

## **Autoreferat**

### **1. Imię i nazwisko**

Artur Cieślak-Pobuda

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

- 10. 07. 2007 r. – uzyskanie tytułu magistra inżyniera technologii i inżynierii chemicznej na Wydziale Chemii Politechniki Śląskiej w Gliwicach, kierunek: Technologia i Inżynieria Chemiczna (Makrokierunek), specjalność "Technology and Chemical Engineering of Fine Chemicals and Specialty Materials" na podstawie pracy magisterskiej pt "Structure and morphology of poly(ADP-ribose) foci in cells exposed to genotoxic stress".
- 26. 06. 2012 r. – uzyskanie stopnia doktora inżyniera w dziedzinie nauk technicznych, w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, specjalność Biologia Systemów na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Odpowiedź komórkowa na promieniowanie jonizujące: rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 i reaktywnych form tlenu”. Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- 2012 - 2015 Department of Clinical & Experimental Medicine, Integrative Regenerative Medicine (IGEN) Center, Linköping University, Linköping, Szwecja  
stanowisko: *post-doc*
- 2012 - 2014, Zakład Inżynierii Systemów, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice  
stanowisko: *adiunkt*
- 2014 – obecnie, Zakład Eksploracyjnej Analizy Danych, Instytut Automatyki, Politechnika Śląska, Gliwice  
stanowisko: *adiunkt*
- 2016 – obecnie, Stem Cell Group; Nordic EMBL Partnership; Centre for Molecular Medicine Norway (NCMM); University of Oslo; Oslo, Norwegia

stanowisko: *post-doc, stypendysta programu "Scientia"- EU Marie Curie Postdoctoral Fellowship in Health Science*

**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. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**A) Cykl publikacji pod wspólnym tytułem:**

**„Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste – potencjalne zastosowania dla medycyny regeneracyjnej oraz ryzyko związane z ich podobieństwem do nowotworowych komórek macierzystych”**

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji. Oświadczenie współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji habilitanta zawarte są w Załączniku 6 (oświadczenia współautorów) i 7 (katalog z kopiami publikacji).

**B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. **Cieślar-Pobuda A**, Jain MV, Kratz G, Rzeszowska-Wolny J, Ghavami S, Wiechec E. The expression pattern of PFKFB3 enzyme distinguishes between induced-pluripotent stem cells and cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29753-70.

[IF=5.008, MNiSW=40]

*Wkład habilitanta - decydujący udział w tworzeniu koncepcji i planu badań, wybór metodyki badań, przeprowadzenie badań (wszystkich, za wyjątkiem tych, których wyniki przedstawiono na rycinie 8B), analiza statystyczna i interpretacja otrzymanych wyników, analiza piśmiennictwa, przygotowanie rycin i tekstu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje, korekta pracy przed złożeniem do druku. Mój udział procentowy szacuję na 85%*

2. Jain MV, Jangamreddy JR, Grabarek J, Schweizer F, Klonisch T, **Cieślar-Pobuda A**, Los MJ. Nuclear localized Akt enhances breast cancer stem-like cells through counter-regulation of p21(Waf1/Cip1) and p27(kip1). *Cell Cycle*. 2015;14(13):2109-20.

[IF=3.952 MNiSW=30]

*Wkład habilitanta - udział w tworzeniu planu badań, pomoc pierwszemu autorowi w przeprowadzeniu analiz cytometrycznych, przeprowadzenie testu klonogenego, konsultacja oraz pomoc w interpretacji wyników, przygotowanie rycin 2A,C oraz 6 do manuskryptu, odpowiedzi na część recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 20%*

3. **Cieślar-Pobuda A**, Back M, Magnusson K, Jain MV, Rafat M, Ghavami S, Nilsson KPR, Los MJ. Cell type related differences in staining with pentameric thiophene derivatives. *Cytometry A*. 2014;85(7):628-35.

[IF=2.928, MNiSW=30]

*Wkład habilitanta - stworzenie koncepcji i planu badań związanych ze znakowaniem fluorescencyjnym i analizą cytometryczną, przeprowadzenie analiz cytometrycznych i*

*mikroskopowych, analiza statystyczna i interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 65%*

4. **Cieślak-Pobuda A.**, Rafat M., Knoflach V., Skonieczna M., Hudecki A., Malecki A., Urasinska E., Ghavami S., Los M. J., Human induced pluripotent stem cell differentiation and direct transdifferentiation into corneal epithelial-like cells. Oncotarget. 2016;6(30):29753-70.

[IF=5.008, MNiSW=40]

*Wkład habilitanta - Przygotowanie planu i metodyki badań, hodowla komórek iPS, przygotowanie lentiwirusów, różnicowanie komórek iPS do komórek nabłonkowych rogówki, transróżnicowanie fibroblastów), immunocytochemia, analiza mikroskopowa, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 70%*

5. Gelmi A., **Cieślak-Pobuda A.**, de Muinck E., Los M., Rafat M., Jager E.W.H., Direct mechanical stimulation of stem cells: a beating electroactive scaffold for cardiac tissue engineering, Adv. Healthc. Mater., 2016

[IF=5.760, MNiSW=40]

*Wkład habilitanta - Przygotowanie planu badań związanych z biologiczną częścią manuskryptu, hodowla komórek iPS, różnicowanie ich do kardiomiocytów, wraz z pierwszym i ostatnim autorem stymulacja komórek i podłoża impulsami elektrycznymi, wykonanie reakcji PCR oraz znakowanie fluorescencyjne, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowaniu części manuskryptu, korekta pracy przed złożeniem do druku. Mój udział procentowy szacuję na 35%*

6. Sherrell P. C., Elmén K., **Cieślak-Pobuda A.**, Wiechec E., Lemoine M., Arzhanghi Z., Silverå-Ejneby M., Brask J., Daka J. N., Rafat M., Cardiac and Stem Cell-Cocooned Hybrid Microspheres: A Multi Factorial Design Approach, Sensors and Actuators B: Chemical. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.002>

[IF=4.758, MNiSW=40]

*Wkład habilitanta - udział w tworzeniu planu badań związanych z biologiczną częścią manuskryptu, przeprowadzenie eksperymentów z komórkami (hodowla, enkapsulacja, znakowanie fluorescencyjne, oznaczanie przeżywalności komórek, pomoc w interpretacji otrzymanych wyników, przygotowanie części manuskryptu opisującej eksperymenty na komórkach, korekta pracy przed złożeniem do druku. Mój udział procentowy szacuję na 25%*

#### Prace poglądowe:

Poniższe prace formalnie nie wchodzą w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego (rozumianego jako wyłącznie oryginalne prace), jednakże wraz z pozostałymi pracami, tworzą jednolity tematycznie ciąg publikacji opisujący problemy związane z przeprogramowaniem komórek somatycznych do komórek iPS, ich podobieństwem do nowotworowych komórek macierzytych (ang. CSC) oraz metodami detekcji komórek CSC.

*Wkład habilitanta w prace polegał na napisaniu wybranych podrozdziałów, przygotowaniu części rycin i tabel, korekcie prac przed złożeniem do druku oraz odpowiedzi na część uwag recenzentów.*

7. A.M. Wasik, J. Grabarek, A. Pantovic, **Cieślak-Pobuda A.**, H.R. Asgari, C. Bundgaard Nielsen, M. Rafat, I.M. Dixon, et.al, Reprogramming and carcinogenesis-parallels and distinctions, Int Rev Cell Mol Biol, 308 (2014) 167-203.

[IF=3.419, MNiSW = 30]

8. Akbari-Birgani S, Paranjothy T, Zuse A, Janikowski T, **Cieślak-Pobuda A**, Likus W, et al. Cancer stem cells, cancer-initiating cells and methods for their detection. Drug Discov Today. 03/2016;DOI:10.1016/j.drudis.2016.03.004

[IF=5.625, MNiSW=45]

9. W. Likus, K. Siemianowicz, K. Bieńk, M. Pakuła, H. Pathak, C. Dutta, Q. Wang, S. Shojaei, Y. G. Assaraf, S. Ghavami, **Cieślak-Pobuda A.**, M. J. Łos; Could drugs inhibiting the mevalonate pathway also target cancer stem cells?; Drug Resistance Updates, Volume 25, 13 - 25, 2016

[IF=7.970, MNiSW=50]

Łączny współczynnik oddziaływania dla tych prac (z wyłączeniem prac poglądowych) **IF = 27.414; MNiSW = 220**, (uwzględniając prace poglądowe: **IF = 44.408; MNiSW = 345**)

### **C) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Ostatnie lata zaowocowały w nauce obiecującym narzędziem do badań nad komórkami macierzystymi oraz do zastosowań w medycynie regeneracyjnej - indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (iPS). Te sztucznie otrzymanywane komórki macierzyste, oprócz licznych korzyści (np. etycznie akceptowalne źródło komórek macierzystych dla zastosowań klinicznych) ciągle budzą obawy związane z kwestią bezpieczeństwa. Wielokrotnie wykazano, że tkanki zróżnicowane z komórek iPS mają zwiększoną skłonność do tworzenia nowotworów, a dodanie iPS do organów zwierzęcych skutkuje powstawaniem potworniaków. Badania sugerują, że komórki iPS mogą mieć wiele wspólnego z nowotworowymi komórkami macierzystymi (ang. *Cancer Stem Cells, CSC*). iPS wykazują podobieństwo do CSC, nie tylko ze względu na zdolność do wywoływania nowotworów, ale również w wielu innych aspektach, takich jak ekspresja genów związanych z macierzystością (ang. *stemness*), czy też regulacją cyklu komórkowego. Ryzyko związane z nowotworzeniem jest zatem jedną z przyczyn, dla której komórki iPS muszą zostać dokładniej scharakteryzowane zanim na dobre staną się funkcjonalnym narzędziem medycyny regeneracyjnej. Analiza podobieństw i różnic między CSC i iPS to tylko część badań, które mogą pomóc w poznaniu przyczyn nowotworzenia w tkankach pochodzących od iPS, a także prowadzić do zmniejszenia ryzyka ich powstawania. Ważną kwestią są także badania nad

samymi nowotorowymi komórkami macierzystymi, a mianowicie badania nad ich wykrywaniem oraz poznaniem mechanizmów ich powstawania. W dalszym ciągu istotna jest również konieczność udoskonalania i opracowywania nowych metod różnicowania komórek iPS do poszczególnych tkanek, tak aby w jak najbliższej przyszłości umożliwić bezpieczne zastosowanie komórek iPS w medycynie.

**Celem** prowadzonych przeze mnie badań była indukcja ludzkich komórek iPS z fibroblastów, porównanie ich z komórkami CSC, a następnie znalezienie czynników różnicujących oba typy komórek od siebie. W swojej pracy skupiałem się także na wpływie AKT-1 na zachowanie pluripotencjalności w nowotworowych komórkach macierzystych, jak również na znalezieniu metody pozwalającej na wykrycie CSC w populacji innych komórek, nowotworowych poprzez wykorzystanie związków LCO (*ang. Luminescent Conjugated Oligothiophenes*). Kolejnym z celów było ulepszenie metody różnicowania iPS do komórek mięśnia sercowego wykorzystując do tego mechaniczno-elektrycznie aktywne podłoża oraz enkapsulację komórek, a także opracowanie nowej metody otrzymywania komórek nabłonka rogówki oka wykorzystując zarówno iPS, jak i dokonując po raz pierwszy bezpośredniej transdiferencjacji fibroblastów, pomijając etap wykorzystujący komórki macierzyste.

## **Wstęp**

Wyprowadzanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS) z komórek somatycznych dało medycynie nadzieję na skuteczną walkę z różnymi chorobami. Do tej pory zostało opracowanych wiele sposobów produkcji komórek iPS mających na celu zmniejszenie ryzyka związanego z samym procesem reprogramowania, jednak ryzyko nowotworzenia w tkankach zróżnicowanych z iPS jest nadal poważne [1,2]. Jednym z powodów, dla których komórki iPS mogą przekształcać się w komórki nowotworowe jest zastosowanie czynników transkrypcyjnych w procesie reprogramowania. Dwa z nich: c-Myc i Klf4 oprócz tego, że wchodzi w skład tzw. “*Yamanaka cocktail*”, są także znanymi protoonkogenami, które odgrywają ważną rolę w samoodnowie komórek macierzystych. Klf4 koduje czynnik transkrypcyjny, który jest związany zarówno z represją nowotworu, jak i z onkogenezą. Zarówno Klf4 i c-Myc prowadzą także do zakłóceń replikacji DNA i niestabilności genomowej, co również świadczy o dużym podobieństwie między procesem indukowania pluripotencji, a nowotworzeniem. Komórki iPS są pod wieloma względami podobne także do macierzystych komórek nowotworowych, które stanowią nieliczną podgrupę komórek

nowotworowych mających zdolność do samoodnawiania, tworzenia nowotworu oraz przerzutów [3]. Do tej pory obecność tych komórek udokumentowano w wielu typach nowotworów: piersi, mózgu, skóry, głowy i szyi, tarczycy, szyjki macicy, płuc oraz białaczki [4-7]. CSC występują preferencyjnie w obrębie tzw. niszy mikrośrodowiskowych tkanki nowotworowej, gdzie mają ograniczony dostęp do tlenu. Obniżone stężenie tlenu ma kluczowe znaczenie dla samoodnowy CSC, ich potencjału przerzutowego oraz oporności na terapię. Komórki te znane są również ze zwiększonego poziomu białek anti-apoptotycznych w stosunku do komórek tej samej tkanki, co po części wyjaśnia oporność CSC na chemioterapię [8,9]. Niemniej jednak, pochodzenie CSC pozostaje nadal niejasne. Sądzi się, że CSC tworzą się w procesie podobnym do reprogramowania, z komórek które nabyły fenotyp bardziej przypominający komórki macierzyste lub z komórek macierzystych, w których nagromadziła się wystarczająca liczba mutacji wymaganych do transformacji nowotworowej. Możliwe jest również, że CSC są wynikiem kombinacji obu tych mechanizmów. Komórki iPS wykazują spore podobieństwo do CSC także, jeśli chodzi o proliferację oraz ekspresję niektórych czynników związanych z macierzystością (*stemness factors*). Podobnie jak komórki iPS, CSC wykazują zwiększoną skłonność do tworzenia nowotworów, przy czym skłonność ta zależy od pochodzenia komórek. Komórki iPS wyprowadzone z różnych typów komórek somatycznych mogą różnić się zarówno w ich zdolności do różnicowania, jak i w podatności do tworzenia potworniaków [1,10]. Zarówno CSC jak i iPS charakteryzują się zmienionym przebiegiem cyklu komórkowego zarówno w porównaniu do komórek normalnych, jak i macierzystych. Badania przeprowadzone przez Ghule i współpracowników wykazały, że ludzkie komórki iPS charakteryzują się krótką fazą G1 i skróconym cyklem komórkowym (16-18h) [11]. Dotychczasowe badania wskazują także na istotną funkcję różnych szlaków metabolicznych w wyznaczaniu losu komórek. To między innymi dlatego rola i znaczenie metabolizmu glukozy w biologii nowotworów jest przedmiotem intensywnych badań. Właściwości metaboliczne normalnych komórek różnią się znacznie od komórek nowotworowych, dlatego stan metaboliczny szybko rozmnażających się iPS i CSC może przyczynić się do ich właściwości fizjologicznych i ostatecznych funkcji. Niemniej jednak, różnice pomiędzy iPS i CSC pozostają słabo zdefiniowane.

## Uzyskane wyniki

### Praca #1

Celem niniejszej pracy było zbadanie progresji cyklu komórkowego poprzez tzw. punkt R (ang. *Restriction Point, R-point*) w różnych typach komórek (IPS, komórki nowotworowe, CSC oraz komórki normalne). Skupiono się na oznaczaniu poziomu 6-fosfofrukto-2-kinazy / fruktozo-2,6-bifosfatazy, izoformy 3 (PFKFB3) i 6-fosfofrukto kinazy-1 (PFK1) w różnych fazach cyklu komórkowego. PFK1, po uprzedniej aktywacji przez produkt PFKFB3: fruktozo-2,6-bifosforan (F2,6BP), odgrywa kluczową rolę we wczesnych etapach glikolizy, która jest szczególnie ważna dla komórek przechodzących przez fazę G1 cyklu komórkowego.

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste zostały przeze mnie indukowane z ludzkich fibroblastów skórnych za pomocą retrowirusowej transdukcji następującymi czynnikami transkrypcyjnymi: Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc. W celu zwiększenia wydajności procesu reprogramowania, transdukowane fibroblasty hodowałem początkowo w warunkach hipoksji (5% O<sub>2</sub>). Otrzymane w ten sposób komórki iPS były wykorzystywane także w pracach: 1, 4, 5 oraz 6. W celu porównania komórek iPS z komórkami CSC wybrano trzy nowotworowe linie komórkowe (SKBR 3, MDAMB 468 oraz BT 474) z których następnie, po uprzednim wyznakowaniu odpowiednimi markerami powierzchniowymi (CD24, CD44) oraz Aldeofluorem<sup>®</sup>, wyizolowano komórki CSC.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że badane typy komórek różnią się regulacją cyklu komórkowego na poziomie punktu R, w którym PFKFB3 jest jednym z kluczowych enzymów, biorącym równocześnie udział w glikolizie. W pracy wykazano, że poziom białka PFKFB3 i ekspresja genu kodującego to białko jest najwyższa w komórkach CSC, a najniższa w iPS oraz w komórkach normalnych. Jednocześnie zaobserwowano, iż komórki CSC, komórki normalne oraz iPS mają obniżoną ekspresję genu PFK1 w porównaniu z komórkami nowotworowymi. Badania wykazały również, że komórki nowotworowe oraz komórki iPS w warunkach hipoksji (5%) zmieniają ekspresję PFKFB3 i PFK1, w taki sposób, że bardziej przypominają one komórki CSC (podwyższona ekspresja PFKFB3, obniżona ekspresja PFK1). Zbadano także wpływ zahamowania aktywności PFKFB3 przy użyciu inhibitora 3PO na progresję cyklu komórkowego. Wyniki wykazały, że zahamowanie funkcji PFKFB3 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 w komórkach nowotworowych oraz w fibroblastach, ale nie w komórkach iPS. W pracy sprawdzono także efekt zahamowania glikolizy na poziom ekspresji PFKFB3 oraz ATP w komórkach rakowych, iPS oraz

fibroblastach. Po 24 h inkubacji z 10 mM 2-deoksy-D-glukozą (2-DG) ekspresja PFKFB3 zmaląła. Niski endogenny poziom PFKFB3 w nietraktowanych komórkach iPS oraz fibroblastach uniemożliwiło wysunięcie wniosku, że inhibicja glikolizy w tych komórkach wpływa także na ekspresję PFKFB3. Zaobserwowano również, że zahamowanie glikolizy za pomocą 2-DG spowodowało ~ 30% obniżenie stężenia ATP w komórkach nowotworowych, podczas gdy w komórkach iPS i fibroblastach spadek ten był nieznaczny. W pracy sprawdzono także efekt wyciszenia genu kodującego PFKFB3 na aktywność glikolityczną komórek poprzez pomiar stężenia mleczanu. Podobnie jak w przypadku inhibitora 3PO, tak samo siRNA wyciszające PFKFB3 powodowało znaczący spadek poziomu mleczanu w komórkach nowotworowych, umiarkowany spadek w komórkach iPS oraz brak efektu we fibroblastach. Stężenie mleczanu było jednak we wszystkich przypadkach wyższe, niż to obserwowane po zahamowaniu glikolizy poprzez 2-DG.

Podsumowując, w przedstawianej pracy zaproponowano poziom ekspresji PFKFB3 jako marker do rozróżniania iPS od CSC, oraz CSC od komórek nowotworowych. Możliwość odróżnienia CSC od komórek nowotworowych i iPS poprzez ekspresję PFKFB3 oraz PFK1 zwiększa szansę klinicznego zastosowania terapii opartych na komórkach macierzystych oraz umożliwia bardziej precyzyjne wykrywanie nowotworowych komórek macierzystych. Dodatkowo, przeprowadzona analiza podobieństw i różnic między CSC i iPS stanowi ważną część badań, które mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmów związanych z regulacją cyklu komórkowego oraz glikolizą, a także przyczynić się do poznania przyczyn nowotworzenia w tkankach pochodzących od iPS i tym samym prowadzić do zmniejszenia ryzyka ich powstawania.

## **Praca #2**

Część moich badań dotyczyła także szlaku Akt w macierzystych komórkach nowotworowych. Akt jest serynowo-treoninową kinazą białkową, odgrywającą kluczową rolę w szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). Akt pełni istotną funkcję w regulacji procesów związanych ze wzrostem, metabolizmem, przeżyciem i proliferacją komórek. Sądzi się, że Akt przyczynia się do progresji nowotworów przez hamowanie apoptozy, promowanie odpowiednich zmian w metabolizmie i proliferacji komórek oraz regulowanie ich zdolności do migracji i inwazji.

Celem pracy #2 było określenie wpływu, jaki odgrywa wewnątrzkomórkowa lokalizacja Akt-1 na utrzymanie macierzystości komórek nowotworowych. Pomimo że kinaza Akt-1 nie posiada sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS), (albo pozostaje ona jeszcze nieznana); może



ona być transportowana do jądra. Wiadomo także, że Akt-1 wysyłane jest do jądra komórkowego po stymulacji różnymi czynnikami, (np. czynnikami wzrostu) które inicjują ten proces [12-15]. Do badań, podobnie jak w pracy #1, wykorzystano komórki CSC wyodrębnione z populacji z komórek SKBR 3 oraz MDAMB 468. Akt-1 wprowadzano do jąder komórek za pomocą transfekcji chemicznej.

W pracy zaobserwowano, że poziom jądrowego Akt-1 w transfekowanych liniach komórkowych raka piersi (SKBR 3 i MDAMB 468) powoduje zwiększenie się populacji komórek CSC o wysokiej ekspresji dehydrogenazy aldehydowej ALDH-1. Komórki ALDH-1<sup>+</sup> wykazywały również fenotyp typowy dla komórek macierzystych raka piersi (CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>). Podobne zjawisko zaobserwowano, kiedy transfekowane komórki raka piersi hodowano w nieadhezyjnych warunkach (hodowla komórek w zawiesinie sprzyja formowaniu tzw. mammosfer i jest często stosowana w celu wzbogacenia hodowli o komórki CSC). Wykazano także, że Akt-1 po przetransportowaniu do jądra komórkowego zwiększa populację komórek CSC za pomocą regulacji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i p27<sup>kip1</sup>. W pracy pokazano również, że zwiększenie populacji komórek CSC poprzez zwiększenie ilości jądrowego Akt-1 jest procesem odwracalnym w momencie zastosowania specyficznego inhibitora Akt-1, tricitiribiny, zarówno w transfekowanych adherentnych jak i w nieadherentnych (mammosferach) komórkach raka piersi.

W celu określenia roli jądrowego Akt-1 w mechanizmie zwiększania liczebności komórek CSC zbadano ekspresję podstawowych markerów pluripotencjalności: Oct4, Sox2, Klf4, Nanog i cMyc. Wykazano, że Akt-1 powoduje zwiększenie macierzystości poprzez regulowanie i/lub stabilizację powyższych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za reprograming komórkowy. W badaniach zaobserwowano zwiększoną ekspresję białek Oct3/4, cMyc, Nanog i Sox2 zarówno w komórkach Akt typu dzikiego (WT), jak również w komórkach Akt-NLS, w porównaniu z komórkami kontrolnymi - nietransfekowanymi. Różnice między komórkami Akt WT i Akt-NLS zaobserwowano również na poziomie mRNA. Komórki Akt WT wykazały zwiększoną ekspresję mRNA dla Oct4, cMyc, Nanog i Sox2, podczas gdy komórki Akt-NLS wykazały znaczące zwiększenie ekspresji tylko w przypadku cMyc. Aby potwierdzić funkcjonalne aspekty różnic w poziomie markerów macierzystości, przeprowadzono dodatkowo test klonogenności potwierdzający, że komórki z transfektowanym Akt-NLS mają znacznie większą zdolność do tworzenia kolonii. Wyniki wykazały również, że komórki transfekowane Akt-NLS charakteryzują się krótszą fazą G0/G1 cyklu komórkowego i zwiększonym odsetkiem komórek w fazie G2.

Podsumowując, przedstawione w pracy #2 badania potwierdziły, że szlak PI3K/Akt jest ważny dla utrzymania macierzystości komórek, a także wykazały, że jądrowe Akt-1 odgrywa kluczową rolę zarówno w utrzymaniu macierzystości komórek CSC, jak również w ich proliferacji. Dalsze badania nad jądrowym Akt-1 oraz szlakiem PI3K/Akt mogą doprowadzić do opracowania bardziej selektywnych metod wykrywania i eliminowania CSC i tym samym znaleźć zastosowanie w onkologii.

### **Praca #3**

LCO (*ang. Luminescent Conjugated Oligothiophenes*) są związkami o wysokiej fluorescencji i fotostabilności, a także czułości i selektywności względem niektórych biocząsteczek [16]. LCO stanowią nową klasę związków na bazie tiofenu, składających się z długiego szkieletu oraz sprzężonych do niego hydrofobowych grup funkcyjnych. Oligotiofeny są z natury nietoksyczne, co sprawia, że nadają się do barwienia biomolekuł i mogą być użyte w eksperymentach związanych z obrazowaniem komórkowym [17]. Ostatnie badania wykazały, że modyfikacje łańcuchów bocznych w oligotiofenach mogą być wykorzystane w bezpośrednim znakowaniu cząsteczek biologicznych, takich jak nukleozydy czy oligonukleozydy [18,19]. Oprócz możliwości znakowania oligonukleotydów, odpowiednio zmodyfikowane LCO selektywnie i specyficznie łączą się z agregatami białkowymi związanymi z niektórymi chorobami takimi jak choroby prionowe, czy choroba Alzheimera [20-22].

Celem pracy #3 było scharakteryzowanie nowych pochodnych LCO, które mogą zostać wykorzystane do selektywnego znakowania komórek, w szczególności komórek nowotworowych oraz nowotworowych komórek macierzystych w heterogennej populacji komórkowej. We współpracy z grupą prof. P. Nilssona, odpowiedzialną za syntezę związków, przetestowano kilkanaście rodzajów LCO (głównie pentamerów) oraz kilkanaście linii komórkowych; zarówno nowotworowych, jak i normalnych. Przebadane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej linie komórkowe znakowane związkami LCO wykazują różny stopień zabarwienia. Co ciekawe, zdecydowana większość przebadanych związków nie barwi fibroblastów. Na uwagę zasługuje również LCO z metylowaną resztą imidazolową podstawioną do szkieletu tiofenu (p-HTMI). W przeciwieństwie do pozostałych LCO, związek ten barwi komórki rakowe w różnym stopniu - w zależności od linii komórkowej. Co więcej, barwienie za pomocą p-HTMI zależy od ekspresji białka p53. W pracy wykazano również, że znakowanie niektórych linii komórkowych za pomocą p-HTMI oraz p-HTAA (*polythiophene acetic acid*)

charakteryzowało się tym, że około 1–2 % komórek wykazywało silniejszy sygnał fluorescencji niż pozostałe komórki. Miało to miejsce głównie w przypadku linii komórkowych raka piersi (SKBR-3, MCF-7), a także raka jelita grubego (HCT-116) sugerując, że mocniej wyznakowane komórki mogą być subpopulacją komórek CSC. Niestety nie udało się jednoznacznie określić czy komórki te rzeczywiście posiadają właściwości komórek macierzystych.

Podsumowując, w pracy wykazano, że związki LCO nadają się do znakowania fluorescencyjnego komórek, a barwienie to jest różne w zależności od typu komórek. Kilka z przebadanych związków wykazało zdolność barwienia rzadkich subpopulacji komórkowych, co sprawia, że mogą stanowić one interesujące narzędzie do specyficznego barwienia komórek CSC. Odkrycie takie może znacząco wpłynąć na dalsze badania w dziedzinie biologii komórek macierzystych, szczególnie tych nowotworowych, jednakże potrzebne są dodatkowe eksperymenty dla potwierdzenia tych obserwacji.

#### **Praca #4**

W kolejnych pracach skupiałem się na bardziej praktycznych zastosowaniach komórek iPS, tj. na różnicowaniu ich do wybranych typów komórek, m.in. do komórek nabłonkowych rogówki. Nabłonek rogówki jest „utrzymywany” przez małą pulę komórek macierzystych pochodzących z rąbka rogówki. Niektóre urazy lub choroby mogą powodować, iż pula tych komórek ulega wyczerpaniu, prowadząc w konsekwencji do pogorszenia widzenia. Standardowe metody leczenia obejmują autologiczną lub allogeniczną transplantację komórek macierzystych rąbka rogówki (*ang. Limbal Stem Cells, LSC*), jednak odrzucenie przeszczepu i przewlekłe stany zapalne obniżają wskaźnik sukcesu w perspektywie dłuższego czasu. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzące bezpośrednio od pacjentów otworzyły nowe możliwości w leczeniu różnych schorzeń eliminując równocześnie ryzyko immunologicznego odrzucenia. W ostatnich latach zostało opracowanych kilka metod opisujących różnicowanie komórek iPS do nabłonka rogówki, które opierają się na jak najdokładniejszym odwzorowaniu środowiska niszy mikrośrodowiskowej rąbka rogówki z komórkami macierzystymi. Niestety, ryzyko powstawania powikłań związane z zastosowaniem komórek iPS utrudnia w dalszym ciągu zastosowanie tych metod *in vivo*.

Celem pracy #4 było zróżnicowanie komórek iPS do komórek nabłonkowych rogówki wykorzystując do tego celu medium kondycjonowane zbierane podczas hodowli komórek stromalnych rąbka rogówki oraz żelatynę, służącą jako podłoże zastępujące kolagen typu I oraz IV. Dodatkowo, po raz pierwszy przeprowadzono badania, których celem było

opracowanie metody bezpośredniej transdiferencjacji fibroblastów do komórek nabłonkowych rogówki, pomijając pośredni stan pluripotencjalny (z komórkami IPS lub embrionalnymi komórkami macierzystymi).

Wyniki przedstawione w pracy wykazały, że różnicowanie się komórek iPS do komórek nabłonkowych rogówki jest także możliwe, gdy kolagen zastąpiony zostanie żelatyną. Komórki zróżnicowane w ten sposób z komórek iPS wykazują kształt komórek nabłonkowych, jak również ekspresję ich podstawowych markerów takich jak:  $\Delta$ Np63, CK3, CK12, C/EBP $\delta$ , ITF2, ABCG2 oraz Pax6. Ze względu na czasochłonność metody oraz niecałkowity zanik macierzystości w komórkach, postanowiono opracować alternatywną metodę polegającą na bezpośrednim różnicowaniu fibroblastów do komórek nabłonkowych rogówki. W celu dokonania transdiferencjacji, fibroblasty zostały transdukowane specjalnie przygotowanymi lentiwirusami kodującymi trzy geny (czynniki transkrypcyjne) ważne w rozwoju rąbka nabłonka rogówki:  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TCF4 i C/EBP $\delta$ , a także Oct4 oraz Klf4. Już po upływie 7 dni hodowli komórek w odpowiedniej pożywce, wykazywały one morfologię komórek nabłonka rogówki oraz podwyższoną ekspresję ich markerów: CK3, CK12,  $\Delta$ Np63, C/EBP $\delta$  oraz TCF4. Po upływie kolejnych siedmiu dni ekspresja wyżej wymienionych czynników jeszcze bardziej wzrosła.

Podsumowując, przedstawione wyniki potwierdzają, że komórki nabłonkowe rogówki mogą zostać otrzymane na drodze różnicowania komórek iPS z wykorzystaniem podłoża pokrytego żelatyną oraz odpowiedniego medium kondycjonowanego. Dodatkowo, komórki takie można również otrzymać poprzez podwyższenie ekspresji kilku czynników transkrypcyjnych we fibroblastach. Przedstawiona metoda jest zatem pierwszym krokiem na drodze do tworzenia komórek nabłonkowych rogówki z wykorzystaniem transdiferencjacji. W dalszym ciągu konieczne jest jednak dopracowanie opisanej metody, m.in. aby zapewnić zróżnicowanie się wszystkich komórek w tym samym stopniu. Konieczne jest również przeprowadzenie dodatkowych testów w celu dokładniejszego scharakteryzowania otrzymanych komórek.

## **Praca #5**

Równoczesne zastosowanie komórek macierzystych oraz odpowiednich biomateriałów uważane jest obecnie za perspektywiczny kierunek badań w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, w szczególności w inżynierii tkankowej serca. Od wielu lat trwają intensywne badania nad wykorzystaniem rusztowań mogących pomóc dostarczyć komórki w uszkodzony region serca, a następnie wesprzeć jego regenerację.

Celem pracy było stworzenie nowego, elektroaktywnego rusztowania na potrzeby inżynierii tkankowej serca, zapewniającego biomimetyczną, 3-wymiarową strukturę sprzyjającą zagnieżdżaniu oraz różnicowaniu się komórek macierzystych. Rusztowanie takie miało również za zadanie stymulować elektrycznie i mechanicznie rosnące tam komórki macierzyste polepszając ich różnicowanie się oraz wzrost. Celem pracy była również ocena skuteczności takiego rusztowania poprzez określenie optymalnych parametrów elektromechanicznej stymulacji komórek macierzystych (iPS) oraz zbadanie, czy taka stymulacja sprzyja różnicowaniu się komórek do kardiomiocytów.

Większość aktualnych prac naukowych opisuje głównie pasywne rusztowania; w pracy #5 zademonstrowano elektroaktywny biomateriał, który dostarcza rosnącym na nim komórkom macierzystym możliwość zarówno elektrycznej, jak i mechanicznej stymulacji. Rusztowanie stworzone zostało z włókien polimeru poli(kwas mlekowy–ko-glikolowy) pokrytych przewodzącym prąd polipirolem i było w stanie dostarczać zarówno elektrycznej jak i mechanicznej (rozciąganie materiału pod wpływem napięcia elektrycznego) stymulacji różnicującym się w kardiomiocyty komórkom iPS. W celu zróżnicowania komórek iPS do kardiomiocytów, w pracy zastosowano metodę zaproponowaną przez Zhang'a [23]. Po pierwszych 4 dniach hodowli w zawiesinie (w formie tzw *embryoid bodies*), komórki posiano na rusztowania podłączone do elektrod. Za pomocą potencjostatu dokonano dwufazowej stymulacji (0,2 V oraz -1 V) o częstotliwości 0,05 Hz przez 600 sekund, co 24 godziny, przez 3 kolejne dni. Po stymulacji, komórki hodowano w odpowiedniej pożywce przez kolejne kilka/kilkanaście dni, a następnie sprawdzano żywotność komórek oraz stopień ich zróżnicowania w kardiomiocyty. Badania przeżywalności komórek nie wykazały aby rusztowanie, jak i stymulacja elektryczno-mechaniczna miały jakiegokolwiek efekt cytotoksyczny. Dodatkowo, różnicujące się komórki wykazały ekspresję podstawowych markerów kardiomiocytów: aktyniny, NKX2.5, GATA4, Myh6 oraz c-kit.

Podsumowując, w pracy zaprezentowano po raz pierwszy biomateriał zapewniający różnicującym się komórkom iPS elektryczną i mechaniczną stymulację. Stymulacja taka ma za zadanie poprawienie wydajności oraz jakości procesu różnicowania komórek macierzystych do kardiomiocytów. Mimo, iż badany biomateriał nadaje się znakomicie jako podłoże dla komórek, a zróżnicowane przez mnie komórki iPS wykazywały cechy kardiomiocytów, potrzebne są dodatkowe badania, aby otrzymać w pełni funkcjonalne komórki mięśnia sercowego gotowe na ewentualne testy na modelach zwierzęcych.

## Praca #6

Jak już wspomniano podczas omawiania pracy #5, terapia komórkowa jest obiecującym podejściem do leczenia pacjentów z zawałem mięśnia sercowego. Aktualne terapie komórkowe obejmują bezpośrednie wstrzyknięcie komórek do uszkodzonej tkanki serca w celu indukcji regeneracji i przywrócenia jego funkcji. Niestety, niesprzyjające środowisko oraz śmierć komórek na drodze *anoikis* (rodzaju apoptozy) mocno obniżają wydajność takiego podejścia. W ostatnim czasie coraz większym zainteresowaniem cieszą się alginianowe mikrosfery wykorzystywane do enkapsulacji komórek w celu dostarczenia ich do organizmu podczas terapii komórkowej. Większość z tych metod wykorzystująca alginiany nie jest do końca wystandaryzowana, co rodzi konieczność wielu czasochłonnych i kosztownych badań. Dodatkowo, mikrosfery zbudowane wyłącznie z alginianu charakteryzują się niską biodegradowalnością oraz uniemożliwiają odpowiednią komunikację między enkapsulowanymi komórkami, a otoczeniem.

Celem pracy #6 było stworzenie mikrosfer na podstawie parametrów otrzymanych z symulacji dokonanych przez model matematyczny, określający optymalne parametry syntezy mikrosfer, a następnie enkapsulacja komórek iPS, kardiomiocytów oraz komórek śródbłonka pochodzących z krwi (BOEC). Skonstruowany model matematyczny posłużył do przewidywania wpływu składu chemicznego (stosunku dwóch polimerów), szybkości przepływu, odległość dyszy od powierzchni cieczy na wielkość i kształt mikrosfer - dwóch parametrów mających kluczowy wpływ na przeżywalność enkapsulowanych komórek oraz szybkość degradacji mikrosfer.

W pracy wykazano, że dodatek kolagenu typu I do alginianowych mikrosfer poprawia ich biokompatybilność względem komórek iPS, kardiomiocytów oraz komórek BOEC poprzez polepszenie dyfuzji między środowiskiem zewnętrznym, a wnętrzem mikrosfer. Jak zaobserwowano w pracy, dodatek kolagenu prowadzi dodatkowo do szybszej degradacji mikrosfer, a tym samym do większej kontroli nad procesem uwalniania komórek po ewentualnym dostarczeniu ich do organizmu. Przeżywalność wszystkich typów enkapsulowanych komórek po sześciu dniach wynosiła nie mniej niż 80%. Wykazano także, że optymalnymi mikrosferami dla komórek BOEC produkującymi GFP oraz uwalniającymi do środowiska czynnik VIII były mikrosfery o składzie: 50% kolagen, 50% alginian. Co więcej, kardiomiocyty oraz komórki iPS enkapsulowane w mikrosferach o takim składzie wykazywały wysoką przeżywalność.

Podsumowując, przedstawiony w pracy model matematyczny jako narzędzie predykcyjne do określenia wielkości mikrosfery i ich kształtu zminimalizował potrzebę kosztownych i

czasochłonnych eksperymentów dostarczając niezbędnych parametrów do budowy mikrosfer dla kardiomiocytów, komórek iPS oraz BOEC. Testy przeprowadzone na enkapsulowanych komórkach wykazały że dodatek kolagenu do alginianu znacząco poprawia przeżywalność, jak również wymianę substancji między enkapsulowanymi komórkami, a środowiskiem zewnętrznym. Praca ta dostarcza ważnego narzędzia do określania zależności typu struktura/własności mikrosfer do enkapsulowania komórek ułatwiając tym samym przyszłe badania nad terapią komórkową podczas leczenia zawałów serca u ludzi.

## **Podsumowanie**

Zarówno macierzyste komórki nowotworowe, jak i indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste charakteryzują się zdolnością do samoodnowy oraz do nowotworzenia. Zrozumienie molekularnych mechanizmów tych procesów w komórkach iPS oraz CSC jest ważnym krokiem w rozwoju bardziej skutecznych metod eliminacji macierzystych komórek nowotworowych, a także zapewnić w przyszłości możliwość bezpieczniejszego wykorzystania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Przedstawione w pracach #1 i #2 wyniki posiadają potencjał do wyjaśnienia roli czynników odpowiedzialnych za procesy samoodnawiania, regulacji cyklu komórkowego i nowotworzenia; zarówno w macierzystych komórkach nowotworowych, jak i w komórkach iPS. Poszerzenie wiedzy na temat regulacji wspomnianych procesów komórkowych oraz roli, jaką w nich odgrywają AKT-1 oraz PFKFB3 może dostarczyć istotnych informacji o fizjologii komórek CSC oraz iPS. Uzyskane wyniki mogą również okazać się przydatne w rozwoju strategii terapeutycznych przeciwko macierzystym komórkom nowotworowym charakteryzującym się wysoką opornością na radio- i chemioterapię; np. poprzez opracowanie specyficznych markerów prognostycznych. Pomocne w tym celu mogą okazać się również opisane w pracy #3 związki LCO, pozwalające na wykrywanie rzadkich populacji komórkowych. Wyniki przedstawione w pracach #4, #5 oraz #6 zwracają z kolei uwagę na ogromny potencjał jaki niosą ze sobą komórki iPS, w szczególności gdy rozpatrywane są jako narzędzie dla medycyny regeneracyjnej. Prace te dostarczają równocześnie kluczowych informacji na temat efektywniejszych metod różnicowania komórek macierzystych do poszczególnych typów komórek, takich jak komórki mięśnia serca, czy komórki nabłonka rogówki. Podkreślić należy również, że praca #4 jako pierwsza opisuje metodę bezpośredniego różnicowania fibroblastów do komórek nabłonka rogówki, co może przyczynić do rozwoju kolejnych tego typu metod, a tym samym pozwoli na szybsze zastosowanie transdiferencjacji w terapiach komórkowych.

## Piśmiennictwo

1. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, et al. (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27: 743-745.
2. Gutierrez-Aranda I, Ramos-Mejia V, Bueno C, Munoz-Lopez M, Real PJ, et al. (2010) Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection. *Stem Cells* 28: 1568-1570.
3. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
4. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, et al. (2008) Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med* 14: 450-460.
5. Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, Pocar P, Mustafa T, et al. (2008) Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56: 165-180.
6. Wasik AM GJ, Pantovic A, Cieślak-Pobuda A, Asgari HR, Bundgaard-Nielsen C, Rafat M, Dixon IMC, Ghavami S, Łos MJ. (2014) Reprogramming and carcinogenesis - parallels and distinctions. *Int Rev Cell Mol Biol* 308.
7. Farahani E PH, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao RK, Batakis P, Wiechec E (2014) Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* 2014 35.
8. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, et al. (2011) MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 29: 1661-1671.
9. Ribatti D (2012) Cancer stem cells and tumor angiogenesis. *Cancer Lett* 321: 13-17.
10. Yamanaka S (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137: 13-17.
11. Ghule PN, Medina R, Lengner CJ, Mandeville M, Qiao M, et al. (2011) Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells. *J Cell Physiol* 226: 1149-1156.
12. Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, et al. (2003) Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol* 196: 79-88.
13. Leininger GM, Backus C, Uhler MD, Lentz SI, Feldman EL (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons. *FASEB J* 18: 1544-1546.
14. Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA (1997) Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem* 272: 30491-30497.
15. Ouyang YB, Zhang XH, He QP, Wang GX, Siesjo BK, et al. (2000) Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma. *Brain Res* 876: 191-195.
16. Barbarella G, Melucci M, Sotgiu G (2005) The versatile thiophene: An overview of recent research on thiophene-based materials. *Advanced Materials* 17: 1581-1593.
17. Palama I, Di Maria F, Viola I, Fabiano E, Gigli G, et al. (2011) Live-cell-permeant thiophene fluorophores and cell-mediated formation of fluorescent fibrils. *J Am Chem Soc* 133: 17777-17785.



18. Capobianco ML, Barbarella G, Manetto A (2012) Oligothiophenes as Fluorescent Markers for Biological Applications. *Molecules* 17: 910-933.
19. Capobianco ML, Naldi M, Zambianchi M, Barbarella G (2005) Oligothiophene phosphoramidites for oligonucleotide labelling. *Tetrahedron Letters* 46: 8181-8184.
20. Aslund A, Sigurdson CJ, Klingstedt T, Grathwohl S, Bolmont T, et al. (2009) Novel pentameric thiophene derivatives for in vitro and in vivo optical imaging of a plethora of protein aggregates in cerebral amyloidoses. *ACS Chem Biol* 4: 673-684.
21. Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Heikenwalder M, Manco G, et al. (2009) De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 304-309.
22. Nilsson KP, Joshi-Barr S, Winson O, Sigurdson CJ (2010) Prion strain interactions are highly selective. *J Neurosci* 30: 12094-12102.
23. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, et al. (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104: e30-41.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora**

Głównym tematem moich zainteresowań naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora była odpowiedź komórkowa na promieniowanie jonizujące. Badania w tym zakresie rozpocząłem jeszcze w trakcie studiów magisterskich, odbywając praktyki, a następnie wykonując pracę magisterską w Zakładzie Radiobiologii Klinicznej i Doświadczalnej Centrum Onkologii w Gliwicach pod opieką prof. Joanny Rzeszowskiej. Wykonane wówczas eksperymenty posłużyły jako punkt wyjścia dla przyszłych badań w trakcie studiów doktoranckich. W swojej pracy doktorskiej skupiałem się na roli jaką pełnią w komórkach nowotworowych polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) oraz reaktywne formy tlenu. Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań było scharakteryzowanie procesów wolnorodnikowych zachodzących w komórkach, pod wpływem promieniowania jonizującego; w szczególności procesów związanych z indukcją i zanikaniem reaktywnych form tlenu i azotu, naprawą DNA, śmiercią komórkową oraz sprawdzenie, czy przebieg tych procesów zależy od aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy)-1.

Prowadzone badania obejmowały m.in. analizę kinetyki aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego, analizę kinetyki naprawy uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem jonizującym w komórkach z obniżoną aktywnością PARP-1, analizę poziomu mikrojąder, analizę zmian w cyklu

komórkowym, porównywanie odsetka komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych po ekspozycji na promieniowanie jonizujące, analizę zmian aktywności wybranych kaspaz, analizę zmian poziomu wewnątrzkomórkowego ATP, analizę zmian w poziomie reaktywnych form tlenu, analizę wpływu inhibicji I kompleksu mitochondrialnego, porównanie zmian potencjału mitochondrialnego oraz masy mitochondriów w komórkach oraz analizę zmian w poziomie tlenku azotu po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące.

Równoległe do badań eksperymentalnych, pracowałem także nad stworzeniem modelu matematycznego opisującego proces indukcji oraz zanikania reaktywnych form tlenu po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące. Model skonstruowany został na podstawie własnych danych eksperymentalnych otrzymanych w trakcie wykonywania badań i dał (do pewnego stopnia) możliwość symulacji zachowania komórek w warunkach innych, niż te sprawdzane przeze mnie w laboratorium.

Część prowadzonych przeze mnie badań dotyczyła również tzw. efektu sąsiedztwa (*ang. bystander effect*). Efekt sąsiedztwa wywołany promieniowaniem jonizującym jest dobrze znanym zjawiskiem, które polega na indukowaniu uszkodzeń cytogenetycznych, apoptozy oraz szeregu zmian biochemicznych w komórkach nienapromieniowanych w odpowiedzi na sygnały wysłane z komórek napromieniowanych. Ponieważ komunikacja między napromieniowanymi i nienapromieniowanymi komórkami może być wzajemna, w badaniach skupiałem się na procesach komórkowych zachodzących w obu rodzajach komórek tj. na analizie poziomu mikrojąder, apoptozie, zmianach poziomu reaktywnych form tlenu, a także na oznaczaniu zmian potencjału mitochondrialnego. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że oprócz klasycznego efektu sąsiedztwa, w którym komórki napromienione wysyłają sygnały komórkom nienapromienionym (wywołując m.in. ich śmierć), ma również miejsce sytuacja odwrotna, w której nietraktowane komórki wpływają pozytywnie na komórki napromienione. Jak pokazują wyniki, w obu tych procesach ważną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu.

### **Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

Po uzyskaniu stopnia doktora swoje zainteresowania skupiłem głównie na problemach związanych z otrzymywaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, ich różnicowaniem do poszczególnych tkanek oraz na nowotworowych komórkach macierzystych. Mimo to, przez pewien czas kontynuowałem badania związane z reaktywnymi formami tlenu i śmiercią komórkową. W szczególności tej ostatniej poświęciłem więcej czasu uczestnicząc w badaniach nad apoptyną (białko zdolne do

selektywnej indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych) oraz salinomycyną (naturalny związek organiczny o właściwościach cytostatycznych).

Ważną częścią mojej działalności naukowej stanowiły również badania nad zastosowaniem pochodnych oligotiofenów (LCO, *luminescent conjugated oligothiophenes*) w selektywnym znakowaniu komórek nowotworowych (w tym nowotworowych komórek macierzystych), oraz poszukiwanie czynników molekularnych, do których wiążą się badane LCO. Mimo, iż nie udało się jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, który z testowanych związków wykazuje zdolności do selektywnego znakowania komórek CSC, odkryto ciekawe właściwości związków PTAA (*polythiophene acetic acid*), p-HTIM (*imidazole functionalized pentameric oligothiophene*) oraz p-HTMI (*methylated imidazole functionalized pentameric oligothiophene*) polegające na specyficznym znakowaniu komórek czerniaka, pozwalając na odróżnienie ich od komórek normalnych (fibroblastów).

Począwszy od 2016 roku, kiedy to rozpocząłem pracę na Uniwersytecie w Oslo, kontynuuję badania w dziedzinie komórek iPS, otrzymywanych przeze mnie z komórek szpiku kostnego pacjentów z chorobami krwi. W celu poznania mechanizmów powstawania chorób takich jak ostra białaczka szpikowa, czy zespół mielodysplastyczny, komórki te są różnicowane do komórek hematopoetycznych (CD34+), a następnie do monocytów, erytrocytów oraz limfocytów T. Dodatkowo, aby lepiej scharakteryzować proces hematopoezy, w swoich badaniach nad komórkami iPS wykorzystuję system CRISPR/Cas9 pozwalający na naprawę mutacji genów związanych z wyżej wymienionymi schorzeniami. Prowadzone obecnie przeze mnie badania mają na celu dokładniejsze poznanie zarówno genetycznych, jak i epigenetycznych czynników związanych z niewłaściwą hematopoezą. We wrześniu 2016, w ramach programu “*Scientia*” - *EU Marie Curie Postdoctoral Fellowship in Health Science* rozpocząłem projekt zatytułowany “*DNMT3A and DNMT3B targeted mutations in hESC - interplay between non-coding RNAs and DNA methylation during human hematopoiesis*”. W projekcie tym badam rolę jaką pełnią mutacje wprowadzone do dwóch DNA metylotransferaz: DNMT3A and DNMT3B, w ludzkich macierzystych komórkach embrionalnych w procesie tworzenia krwi, a także rolę jaką pełnią w tym procesie niekodujące RNA, takie jak miRNA, czy piRNA.

**Inne publikacje naukowe (niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego, będącego podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego) w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR):**

1. Ryabokon NI, **Cieślak-Pobuda A**, Rzeszowska-Wolny J, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity affects its subcellular localization and DNA strand break rejoining. Acta Biochim Pol 2009; 56, 243-8. [IF=1.262, MNiSW = 15]
2. **Cieślak-Pobuda A**, Saenko Y, Rzeszowska-Wolny J, PARP-1 inhibition induces a late increase in the level of reactive oxygen species in cells after ionizing radiation. Mutat Res 2012; 732, 9-15. [IF= 3.902, MNiSW = 35]
3. Widel M, Przybyszewski WM, **Cieślak-Pobuda A**, Saenko YV, Rzeszowska-Wolny J, Bystander normal human fibroblasts reduce damage response in radiation targeted cancer cells through intercellular ROS level modulation. Mutat Res 2012; 731, 117-24. [IF=3.902, MNiSW = 35]
4. **Cieślak-Pobuda A**, Los MJ, Prospects and limitations of "Click-Chemistry"-based DNA labeling technique employing 5-ethynyl-2'deoxyuridine (EdU). Cytometry A 2013; 83, 977-8. [IF=3.066, MNiSW = 30]
5. Jangamreddy JR, Ghavami S, Grabarek J, Kratz G, Wiechec E, Fredriksson BA, **Cieślak-Pobuda A**, et al., Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells. Biochim Biophys Acta 2013; 1833, 2057-69. [IF= 5.297, MNiSW = 35]
6. Saenko Y, **Cieślak-Pobuda A**, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J, Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation. Radiat Res 2013; 180, 360-6. [IF=2.445, MNiSW = 30]
7. Chaabane W, **Cieślak-Pobuda A**, El-Gazzah M, Jain MV, Rzeszowska-Wolny J, Rafat M, et al., Human-Gyrovirus-Apoptin Triggers Mitochondrial Death Pathway-Nur77 is Required for Apoptosis Triggering. Neoplasia 2014; 16, 679-93. [IF= 4.252, MNiSW = 35]
8. **Cieślak-Pobuda A**, Wiechec E, Research on liver regeneration as an answer to the shortage of donors for liver transplantation. Hepato Res. 2014; 44, 944-6. [IF= 2.735 MNiSW = 20]
9. Jaksik R, Lalik A, Skonieczna M, **Cieślak-Pobuda A**, Student S, Rzeszowska-Wolny J, MicroRNAs and reactive oxygen species: are they in the same regulatory circuit? Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 2014; 764-765, 64-71. [IF=2.415 MNiSW = 25]

10. Bose T\*, **Cieślak-Pobuda A\***, Wiechec E, Role of ion channels in regulating Ca<sup>2+</sup> homeostasis during the interplay between immune and cancer cells. Cell death & disease 2015; 6, e1648. (\*autorzy dzieła pierwsze współautorstwo) [IF= 5.378 MNiSW = 35]
11. Magnusson K, Appelqvist H, **Cieślak-Pobuda A**, Back M, Kagedal B, Jonasson JA, et al., An imidazole functionalized pentameric thiophene displays different staining patterns in normal and malignant cells. Frontiers in Chemistry 2015; 3, 58.
12. Gelmi A, Zhang J, **Cieślak-Pobuda A**, Ljunngren MK, Los MJ, et al. Electroactive polymer scaffolds for cardiac tissue engineering; 2015. International Society for Optics and Photonics. pp. 94301T-94307. *Proceedings Article*
13. Magnusson K, Appelqvist H, **Cieślak-Pobuda A**, Wigenius J, Karlsson T, Los MJ, et al., Differential vital staining of normal fibroblasts and melanoma cells by an anionic conjugated polyelectrolyte. Cytometry A 2015; 87, 262-72. [IF= 3.181 MNiSW = 30]
14. Shakeri R, Hosseinkhani S, Los MJ, Davoodi J, Jain MV, **Cieślak-Pobuda A**, et al., Role of the salt bridge between glutamate 546 and arginine 907 in preservation of autoinhibited form of Apaf-1. International Journal of Biological Macromolecules 2015. [IF= 3.138 MNiSW = 25]
15. Jain MV, Shareef A, Likus W, **Cieślak-Pobuda A**, Ghavami S, Los MJ, Inhibition of miR301 enhances Akt-mediated cell proliferation by accumulation of PTEN in nucleus and its effects on cell-cycle regulatory proteins. Oncotarget 2016. [IF= 5.008 MNiSW = 40]

### **Dane bibliometryczne dorobku naukowego**

Podsumowując, mój dorobek naukowy obejmuje 24 prac opublikowanych w czasopismach z bazy JCR (w tym 21 opublikowanych po uzyskaniu tytułu doktora). Na mój dorobek naukowy składa się również 40 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Summary *impact factor* za całokształt dorobku naukowego wynosi – według listy Journal Citation Reports – **90.448 (685 punktów MNiSW)**.

Ilość cytowań oraz indeks Hirscha według bazy **Web of Science: 161 cytowań, H=7**

Ilość cytowań oraz indeks Hirscha według bazy **Scopus: 176 cytowań, H=8**

Ilość cytowań oraz indeks Hirscha według bazy **Google Scholar: 244 cytowań, H=9**

(Dane z dnia 09.01.2017)

