmutację. Towarzyszy temu obniżenie aktywności oddechowej, produkcji ATP oraz poziomu kardiolipiny w błonie komórkowej mitochondriów. Sugeruje to, że brak białka p53 wpływa na proces fosforylacji oksydacyjnej i zmniejszenie wycieku elektronów z łańcucha oddechowego, który prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenu.

Podsumowując, uzyskane rezultaty wskazują, że białko p53 pełni istotną rolę w regulacji funkcjonowania mitochondriów, oddychania wewnątrzkomórkowego oraz aktywności antyoksydacyjnej. W warunkach kontrolnych białko p53 pełni funkcje antyoksydacyjne, a obniżenie jego poziomu może powodować wzrost liczby uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach nowotworu jelita grubego.

Praca finansowana z projektów 2015/19/D/NZ1/03443 (A.P-H), DEC-2016/21/B/ST7/02241 (S.W), 2015/19/B/ST7/02984 (J.R)

THE IMPACT OF CMKLR1 ON ANGIOGENESIS

Miriam Dawidowicz, Paweł Kiczmer, Alicja Prawdzic Seńkowska, Agnieszka Kula, Elżbieta Świętochowska

Department of Medical and Molecular Biology, Medical University of Silesia, Zabrze

Introduction: Colorectal cancer is the third most common type of tumor all over the world. Large percentage of patients presents with metastasis at the time of diagnosis or relapse after a few months, which does not allow for radical treatment. Chemotherapy is regarded as standard treatment for patients with colorectal cancer; however, it has some limitations: low selectivity, insufficient concentrations in tumor tissues, and systemic toxicity. Therefore, we should pin our hopes on biological therapy.

According to current knowledge, chemerin mediates angiogenesis and formation of tumour microenvironment via activation of its receptor, CMKLR1. However, this topic has never been investigated before with regard to colorectal cancer.

Aim of the study: To assess the CMKLR1 level with concentrations of two markers of angiogenesis: MMP-9 and VCAM-1, in tumor and margin tissue of colorectal cancer in relation to histological grade and TNM classification.

Material and methods: The study comprised 49 samples of tumor and margin tissue derived from colorectal cancer patients. To determine the concentration of CMKLR, MMP-9 and VCAM we used commercially available ELISA test kit.

Results: Significantly higher concentration of CMKLR1 and MMP-9 in tumor tissue was noted. CMKLR1 level in tumor tissue correlated with tumor MMP-9 and margin CMKLR1 concentrations. Regarding the concentrations in the margin tissue, CMKLR was found to be associated with both MMP-9 and VCAM-1 levels. VCAM-1 concentration correlated with MMP-9 level in the margin. CMKLR1 and MMP-9 levels in tumor tissue correlated significantly with T parameter value. VCAM-1 concentration in margin tissue was significantly higher among patients with distant metastases.

Conclusions: Our results indicate that the process of angiogenesis in tumor environment of colorectal cancer is associated with CMKLR-1 concentration. Further research may verify whether chemerin/CMKLR1 axis could be a suitable target in novel molecular therapies.

WIRUS MYKSOMATOZY W TERAPII CZERNIAKA

Joanna Jazowiecka-Rakus

Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże AK
15, Gliwice

OCENA POTENCJAŁU SORPCYJNEGO CYTOSTATYKÓW WYBRANYCH GRZYBÓW NADRZEWNYCH

Marcelina Jureczko, Wioletta Przysaś

Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki,
Politechnika Śląska, ul. Akademicka 2A, 44-100 Gliwice

Konsumpcja farmaceutyków stale rośnie i obecnie oscyluje wokół tysięcy ton rocznie. Bardzo duża ich ilość nie ulega degradacji na oczyszczalni ścieków, ze względu na swoją niską biodegradowalność. Do takich związków należą cytostatyki, które obecnie wykrywane są nie tylko w wodach powierzchniowych i gruntowych, ale również pitnych. Stanowią, zatem poważne zagrożenie dla środowiska i ludzi. Z tego powodu konieczne jest poszukiwanie alternatywnych dla tradycyjnego biologicznego rozkładu sposobów usuwania leków przeciwnowotworowych. Z pomocą mogą przyjść grzyby wielkoowocnikowe, które sprawdzają się w procesie sorpcji.

Celem pracy było określenie zdolności sorpcyjnej wybranych szczepów białej zgnilizny drewna: *Trametes versicolor* i *Pleurotus ostreatus* do usuwania dwóch leków przeciwnowotworowych: bleomycyny i winkrystyny. Test przeprowadzono na martwej (autoklawowanej) biomasie. Ubytek leków mierzono przez 4 godziny w regularnych interwałach czasowych z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis, a początkowym stężeniem leku było 10 mg/L.

Wyniki wykazały, że usunięcie cytostatyków różni się i zależy zarówno od leku, jak i gatunku grzyba. Ma to związek ze specyficznymi interakcjami pomiędzy danym związkiem chemicznym, a powierzchnią konkretnego szczepu. Największą eliminację (ok. 50%) osiągnięto dla bleomycyny w próbkach ze strzępkami *T. versicolor*. Drugi badany szczep zdołał zasorbować około 35% początkowej zawartości leku w próbkach. Rezultaty te potwierdzają liczne doniesienia literaturowe, które podkreślają duży potencjał *Trametes* sp. do usuwania farmaceutyków na drodze fizycznej. Ubytek winkrystyny był mniejszy i po 4 godz. wynosił maksymalnie 20%.

SESJA 3 – DIAGNOSTYKA I TERAPIE EKSPERYMENTALNE

NOVEL BENZENE-BASED CARBAMATES FOR AChE/BChE INHIBITION: SYNTHESIS AND LIGAND/STRUCTURE-ORIENTED SAR STUDY.

(POTENCJALNE INHIBITORY CHOLINESTERAZY - SYNTEZA I BADANIA QSAR)

Bak Andrzej

Institute of Chemistry, University of Silesia, Szkolna 9, 40 007 Katowice, Poland

A series of new benzene-based derivatives was designed, synthesised and comprehensively characterised. All of the tested compounds were evaluated for their *in vitro* ability to potentially inhibit the acetyl- and butyrylcholinesterase enzymes. The selectivity index of individual molecules to cholinesterases was also determined. Generally, the inhibitory potency was stronger against butyryl- compared to acetylcholinesterase; however, some of the compounds showed a promising inhibition of both enzymes. In fact, two compounds benzyl ethyl(1-oxo-1-phenylpropan-2-yl)carbamate and benzyl (1-(3-chlorophenyl)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)carbamate had a very high selectivity index, while the second one reached the lowest IC₅₀ value, which corresponds quite well with galanthamine. Moreover, comparative receptor-independent and receptor-dependent structure-activity studies were conducted to explain the observed variations in inhibiting the potential of the investigated carbamate series.

The principal objective of the ligand-based study was to comparatively analyse the molecular surface in order to gain insight into the electronic and/or steric factors that govern the ability to inhibit enzyme activities. The spatial distribution of potentially important steric and electrostatic factors was determined using the probability-guided pharmacophore mapping procedure, which is based on the iterative variable elimination method. Additionally, planar and spatial maps of the host-target interactions were created for all of the active compounds and compared with the drug molecules using the docking methodology.

NOWE CHELATORY ŻELAZA Z GRUPY TIOSEMIKARBAZONU W TERAPII FOTODYNAMICZNEJ

Robert Gawecki¹, Katarzyna Malarz¹, Jarosław Polański², Anna Mrozek-Wilczkiewicz¹

¹Uniwersytet Śląski w Katowicach, Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego i Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych, ul. 75 Pułku Piechoty 1, Chorzów 41-500, Polska; ²Uniwersytet Śląski w Katowicach, Instytut Chemii, ul. Szkolna 9, Katowice 40-006, Polska

Zwalczanie chorób nowotworowych stanowi jedno z największych wezwań dla współczesnej nauki. Obecne metody leczenia oparte na chemo- czy/i radioterapii są obciążone wieloma skutkami ubocznymi, jak i niską efektywnością. Jedną z alternatyw dla tradycyjnych metod jest terapia fotodynamiczna (PDT) charakteryzująca się niską inwazyjnością oraz wysoką selektywnością w stosunku do komórek niezmiennych nowotworowo, co czyni tą metodę atrakcyjną formą leczenia w porównaniu do obecnie stosowanych. PDT opiera się na wykorzystaniu substancji fotouczulających, które oświetlone odpowiednią długością fali światła widzialnego, przy obecności tlenu, generują reaktywne formy tlenu. Odmianą PDT jest terapia z wykorzystaniem kwasu 5-aminolewulinowego (ALA-PDT), w której zamiast egzogenego fotouczulacza podaje się prolek – kwas 5-aminolewulinowy (5-ALA), będący prekursorem protoporfiryny IX (PpIX) – naturalnego endogenego fotouczulacza [1,2].

Mimo że komórki nowotworowe mają podwyższony poziom PpIX, jej biosynteza jest często niewystarczająca do osiągnięcia stężeń terapeutycznych. Wobec tego jednym z podejść jest włączenie do terapii związków kompleksujących jony żelaza. Zastosowanie chelatorów ma na celu związanie żelaza, hamując tym samym syntezę hemu, przez co zwiększa się ilość PpIX w komórkach nowotworowych. Innym powodem niskiej efektywności PDT może być fakt aktywnego usuwania PpIX z komórek przez szereg transporterów z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*) [3, 4].

Badania prowadzone w naszym zespole skupione są na wykorzystaniu nietoksycznych nowych pochodnych tiosemikarbazonu (TSC) w terapii ALA-PDT. W przeprowadzonych badaniach oceniono cytotoksyczność, jak i zdolność do chelatacji pochodnych TSC na wybranych liniach komórkowych. Zbadano wpływ 5-ALA w kombinacji z nowymi pochodnymi TSC na akumulację protoporfiryny IX. W dalszych badaniach sprawdzono ekspresję genów enzymów uczestniczących w biosyntezie hemu, jak i transporterów ABC po aplikacji 5-ALA oraz w kombinacji z pochodnymi TSC. Otrzymane wyniki wykazały istotny wzrost akumulacji PpIX po traktowaniu kwasem 5-aminolewulinowym, jak i w kombinacji z niektórymi pochodnymi TSC. Natomiast analiza ekspresji genów szlaku biosyntezy hemu oraz transporterów ABC wykazała zmiany w profilu ekspresji ferrochelatazy, oksygenazy hemowej oraz transportera ABCG2, co może tłumaczyć otrzymane wyniki dla akumulacji PpIX oraz wyniki z naświetlania (efekt PDT).

[1] Gomaa I, *et al.*, Photodiagn Photodyn. **2012**, 9, 362–68

[2] Mrozek-Wilczkiewicz A, *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. **2014**, 5, 336

[3] Mrozek-Wilczkiewicz A, *et al.*, J. Cancer. **2017**, 8, 1979

[4] Casas A, *et al.*, Curr Med Chem. **2011**, 18(16), 2486–2515

WYBRANE ASPEKTY TERAPII FOTODYNAMICZNEJ

Violetta Kozik

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Instytut Chemii, ul. Szkolna 9, Katowice 40-006, Polska

MECHANIZM DZIAŁANIA POCHODNYCH STYRYLOCHINAZOLINY W INDUKCJI STRESU OKSYDACYJNEGO

Michał Kuczak^{1,2}, Katarzyna Malarz², Jacek Mularski¹, Anna Mrozek-Wilczkiewicz², Robert Musioł¹

¹Uniwersytet Śląski, Instytut Chemii, Szkolna 9, 40-006 Katowice, Polska; ² Uniwersytet Śląski, Instytut Fizyki im. A. Chełkowskiego i Śląskie Międzyuczelniane Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych, 75 Pułku Piechoty 1, 41-500 Chorzów, Polska

e-mail: mkuczak@us.edu.pl

Zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podłoża progresji nowotworu skłania naukowców do projektowania nowych związków wykazujących działanie antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych. Ze względu na złożone procesy i ścieżki sygnałowe wiele zsyntezowanych leków przeciwnowotworowych skierowanych jest na konkretny cel molekularny hamując jego działanie. W efekcie stosowane terapie przeciwnowotworowe nie są w pełni skuteczne, dlatego niezbędne jest wprowadzanie nowoczesnych metod wykorzystywanych do efektywnego zwalczania chorób nowotworowych. W ostatnich latach podejście polifarmakologiczne stało się istotną strategią wykorzystywaną w chemii medycznej prowadzącą do odkrywania nowych leków. Przede wszystkim założeniem polifarmakologii jest poszukiwanie leków wielocelowych, oddziałujących jednocześnie na kilka enzymów czy receptorów szlaków metabolicznych [1]. Dzięki temu podejściu otrzymujemy skuteczniejsze związki o cytotoksycznym działaniu na komórki nowotworowe poprzez blokadę lub spowolnienie wielu celów lub ścieżek przy jednoczesnej niewrażliwości na zjawisko lekooporności [2].

W warunkach *in vitro* przeprowadzono ocenę aktywności antyproliferacyjnej nowych, pochodnych opartych na fragmencie styrylochinazoliny. Testy wykonano względem linii ludzkich komórek nowotworowych m.in. glejaka linii U-251, białaczki szpikowej linii K562 oraz komórek prawidłowych (fibroblastów linii NHDF). Po zbadaniu cytotoksyczności badanej grupy związków, jak również określenia ich profilu selektywności względem komórek prawidłowych dokonano analizy mechanizmu działania wybranej pochodnej w komórce. W tym celu zostały określone zmiany ekspresji poszczególnych genów i białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego a także zaangażowanych w indukcję śmierci komórkowej. Szczególnie interesujące okazały się zmiany poziomów celów molekularnych związanych ze stresem oksydacyjnym. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono badania określające zmiany poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nowotworowych po inkubacji z badanym związkiem oraz poziom ekspresji genów kodujących antyoksydacyjne białka enzymatyczne.

[1] A.S. Reddy, S. Zhang. Clin. Pharmacol. 6 (2013) 41–47.

[2] A.D.W. Boran, R. Iyengar. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 13 (2010) 297–309.

WIELOCELOWE INHIBITORY KINAZ TYROZYNOWYCH W TERAPII ANTYNOWOTWOROWEJ

Katarzyna Malarz¹, Jacek Mularski², Michał Kuczak^{1,2}, Marcin Pacholczyk³, Robert Musioł², Anna Mrozek-Wilczkiewicz¹

¹ Uniwersytet Śląski w Katowicach, Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego, ul. 75 Pułku Piechoty 1, Chorzów 41-500, Polska; ² Uniwersytet Śląski w Katowicach, Instytut Chemii, ul. Szkolna 9, Katowice 40-006, Polska; ³ Politechnika Śląska, Instytut Automatyki, ul. Akademicka 16, Gliwice 44-100, Polska

email: katarzyna.malarz@us.edu.pl

Rozwój chemii medycznej oraz racjonalnego projektowania leków jest podstawą nowoczesnych metod leczenia. Obecnie wiele badań w tej dziedzinie skupia się na mechanizmach nowotworzenia, wskazując szczególną rolę cząsteczek zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego oraz ścieżek transdukcji sygnałów¹. Istotną rolę w tym zakresie pełnią kinazy tyrozynowe, które dzięki swojej nadmiernej aktywności i kluczowej roli w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, stanowią atrakcyjne cele dla leków w leczeniu niektórych typów nowotworów. Jednakże, opracowanie skutecznych inhibitorów kinaz tyrozynowych stanowi wyzwanie, ze względu na wysoką konserwatywność regionu w miejscu wiążącym ATP, głównego miejsca docelowego kinaz. Kolejnym istotnym problemem jest oporność na lek, która jest głównym czynnikiem ograniczającym skuteczność stosowanych jednocelowych terapii przeciwnowotworowych².

W naszym zespole od lat, prowadzone są badania skoncentrowane na poszukiwaniu nowych, aktywnych bioefektorów. W wyniku tych prac, syntezowane są nowe pochodne chinazoliny, które charakteryzują się dobrymi właściwościami antyproliferacyjnymi oraz wykazują zdolność do hamowania niereceptorowych kinaz tyrozynowych^{3,4}. Ostatnie prace skupiły się na zaprojektowaniu oraz zsyntezowaniu dużej grupy nowych pochodnych styrylochinazoliny oraz ich siarkowych odpowiedników. Do stworzenia nowych układów wykorzystano molekularne fragmenty znajdujące się w kilku związkach znajdujących się w badaniach przedklinicznych, m.in. CP-31398, który jest reaktywatorem białka p53. Dla wszystkich otrzymanych pochodnych określono aktywność antyproliferacyjną na panelu nowotworowych linii komórkowych (m.in. nowotwory piersi - MCF7, jelita - HCT 116, mózgu - U251, białaczka - K562, płuc - A549). Ponadto, dla aktywnych pochodnych wykazano selektywność wobec komórek prawidłowych. Równolegle określono wpływ związków na aktywność niereceptorowych kinaz tyrozynowych *in vitro*. Uzyskane wyniki potwierdziły szczególnie wysoką aktywność względem kinaz tyrozynowych: Abl1, Btk oraz kinaz z rodziny Src. W dalszym kroku podjęto się próby wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania nowych pochodnych na poziomie komórkowych. Badania ujawniły wielopłaszczyznowy mechanizm działania styrylochinazolin, nie tylko oparty na inhibicji kinaz, ale również inhibicji cyklu komórkowego oraz indukcji śmierci komórkowej na drodze apoptozy i autofagii.

(1) Levitzki, A.; Klein, S. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31* (4), 287–329.

(2) Alexander, P. B.; Wang, X.-F. *Front. Med.* **2015**, *9* (2), 134–138.

(3) Mrozek-Wilczkiewicz, A., et al. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (7), 2664–2671.

(4) Mularski, J.; Malarz, K.; Pacholczyk, M.; Musiol, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 610–625.

Badania są objęte finansowaniem z Narodowego Centrum Nauki (NCN, grant 2016/23/N/NZ7/00351).

FOLIC ACID MODIFIES DNA METHYLATION MACHINERY AND REMODELS PROMOTER METHYLATION PROFILE OF SELECTED TUMOR SUPPRESSOR GENES IN HUMAN CML CELLS

Katarzyna Lubecka, Jagoda Jakubik, Agnieszka Kaufman-Szymczyk

Department of Biomedical Chemistry, Faculty of Health Sciences, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

Folate, one of the most studied dietary compounds, has been still the main topic of debate on food fortification. Although low folate levels may be associated with increased risk of cancer development, simultaneously several reports indicate detrimental effects mediated by high folate concentrations. Folate is a water-soluble form of vitamin B9, which is important for DNA synthesis, repair, and methylation. Folate as a crucial nutrient involved in one-carbon metabolism has a direct effect on the level of a methyl donor, S-adenosyl-L-methionine. Our previous in vitro studies in human breast cancer cells demonstrated that the increasing concentrations of folic acid lead to a dose-dependent down-regulation of the selected tumor suppressor genes, which may be linked to the increased DNA methylation detected within their promoter regions. The effects of folic acid exposure were more remarkable in non-invasive MCF7 cells, where we also observed robust *DNMT1* up-regulation.

In the present study, using methylation-sensitive restriction analysis (MSRA) and qPCR, we tested the impact of folic acid on promoter methylation and expression of *PTEN* and *RARB* tumor suppressor genes in human chronic myeloid leukemia (CML) cells. The K-562 cell line was used as an experimental in vitro model of human CML cells. The results show that folic acid exposure modifies DNA methylation machinery (*DNMT1* and *CDKN1A* expression) and remodels DNA methylation profile of selected tumor suppressor genes in K-562 cells. Moreover, bioinformatic analysis of publicly available data from the GEO DataSets was carried out in order to evaluate the effects of folic acid supplementation on *PTEN* and *RARB* methylation in human blood DNA.

Our findings show that caution needs to be used when introducing folic acid supplementation, and designing in vitro and in vivo studies on folic acid exposure.

The Medical University of Lodz financed the studies, grants #503/6-099-01/503-61-001 and #502-03/6-099-01/502-64-133-18.

CLOFARABINE INHIBITS DNA METHYLATION MACHINERY, UPREGULATES TUMOR SUPPRESSOR GENES AND INDUCES APOPTOSIS OF ALL CELLS

Agnieszka Kaufman-Szymczyk **Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.**, Katarzyna Lubecka¹

Department of Biomedical Chemistry, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

Clofarabine (2-chloro-2-fluoro-2-deoxyarabinosyladenine, CIF), a second-generation 2-deoxyadenosine analogue, possesses manifold anti-cancer activities. Our previous reports and some others demonstrate potential capacity of CIF to regulate epigenetic machinery. Our present study is the first to investigate the influence of CIF on the modulators of DNA methylation machinery, including DNMT1 and CDKN1A in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells. CIF effects on promoter methylation and transcriptional activity of hypermethylated and silenced tumor suppressor genes (TSGs), including *APC*, *CDKN2A*, *PTEN* and *RARB*, have been tested as well. Methylation level of proximal promoter region of *APC*, *CDKN2A*, *PTEN* and *RARB* as well as expression of those TSGs, *DNMT1* and *CDKN1A*, were estimated using methylation-sensitive restriction analysis and qPCR, respectively. The NALM6 cell line was used as an experimental *in vitro* model of ALL cells. We observed CIF-mediated inhibition of cellular viability and apoptosis induction of NALM6 cells with increased percentage of cells positive for active Caspase-3. Interestingly, exposure of NALM6 cells to CIF at 20 nM concentration for 3 days led to significant *DNMT1* downregulation accompanied by robust *CDKN1A* upregulation. CIF caused hypomethylation of *APC*, *CDKN2A*, *PTEN* and *RARB* with concomitant increase in their transcript levels. Taken together, our results demonstrate the ability of CIF to reactivate DNA methylation-silenced TSG in ALL cells. It may implicate translational significance of our findings and support CIF application as a new epigenetic modulator in anti-leukemic therapy.

The Medical University of Lodz financed the study, grant no. 503/6-099-01/503-61-001.

ZWIĄZEK WARIANTÓW c.444+1G>A I c.1100delC GENU CHEK2 Z RAKIEM BRODAWKOWATYM TARCZYCY – BADANIA WŁASNE I META-ANALIZA

Dorota Kula, Michał Kalemba, Zbigniew Puch, Małgorzata Kowalska, Michał Jarzab, Dominika Sznajder, Beata Hejduk, Katarzyna Steinhof-Radwańska, Monika Halczok, Tomasz Tyszkiewicz, Renata Cyplińska, Barbara Jarzab, Daria Handkiewicz-Junak

Centrum Onkologii - Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice

Predyspozycja do raka brodawkowego tarczycy (ang. Papillary Thyroid Carcinoma, PTC) ma charakter wielogenowy i wieloczynnikowy uwarunkowana jest współdziałaniem indywidualnego podłoża genetycznego i czynników środowiskowych, jednakże, jak dotąd, geny odpowiedzialne za rozwój PTC nie są dobrze poznane. Wykazano związek wielu genów z PTC, jednym z badanych był gen CHEK2.

Celem pracy była analiza związku wariantu c.444+1GA (dawniej IVS2+1GA) i c.1100delC genu CHEK2 z PTC w badaniach własnych oraz meta-analiza opublikowanych badań dotyczących populacji polskiej.

Materiał do badań własnych stanowiło DNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej pochodzące od 2279 osób chorych na PTC i 1217 osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Oznaczenia wariantu c.444+1GA wykonano techniką HRM (ang. High Resolution Melting), natomiast wariantu c.1100delC techniką dyskryminacji alleli. Wyniki pozytywne potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sanger. Meta-analizę wykonano dla łącznej grupy 2920 chorych z PTC oraz 5686 osb zdrowych.

Wykazano związek wariantu c.444+1GA z PTC zaobserwowano różne częstości genotypów dla grupy osób chorych i zdrowych oraz znamienne podwyższoną wartość OR (ang. odds ratio), która wynosiła 4,49. W przypadku wariantu c.1100delC zaobserwowano nieznamiennie różnice w częstości występowania genotypów w badanych grupach. Meta-analiza wykazała związek wariantu c.444+1GA z PTC (OR=5, 89) oraz nieznamiennie różnice dla wariantu c.1100delC.

Potwierdzono związek wariantu c.444+1GA genu CHEK2 z rakiem brodawkowym tarczycy w populacji polskiej, natomiast badania wariantu c.1100delC nie wykazały znamiennej różnic.

Praca finansowana z projektu Nowe narzędzia diagnostyki molekularnej i obrazowania w indywidualizowanej terapii raka piersi, tarczycy i gruczołu krokowego [MILESTONE]: STRATEGMED2/267398 /4/NCBR/2015 oraz grantu Narodowego Centrum Nauki nr N N402 193740.

MOLECULAR BACKGROUND OF LUNG CANCER CELLS RESISTANCE AGAINST NOVEL FGFR INHIBITOR: ACGH AND RNA-SEQ ANALYSIS

Katarzyna Lisowska², Katarzyna Kujawa², Patrycja Tudrej², Magdalena Olbryt², Kamila Kitowska¹, Rafał Sądej¹, Alexander Cortez²

¹ Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer, Maria Skłodowska-Curie Institute - Oncology Center, Gliwice Branch, Poland; ² Department of Medical Biotechnology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

Background. Nearly 20% of lung cancers have aberrant Fibroblast growth factor receptor (FGFR) signaling. Inhibition of this pathway may be beneficial for selected patients. Our project concerns CPL-304-110, a novel selective FGFR inhibitor developed by Polish pharmaceutical company CelonPharma.

Objective. Our aim was to identify potential new biomarkers indicative of tumor sensitivity/resistance toward CPL-304-110. Using array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) and RNA sequencing (RNA-seq) we assessed which genes and signaling pathways may be affected in lung cancer cells resistant to CPL-304-110.

Methods. DNA was isolated from wild type H1703 lung cancer cells which are sensitive to CPL-304-110 inhibitor (H1703_wt) and from its variant (H1703_R) which is resistant to the inhibitor. aCGH was performed using Agilent Technologies (60K) arrays. RNA was isolated from H1703_R and H1703_wt cells. RNAseq was performed using HiSeq4000 (Illumina). For identification of affected signaling pathways data was analyzed using Gene Set Enrichment Analysis (GSA).

Results. We compared both variants of H1703 cell line according to the copy number variation of their genomes. The results of aCGH indicate that genomic regions affected by copy number changes (amplifications and deletions) contribute to signaling pathways involved in cell proliferation, survival, apoptosis, differentiation, cell cycle, cellular motility and metabolism. Sequencing of cellular transcriptome (RNAseq) revealed that resistant cell line H1703-R showed significantly changed expression of many genes engaged in signaling pathways related with structure and function of extracellular matrix. Interestingly, among affected pathways were also those related with signaling through FGFR, ERBB, GRB2 and PTEN.

Conclusions. This study allowed to preselect genome rearrangements and gene expression changes potentially engaged in development of resistance of H1703 lung cancer cells toward CPL-304-110. Among differentially expressed genes we have found some candidate molecular markers for identification of patients that could respond to therapy with this novel FGFR inhibitor.

The research was co-financed by the Polish National Center of Research and Development and pharmaceutical company CelonPharma S.A., project CELONKO (STRATEGMED2/266776/17/NCBR/2015).

ANALIZA PORÓWNAWCZA RAKA GARDŁA ŚRODKOWEGO I RAKA ODBYTU – PODOBIENSTWA I RÓŻNICE

Agnieszka Mazurek

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Dane literaturowe wskazują, że większość przypadków raka odbytu to zachorowania, w których czynnikiem etiologicznym jest wirus brodawczaka ludzkiego (HPV), występujący w około 80%. Natomiast w grupie chorych na raka gardła środkowego (RGŚ) odsetki zachorowań na raka zależnego od HPV to około 25%. W ostatnich latach zaobserwowano na świecie wzrost liczby zachorowań na raka zależnego od HPV. Zatem, badanie HPV w grupach wysokiego ryzyka wydaje się być ważnym badaniem molekularnym, a innowacyjne zastosowanie krwi, jako materiału wyjściowego do diagnostyki jest szybkim i łatwym badaniem choroby nowotworowej zależnej od HPV, mającym zastosowanie w onkologii.

W latach 2013-2015 liczba zachorowań na raka odbytu w Polsce wynosiła odpowiednio 266, 304, 330. Natomiast liczba zachorowań na RGŚ w latach 2013-2015 wynosiła odpowiednio 2056, 2136, 2163. Z porównania tych danych wynika, że występuje wzrostowa dynamika zachorowań, oszacowana na poziomie ok 3%. W grupie chorych na RGŚ kobiety stanowią około 27%, tymczasem w grupie pacjentów chorych na raka odbytu odsetek kobiet to 67%.

Najczęstszym typem wirusa występującym w obu tych grupach jest genotyp HPV16. Badania na krwi wskazują, że częstość występowania DNA HPV16 we krwi chorych na RGŚ wynosi 38%, przy czym 42% to kobiety, a 58% to mężczyźni. Tymczasem, w grupie chorych na raka odbytu połowa chorych posiada DNA HPV16 we krwi i są to prawie wyłącznie kobiety (92%). Analiza porównawcza wiremii DNA HPV16 w osoczu chorych na raka odbytu i RGŚ wskazuje, że poziom wiremii we krwi jest porównywalny w tych nowotworach. Czynnikiem istotnie modulującym poziom wiremii zarówno w raku gardła środkowego jak i raku odbytu jest palenie papierosów. Wyraźnie wyższy poziom wiremii DNA HPV16 jest u chorych, którzy nie palą. Jednakże, najwyższą wiremię posiadają niepalące kobiety. Prawdopodobne jest, zatem, że istnieje dodatkowy, nieznaną czynnik specyficzny dla płci żeńskiej, który powoduje silniejszą replikację wirusa podczas nowotworzenia.

Program TANGO 2, dofinansowanie realizowane w ramach Wspólnego Przedsięwzięcia Narodowego Centrum Nauki i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, TANGO2/340829/NCBR/2017

WYKRYWANIE I CHARAKTERYZOWANIE EGZOSOMÓW W OPARCIU O CYTOMETRIĘ PRZEPIYWOWĄ

Mateusz Smolorz

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

METODY IDENTYFIKACJI OBWIEDNI IZOTOPOWYCH W DANYCH Z OBRAZOWANIA MOLEKULARNEGO MALDI-TOF

Anna Glodek

Politechnika Śląska, Gliwice

NOŚNIKI POLIMEROWE I KOMÓRKOWE W SKOJARZONEJ TERAPII NOWOTWORÓW

Aleksander Sochanik

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

WPLYW MINOCYKLINY NA NASTĘPSTWA KRWOTOKU PODPAJECZYNÓWKOWEGO U SZCZURÓW

Daria Gendosz de Carriello^{1,2}

¹ Zakład Fizjologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach;

² Katedra i Zakład Histologii i Patologii Komórki w Zabrze, Uniwersytet Medyczny w Katowicach



ANCHEM

