Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Aneta Kasza

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu prac.
   - magister biologii, 1992 r., Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ kwasu retinowego na syntezę białek ostrej fazy przez komórki wątrobiaka ludzkiego HepG2."
   - 1997 r. doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola receptorów z rodziny receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości w procesie degradacji kompleksów proteinaza/inhibitor proteinazy."

3. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Jednotematyczny cykl publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, opatrzony tytułem:

Interleukina 1 i epidermalny czynnik wzrostu regulują ekspresję genów istotnych w przebiegu stanu zapalnego i procesów nowotworowych poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego Elk-1.

b) Prace stanowiące podstawę habilitacji:

1. **Kasza A,** O'Donnell A, Gascoigne K, Zeef LA, Hayes A, Sharrocks AD (2005) The ETS-domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF. *J. Biol. Chem.* **280**: 1149-1155. **IF=5,854**
2. Wyrzykowska P, Stalińska K, Wawro M, Kochan J, **Kasza A** (2010) Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 1799(9):616-21. **IF=4,00 – Kasza A. autor korespondencyjny**
3. **Kasza A**, Wyrzykowska P, Horwacik I, Tymoszuk P, Mizgalska D, Palmer K, Rokita H, Sharrocks AD, Jura J (2010) Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of *ZC3H12A* expression. *BMC Mol. Biol.* **11**:14. **IF=3,188 – Kasza A. autor korespondencyjny**
4. Florkowska M, Tymoszuk P, Balwierz A, Skucha A, Kochan J, Wawro M, Stalinska K, **Kasza A**. (2012) EGF activates TTP expression by activation of ELK-1 and EGR-1 transcription factors. *BMC Mol. Biol.* 13(1):8. **IF:2,86– Kasza A. autor korespondencyjny**
5. **Kasza A.** (2013) IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine* – doi: 10.1016/j.cyto.2013.02.007. **IF: 3,019**

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: 18,92

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników:

Wprowadzenie:

Komórki układu immunologicznego, śródbłonka, nabłonka czy fibroblasty rozpoznają zaistniałą infekcję lub niefizjologiczne endogenne czy egzogenne czynniki za pomocą tzw. receptorów rozpoznających wzorce (PRRs, ang. pattern recognition receptors). Związanie ligandów do PRRs prowadzi do aktywacji specyficznych czynników transkrypcyjnych, które indukują ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne, takie jak interleukina-1 (IL-1) czy czynnik martwicy nowotworów (TNF) oraz czynniki ważne w odpowiedzi przeciwwirusowej, takie jak interferon α i β (IFNα i β). Pojawienie się w krążeniu lub synteza lokalna cytokin prozapalnych powoduje rozwój stanu zapalnego poprzez stymulację ekspresji wielu genów. Część z nich koduje kolejne cytokiny, takie jak interleukina 6 (IL-6), pełniąca funkcje zarówno prozapalne jak i przeciwzapalne [1-3].

Komórki syntetyzują dwie formy IL-1: α i β oraz antagonistę IL-1 (IL-1RA), który wiąże się do receptora IL-1 ale go nie aktywuje. Aktywność biologiczna IL-1α i IL-1β jest podobna, polega na stymulacji syntezy czynników prozapalnych takich jak GM-CSF, G-CSF, IL-6, IL-8, TNF, tlenek azotu oraz niektórych hormonów. Podwyższony poziom IL-1 manifestuje się gorączką, bólem mięśni, bólem stawów, zmęczeniem, bólem głowy, nudnościami, obniżonym ciśnieniem, trombocytozą, neutrofilią [4]. Zarówno IL-1α jak i IL-1β są syntetyzowane w formie prekursorów. Obróbka proteolityczna obu form jest przeprowadzana przez różne enzymy, aktywowane przez różne mechanizmy. Pro-IL-1β jest aktywowana przez kaspazę-1. Proces ten zachodzi w wyspecjalizowanych kompleksach białkowych zwanych inflamasomami. W ich skład wchodzi jeden z typów PRRs (NLRs, ang. NOD-like receptors). Tak więc proces syntezy aktywnej IL-1β jest regulowany na dwóch poziomach. Pierwszym jest wspomniana indukcja ekspresji genu kodującego IL-1β. Drugim etapem regulacji jest kontrola proteolitycznej obróbki cytoplazmatycznej pro-IL-1β do aktywnej formy IL-1β. Natomiast pro-IL-1α jest przecinana przez zależne od wapnia proteazy - kalpainy. W przeciwieństwie do pro-IL-1β, prekursorowa forma IL-1α jest aktywna biologicznie. Również w przeciwieństwie do IL-1β, IL-1α pełni funkcje wewnątrzkomórkowe. Po translokacji do jądra komórkowego asocjuje z chromatyną i wpływa na transkrypcję genów regulowanych przez czynniki transkrypcyjne NFκB i AP-1 [5]. Pasywne uwalnianie w czasie nekrozy komórki IL-1α jest sygnałem generującym odpowiedź zapalną, wskutek aktywacji receptora IL-1. W czasie apoptozy IL-1α pozostaje w pęcherzykach apoptotycznych i w związku z tym nie indukuje odpowiedzi zapalnej [6]. Ostatnie doniesienia sugerują iż IL-1α może być także aktywnie wydzielana z komórek wskutek aktywacji receptorów z rodziny PRRs [7, 8]. Aktywna IL-1α występuje również w formie związanej do błony komórek, które ją syntetyzują [9].

Obie dojrzałe formy IL-1 oraz forma prekursorowa IL-1α wiążą się do tego samego receptora, zwanego receptorem typu I IL-1 (IL-1RI), który tworzy dimery z cząsteczką zasocjowaną z receptorem IL-1 (IL-1RAcP, ang. receptor accessory protein). Zarówno IL-1RI jak i IL-1RAcP zawierają w części cytoplazmatycznej domenę TIR. Po aktywacji receptora domena TIR rekrutuje białko MyD88, w efekcie czego dochodzi do aktywacji kinazy IRAK4, która fosforyluje kolejne kinazy IRAK – IRAK1 i IRAK2. Następnie kinazy IRAK oddysocjowują od białka MyD88 i aktywują ligazę E3 - TRAF6. TRAF6 wraz z enzymami Ubc13 i Uev1 katalizuje reakcję tworzenia łańcuchów poliubikwitynowych, z których część jest związana do TRAF6 a część pozostaje wolna. Wolne łańcuchy poliubikwitynowe aktywują kompleks kinazy TAK1 i białek z nią związanych (TAB1, TAB2 i TAB3). Kompleks ten aktywuje specyficzną kinazę fosforylującą białka inhibitorowe IκB (IKK). IKK jest kompleksem złożonym z trzech podjednostek: dwóch katalitycznych (IKKα i IKKβ) oraz regulatorowej (IKKγ zwanej również NEMO). Fosforylowany IκB jest ubikwitynowany i degradowany przez proteasom, uwalniając aktywny czynnik transkrypcyjny NFκB [4, 10].

Związanie IL-1 do IL-1RI aktywuje nie tylko czynnik transkrypcyjny NFκB. Aktywowana kinaza TAK1 fosforyluje kinazy aktywowane miogenem (MAPK, ang. mitogen-activated protein kinase) prowadząc do aktywacji kinaz JNK i p38. Fosforylacja przez IKK inhibitora NFκB (p105) prowadzi do uwolnienia oddziałującego z nim białka TPL-2 (ang. tumor progression locus-2), które z kolei aktywuje kinazy MEK1/2. W efekcie dochodzi do aktywacji kinaz ERK1/2. Kinazy ERK1/2, JNK i p38 fosforylują/aktywują między innymi czynnik transkrypcyjny Elk-1 [11].

Elk-1 jest przedstawicielem czynników transkrypcyjnych z rodziny ETS. Wszystkie białka z rodziny ETS posiadają wspólną cechę w postaci konserwatywnej domeny wiążącej DNA (od nazwy tej rodziny nazwanej domeną ETS), która wiąże się do sekwencji DNA z centralnym motywem GGA, aczkolwiek poszczególne białka z tej rodziny rozpoznają dla siebie specyficzne dłuższe sekwencje DNA. Niektóre białka z rodziny ETS regulują ekspresję genów tworząc kompleks z innym czynnikiem transkrypcyjnym – SRF (ang. serum responsive factor). Kompleks ten jest tworzony na sekwencjach zwanych SRE (ang. serum responsive elements). Białka z rodziny ETS, które oddziałują z SRF na sekwencjach SRE tworząc kompleks trójskładnikowy, zostały wyodrębnione w podrodzinę TCF (ang. ternary complex factor). Wśród białek należących do podrodziny TCF znajduje się Elk-1. Elk-1 jest fosforylowany na resztach serynowych i treoninowych przez wspomniane kinazy ERK, JNK oraz p38 [12]. Fosforylacja Elk-1 prowadzi do zmian konformacyjnych, które zwiększają powinowactwo tego białka do DNA oraz jego oddziaływanie z ko-aktywatorami (p300/CBP oraz Sur-2). Interesujący jest fakt, że fosforylacja Elk-1 jest również konieczna do jego oddziaływań z ko-represorami (Sin3A-HDAC1). Stwierdzono, że w wyniku fosforylacji Elk-1 początkowo oddziałuje z ko-aktywatorami, co prowadzi do zwiększonej transkrypcji regulowanych genów po czym dochodzi do interakcji z ko-represorami, która prowadzi

do zahamowania ich transkrypcji. Ważnym czynnikiem, który reguluje aktywność Elk-1 jest czynnik SUMO. Przyłączenie SUMO do białek jest procesem regulowanym przez specjalną grupę enzymów i jest procesem odwracalnym. W komórkach spoczynkowych Elk-1 posiada przyłączoną grupę SUMO, poprzez którą oddziałuje z deacetylazą histonową 2 (HDAC-2). W wyniku tej interakcji promotory regulowanych przez Elk-1 genów utrzymane są w stanie represji. Aktywacja kinazy ERK prowadzi nie tylko do forsforylacji Elk-1 ale również do usunięcia grup SUMO z powierzchni białka [13].

Elk-1 może być aktywowany w wyniku stymulacji komórek IL-1 i aktywacji receptora IL-1 ale główna ścieżka sygnałowa prowadząca do fosforylacji tego czynnika transkrypcyjnego jest generowana w wyniku aktywacji receptora epidermalnego czynnika wzrostu (EGF, ang. epidermal growth factor). Receptor EGF (EGFR) zwany również HER1 lub c-erbB-1 należy do nadrodziny receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, rodziny receptorów c-erbB. Poza EGFR rodzina ta obejmuje HER2 (zwany również neu lub c-erbB-2), HER3 (zwany również c-erbB-3) i HER4 (zwany również c-erbB-4). Po związaniu ligandu do EGFR następuje jego homo- lub heterodimeryzacja z białkiem z rodziny c-erbB. Proces ten aktywuje cytoplazmatyczną domenę receptora o aktywności kinazy tyrozynowej co prowadzi do fosforylacji specyficznych reszt tyrozyny w obrębie jego wewnątrzkomórkowej części. Modyfikacja ta indukuje oddziaływanie receptora z kompleksem białek Grb2/Sos, aktywację białka Ras, aktywację kinazy Raf-1 i aktywację kinaz MEK1/2. Kinazy MEK1/2 fosforylują kinazy ERK1/2, które aktywują czynnik transkrypcyjny Elk-1. Ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK nie jest jedyną ścieżką sygnałową aktywowaną przez EGFR. Również aktywacja PI3K-Akt, PLCγ, STAT3 i STAT5 jest włączana za pośrednictwem tego receptora [14].

Rozwój nowotworów, zwłaszcza nowotworów komórek nabłonkowych i komórek glejowych, często jest skorelowany z zaburzeniami aktywacji receptorów z rodziny c-erbB. Wśród najczęściej występujących nowotworów komórek nabłonka, takich jak rak okrężnicy, niedrobnokomórkowy rak płuc czy rak piersi stwierdzono zwiększoną ekspresję lub wynikającą z mutacji zwiększoną aktywność receptorów z rodziny c-erbB. Nadekspresja EGFR zidentyfikowana została w ponad 60% przypadków niedrobnokomórkowego raka płuc [15]. W komórkach raka okrężnicy często stwierdza się amplifikacje genu kodującego EGFR [16]. Niechlubną rolę EGFR, HER2 i HER3 opisano w przypadku raka piersi [17]. W ponad 60% przypadków glejaka opisano zaburzoną aktywację szlaków przekazu sygnału generowaną przez EGFR [18]. Również inne odmiany nowotworów cechują się zaburzeniami w aktywacji ścieżek sygnałowych włączanych przez receptory z rodziny c-erbB [19-21]. Prowadzi to do zwiększonej aktywacji specyficznych czynników transkrypcyjnych a w ostatecznym efekcie do zaburzonej ekspresji genów przez nie regulowanych. W kontekście rozwoju procesów nowotworowych szczególnie istotne w tej grupie są protoonkogeny, których produkty białkowe przyczyniają się do zwiększonej proliferacji komórek i zahamowania procesów apoptozy. Wskutek

zwiększonej aktywacji kaskady Ras-ERK dochodzi do zaburzeń cyklu komórkowego. Ras-ERK wpływa zarówno na zwiększoną ekspresję genów cykliny D1, D2 i D3 jak i na bezpośrednią, niezależną od cyklin, fosforylację białka retinoblastoma (pRb). Fosforylowane pRb uwalnia czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F, które włączają ekspresję genów kodujących białka związane z replikacją DNA, syntezą nukleotydów i regulacją cyklu komórkowego [22, 23].

Odpowiedź immunologiczna może przyczynić się do zahamowania progresji nowotworu. Niemniej jednak już w XIX wieku zauważono iż nowotwory często rozwijają się w miejscach, w których trwa chroniczny stan zapalny. Istnieje wiele dowodów potwierdzających istotny udział czynników prozapalnych w indukcji i rozwoju nowotworów. Cytokiny, takie jak IL-1, TNF, IL-8 i IL-6, mają istotne znaczenie w tych procesach. IL-1 może być syntetyzowana zarówno przez komórki nowotworowe jak i napływające komórki układu immunologicznego. Wpływ IL-1 na rozwój nowotworu zależy od lokalizacji komórkowej IL-1 i lokalnego stężenia wydzielanej z komórek cytokiny. Związana z błoną komórek nowotworowych IL-1α stymuluje odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym. Niskie stężenie wydzielanej cytokiny również sprzyja indukcji odpowiedzi anty-nowotworowej. Natomiast wysokie stężenie IL-1 w otoczeniu komórki rakowej przyczynia się do pogłębiania procesów prowadzących do zwiększania inwazyjności komórek nowotworowych [9]. Stwierdzono, iż działanie IL-1 promuje wzrost wielu różnego rodzaju komórek nowotworowych lub linii komórek nowotworowych a pacjenci, u których stwierdzono guzy z wysoka ekspresją IL-1 mają gorsze rokowania [24, 25]. Pro-nowotworowe działanie IL-1 opiera się na indukowaniu przez nią ekspresji genów, których produkty białkowe pełnią istotne funkcje w transformacji nowotworowej. IL-1 zwiększa ekspresję genów anty-apoptotycznych (*Bcl-XL, X-IAP, c-IAP1/2, IEX*). Stymuluje również ekspresję genów kodujących białka związane z angiogenezą takie jak HIF-1 (czynnik indukowany przez niedotlenienie), iNOS (indukowalna syntetaza tlenku azotu) czy COX-2 (cyklooxygenaza-2) [26].

Indukowane przez IL-1 zmiany prowadzące do transformacji nowotworowej mogą być wytłumaczone również w kontekście interferencji szlaków sygnałowych generowanych przez IL-1RI/IL-1RAcP z innymi szlakami sygnałowymi aktywnymi w danej komórce. Na szczególną uwagę zasługuje wpływ szlaku prowadzącego do aktywacji NFκB na aktywność białka p53. Czynnik transkrypcyjny p53 jest znanym supresorem nowotworów. Czynnik ten jest aktywowany w wyniku uszkodzeń DNA, niedotlenienia, aktywacji onkogenów. Białko p53 reguluje ekspresję genów, które mogą zainicjować zatrzymanie cyklu komórkowego lub apoptozę czy też procesów naprawy uszkodzeń DNA. Efekt biologiczny generowany wskutek aktywacji NFκB i p53 jest przeciwstawny, anty-apoptotyczny (NFκB) albo pro-apoptotyczny (p53). Stosunkowo niedawno okazało się, że ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji jednego z tych czynników równocześnie blokują aktywację

drugiego [27-31]. Na aktywność NFκB bezpośredni wpływ mają również inne czynniki transkrypcyjne. STAT3, aktywowany między innymi w wyniku działania cytokin z grupy IL-6, oddziałuje z podjednostkami p65/RelA i p50 NFκB. Interakcja ta może zachodzić w cytoplazmie, gdzie STAT3 może się związać do kompleksu NFκB-IκB powodując uwolnienie NFκB, nawet gdy ścieżka aktywacji NFκB nie została włączona. STAT3 może także oddziaływać z p65/RelA w jądrze komórkowym i przyciągać do niego acetylazę p300, która acetyluje p65/RelA prowadząc do zaburzenia oddziaływania p65/RelA z IκB a więc do przedłużonego przebywania p65/RelA w jądrze (przedłużonej ekspresji genów regulowanych przez NFκB). Poprzez istnienie tych regulacji STAT3, który jest często aktywowany w różnego rodzaju komórkach nowotworowych, uczestniczy w modyfikacji aktywności NFκB [32].

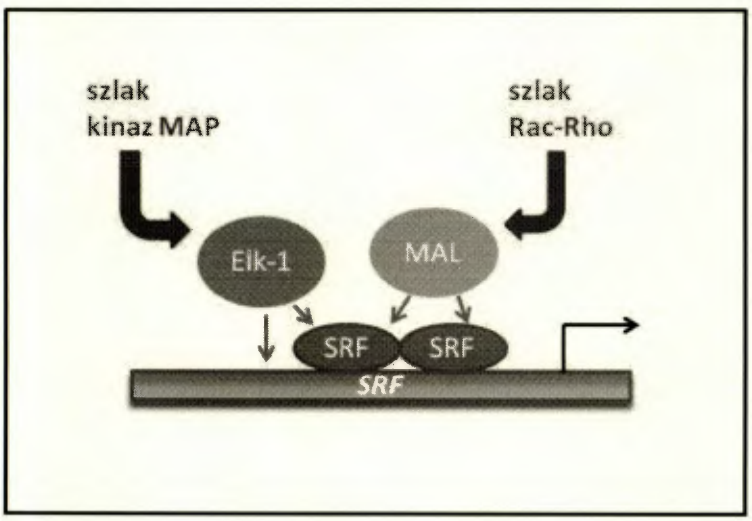
Cel naukowy:

Mediatory chronicznego stanu zapalnego mają bardzo złożony wpływ na rozwój nowotworów. Z jednej strony mogą one stymulować anty-nowotworową odpowiedź układu immunologicznego, z drugiej strony mogą stymulować procesy prowadzące do nowotworzenia i wzrostu inwazyjności komórek nowotworowych. Ostateczny efekt zależy od czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez cytokiny i inne czynniki syntetyzowane przez komórki nowotworowe i od produktów białkowych genów regulowanych przez te czynniki transkrypcyjne. Cytokiny prozapalne takie jak IL-1 i czynniki wzrostu takie jak EGF biorą udział w rozwoju i przebiegu zarówno stanu zapalnego jak i rozwoju i progresji nowotworu. Celem niniejszych prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego była charakterystyka mechanizmów regulacji ekspresji genów, istotnych w przebiegu stanu zapalnego i procesów nowotworowych, przez interleukinę 1 i epidermalny czynnik wzrostu.

Osiągnięte wyniki:

Jak już wspomniano Elk-1 reguluje ekspresję wielu genów tworząc kompleks z czynnikiem SRF. Wyniki naszych badań pokazały istnienie pętli sprzężenia zwrotnego. Pokazaliśmy iż Elk-1 w kompleksie z SRF reguluje ekspresję genu *SRF*. Wykazaliśmy również, iż związany do promotora genu *SRF*, czynnik Elk-1 współzawodniczy z koaktywatorem białka SRF, białkiem MAL, o miejsce wiązania do białka SRF. Białko MAL jest aktywowane w wyniku włączania szlaku Rac-Rho, związanego z rearanżacją filamentów aktynowych. W przypadku aktywacji kaskady kinaz MAP, związany do promotora *SRF* czynnik SRF oddziałuje z czynnikiem Elk-1. W przypadku aktywacji szlaku Rac-Rho, związany do promotora *SRF* czynnik SRF oddziałuje z ko-aktywatorem MAL (ryc. 1). Tak więc, ekspresja *SRF* jest kontrolowana przez szlaki, które są związane z regulacją różnych procesów

komórkowych. Kaskada kinaz MAP uruchamia ekspresję genów związanych z proliferacją i procesami anty-apoptotycznymi. Szlak Rac-Rho reguluje adhezję komórek, rearanżacje szkieletu aktynowego, biegunowość komórki a więc jest związany z procesami związanymi z migracją komórek. Wyniki badań nad regulacją ekspresji SRF przez kompleks Elk-1/SRF zostały przez nas opublikowane w *Journal of Biological Chemistry* [33].



Ryc. 1. Schemat regulacji ekspresji genu *SRF* przez kompleks Elk-1/SRF lub kompleks MAL/SRF w zależności od aktywacji szlaku kinaz MAP lub szlaku Rac-Rho.

Kompleks Elk-1/SRF reguluje ekspresję wielu genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (IE, ang. immediate-early). Nazwa IE wywodzi się od szybkiej kinetyki aktywacji tych genów. Wiele białek kodowanych przez geny IE to czynniki transkrypcyjne lub białka regulujące ścieżki przekazu sygnału. Wśród genów IE regulowanych przez Elk-1/SRF są geny kodujące czynniki transkrypcyjne Egr-1, Nur77 i c-Fos. Egr-1 jest zaangażowany w regulację ekspresji genów kodujących białka istotne w procesach nowotworzenia i procesach zapalnych. Egr-1 wiąże się do sekwencji regulatorowych obecnych w promotorach genów czynników wzrostu (TGFβ, PDGF, FGF-2, CTGF, VEGF), inhibitorów proteinaz (TIMP-1), proteinaz (urokinaza) a także czynników związanych z rozwojem stanu zapalnego (TNF, MCP-1, IL-1, ICAM-1) [34]. Białko c-Fos jest składnikiem czynnika transkrypcyjnego AP-1, który stymuluje ekspresję genów kodujących białka istotne w proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych [35]. Czynnik transkrypcyjny Nur77 pełni istotną funkcję w procesach proliferacji i różnicowania. W wielu różnego typu nowotworach poziom tego białka jest podniesiony [36]. Nur77 odgrywa również rolę w procesach zapalnych, gdyż aktywuje ekspresję genu kodującego indukowalną kinazę IKKi. Przyczynia się to do zwiększonej ekspresji genów kontrolowanych przez NFκB [37]. Wśród genów, których ekspresja jest regulowana przez Nur77 jest gen inhibitora plazminogenu typu 1 (PAI-1) [38]. Wykazaliśmy iż *PAI-1* jest również regulowany przez kolejny

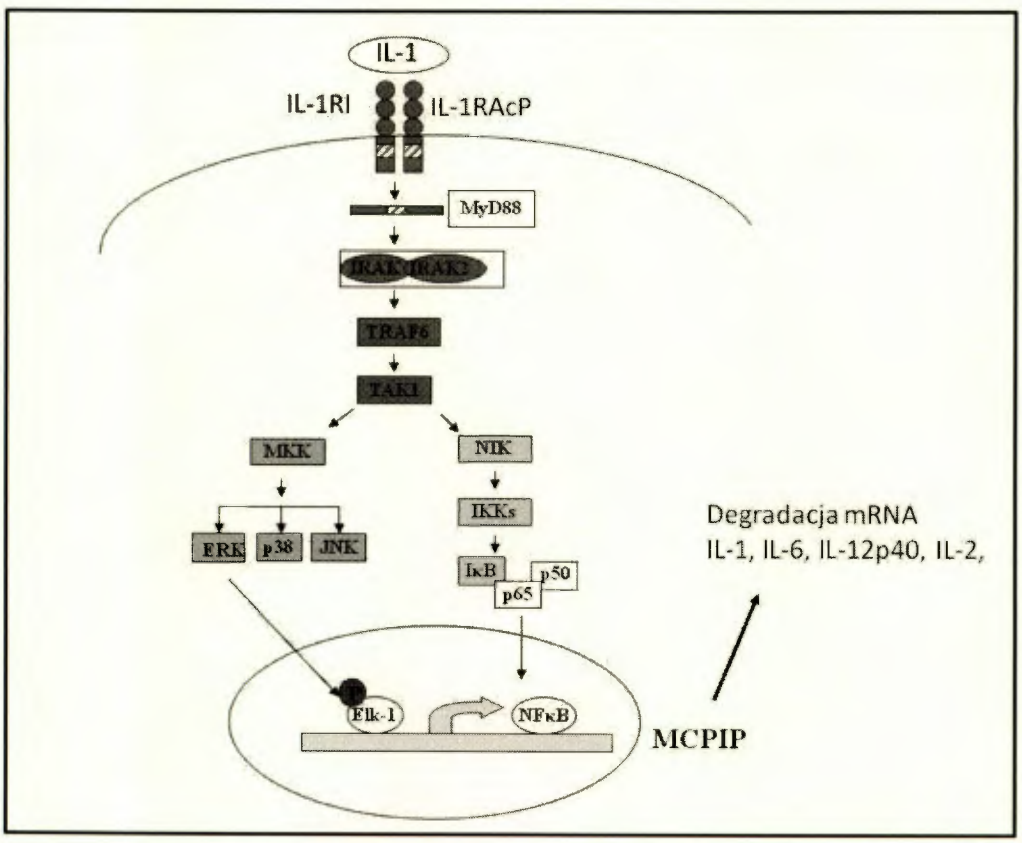
czynnik transkrypcyjny indukowany przez kompleks Elk-1/SRF, czynnik c-Fos [39]. Czynnik transkrypcyjny Elk-1 bierze również udział w bezpośredniej regulacji ekspresji genu PAI-1 w wyniku stymulacji komórek przez EGF. Opisaliśmy mechanizmy tej regulacji w pracy opublikowanej w *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* [40]. Elk-1 jest stale związany do promotora *PAI-1* ale dopiero w wyniku aktywacji kaskady kinaz MAP dochodzi do jego fosforylacji. Tak wiec nie samo związanie tego czynnika transkrypcyjnego do promotora a jego modyfikacja potranslacyjna decyduje o aktywacji ekspresji *PAI-1*. Wykazaliśmy iż Elk-1 reguluje ekspresję PAI-1 bez udziału białka SRF. Interesująca jest kinetyka przyrostu transkryptu dla PAI-1 w wyniku stymulacji linii komórkowej gruczolakoraka piersi, MCF-7, przez EGF. Maksimum indukcji występuje po 45 min stymulacji przez EGF a więc przypomina kinetykę charakterystyczną dla genów IE, pomimo iż gen *PAI-1* do tej grupy genów nie był wcześniej zaklasyfikowany. Regulacja ekspresji PAI-1 od dawna jest w centrum zainteresowania wielu grup badawczych ze względu na jego rolę w procesach związanych z przerzutowaniem komórek nowotworowych. PAI-1 jest składnikiem systemu aktywacji plazminogenu, którego funkcją jest kontrola aktywacji plazminogenu do plazminy. System ten obejmuje aktywatory plazminogenu (urokinaza (u-PA) i tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA)), oraz ich inhibitory. PAI-1 jest najbardziej efektywnym inhibitorem uPA i tPA. Białka u-PA i PAI-1 są pierwszymi zdefiniowanymi markerami prognostycznymi nowotworów piersi. Wysoki poziom tych białek koreluje ze złym rokowaniem. PAI-1 wpływa na inwazyjność komórek nowotworowych zarówno poprzez hamowanie aktywności proteolitycznej (oddziaływanie z u-PA) jak i poprzez modulację adhezji komórek (oddziaływanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej). PAI-1 odgrywa również rolę w procesach zapalnych [41-43].

Biologiczna rola Elk-1 znana była głównie w kontekście regulacji procesów związanych z proliferacją komórek w tym z proliferacją komórek nowotworowych. Jak już wspomniano wiele genów kodujących czynniki transkrypcyjne jest aktywowanych przez Elk-1 w wyniku stymulacji komórek przez mitogeny. Czynniki te biorą udział w indukcji zwiększonej syntezy transkryptów regulowanych przez nie genów. Zsyntetyzowany transkrypt służy jako matryca tak długo jak długo jest obecny w cytoplazmie. Białka biorące udział w regulacji czasu półtrwania transkryptów będą więc czynnikiem decydującym o tym jak wydajnie zostanie wykorzystany dany transkrypt oraz o tym jak szybko produkt aktywacji genu zostanie wyłączony. Zainteresował mnie udział Elk-1 w kontroli ekspresji genów kodujących białka związane z regulacją czasu półtrwania transkryptów. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń udało mi się wykazać iż Elk-1 reguluje ekspresję dwóch genów kodujących białka kluczowe w regulacji tempa degradacji mRNA cytokin prozapalnych.

Pierwszy z badanych genów, gen *ZC3H12A*, koduje MCPIP-1 (białko indukowane przez MCP-1, ang. MCP-1 inducible protein). MCPIP-1 jest jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w

regulację stanu zapalnego. Reguluje on czas półtrwania transkryptów cytokin IL-6, IL-1, IL-12p40, IL-2 a także swojego własnego transkryptu [44-46]. MCPIP-1 modyfikuje ponadto ścieżkę aktywacji przekazu sygnału generowaną przez receptory IL-1, TNF oraz receptory typu Toll poprzez usuwanie reszt ubikwityny z TRAF2, TRAF3 i TRAF6 [47]. Jednocześnie ekspresja i aktywność MCPIP jest szybko i silnie regulowana przez cytokiny prozapalne i LPS. U myszy pozbawionych genu *Zc3h12A* spontanicznie rozwijają się choroby o podłożu zapalnym, a większość myszy ginie przed ukończeniem 12 tygodnia życia. MCPIP-1 posiada jeden palec cynkowy typu CCCH, typowy dla białek, które wiążą się do ssDNA lub RNA oraz domenę PIN, która występuje w białkach o aktywności RNazy. MCPIP-1 został odkryty stosunkowo niedawno i pierwsze prace opisywały go jako nowy czynnik transkrypcyjny. W 2009 roku dwie grupy niezależnie scharakteryzowały aktywność RNazową MCPIP-1 [44, 45]. Uczestniczyłam w badaniach, które zakończyły się identyfikacją mRNA IL-1 jako substratu dla MCPIP-1 [45]. Ekspresja MCPIP-1 jest regulowana przez IL-1β, TNF, LPS, PMA. Postanowiłam zbadać mechanizmy regulacji ekspresji *ZC3H12A* w wyniku stymulacji komórek cytokiną IL-1β. Jak wspomniano powyżej, związanie IL-1 do IL-1RI/IL-1RAcP aktywuje między innymi czynniki transkrypcyjne NFκB i Elk-1. W genie *ZC3H12A* zidentyfikowano cztery miejsca wiązania NFκB w obrębie drugiego intronu [48]. Niemniej jednak w komórkach z zaburzoną aktywacją NFκB w dalszym ciągu dochodzi do indukcji ekspresji *ZC3H12A* po stymulacji tych komórek przez IL-1β. Stwierdziliśmy, iż w regulację ekspresji MCPIP-1 przez IL-1β zaangażowany jest czynnik transkrypcyjny Elk-1. Elk-1 reguluje ekspresję *ZC3H12A* wspólnie ze swoim partnerem, czynnikiem transkrypcyjnym SRF. Oba czynniki są związane do specyficznych sekwencji regulatorowych obecnych w promotorze *ZC3H12A* zarówno w komórkach niestymulowanych jak i stymulowanych przez IL-1β. W wyniku działania na komórki cytokiny IL-1β, aktywowane są kinazy ERK1/2, które fosforylują związany do promotora Elk-1 (ryc. 2). Tak więc, podobnie jak w przypadku regulacji ekspresji genu *PAI-1*, modyfikacje potranslacyjne, a nie samo związanie tego czynnika transkrypcyjnego do DNA, decydują o tym, czy przyłączony do promotora Elk-1 będzie aktywował *ZC3H12A*. Wyniki pracy zostały opublikowane w *BMC Molecular Biology* i cytowane 12 razy pomimo, iż praca ukazała się niespełna 2 lata temu [49]. Opisanie mechanizmu regulacji ekspresji *ZC3H12A* przez IL-1 uwidacznia istnienie pętli sprzężenia zwrotnego – IL-1 reguluje ekspresję RNazy, która bierze udział w degradacji mRNA dla IL-1. W 2011 roku w *Nature Immunology* ukazała się praca pokazująca rolę IL-1 w regulacji aktywności MCPIP-1 również na poziomie regulacji stabilności białka. Jak wspomniano powyżej, w wyniku związania ligandu do IL-1RI/IL-1RAcP lub receptorów typu Toll dochodzi do aktywacji kompleksu IKK. Kompleks ten fosforyluje nie tylko IκB ale również MCPIP-1, co prowadzi do jego ubikwitynacji i degradacji. Przez pierwsze dwie godziny stymulacji IL-1 lub LPS-em aktywność RNazowa MCPIP-1 jest zminimalizowana wskutek degradacji tego białka, co umożliwia syntezę cytokin prozapalnych. Po około dwóch godzinach poziom MCPIP-1 wraca do normy i transkrypty cytokin prozapalnych są przez

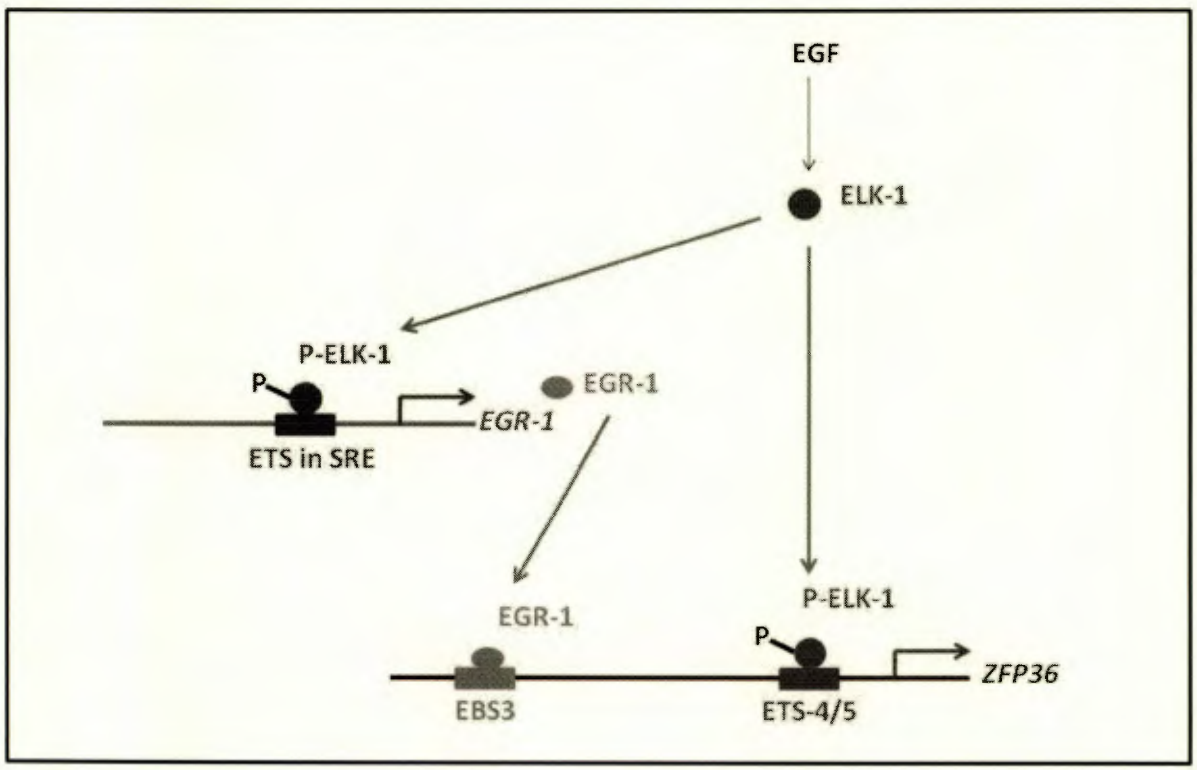
MCPIP-1 degradowane [50]. MCPIP-1 degraduje nie tylko mRNA ale również pre-miRNA zaburzając biogenezę miRNA. Globalne obniżenie poziomu miRNA jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Odwrócona korelacja pomiędzy poziomem MCPIP-1 i enzymu Dicer (enzym biorący udział w biogenezie miRNA) została stwierdzona w komórkach nowotworowych płuc. Postuluje się iż MCPIP-1 mógłby być nowym markerem prognostycznym nowotworów [51]. Regulacja ekspresji *ZC3H12A* w wyniku stymulacji komórek przez IL-1β jest bardzo szybka. Przyrost poziomu mRNA obserwowany jest już po 15 min a maksymalny wzrost po 2 godzinach działania IL-1β. Opisany przez nas mechanizm kontroli ekspresji *ZC3H12A* przez kompleks Elk-1/SRF stanowi kolejny dowód na rolę tych czynników transkrypcyjnych w regulacji ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej.



Ryc. 2. Schemat regulacji ekspresji genu *ZC3H12A*, kodującego MCPIP-1, przez IL-1 [49 – zmodyfikowane].

Wykazaliśmy iż Elk-1 reguluje również ekspresję genu *ZFP36* kodującego tristetraprolinę (TTP), kolejne białko regulujące czas półtrwania wielu transkryptów. TTP wiąże się do sekwencji bogatych w reszty adeniny i uracylu (sekwencje ARE) obecnych w rejonie 3'UTR (ang. untranslated region) wielu transkryptów. Związanie TTP do sekwencji ARE skierowuje transkrypt do degradacji. Rola TTP w regulacji stanu zapalnego jest znana przede wszystkim w kontekście regulacji przez to białko poziomu transkryptu dla TNF ale oddziałuje ono również z transkryptami innych cytokin (GM-

CSF, IL-3, IL-8, IL-2, IL-10, IL-6) oraz czynników związanych z rozwojem stanu zapalnego (iNOS, COX-2). TTP skraca ponadto czas półtrwania transkryptów białek związanych z angiogenezą i przerzutowaniem. Obniżony poziom TTP występuje w wielu typach nowotworów [52]. Wyniki naszych badań sugerują iż Elk-1 bierze udział w regulacji ekspresji *ZFP36* poprzez dwa mechanizmy – bezpośredni oraz pośredni poprzez czynnik Egr-1. Elk-1 wiąże się do dwóch sekwencji ets obecnych w obrębie pierwszego intronu genu *ZFP36*. Sekwencje te są położone w bardzo bliskim sąsiedztwie i prawdopodobnie kooperują ze sobą w trakcie wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny ETS. Aktywacja Elk-1 prowadzi ponadto do indukcji syntezy czynnika transkrypcyjnego Egr-1, który wiąże się do sekwencji EBS3 obecnej w obrębie promotora *ZFP36*. Aby, w wyniku stymulacji komórek przez EGF, doszło do aktywacji promotora *ZFP36* konieczne jest równoczesne związanie obu czynników transkrypcyjnych: Elk-1 i Egr-1 (ryc. 3). Wyniki zostały przez nas opublikowane w *BMC Molecular Biology* [53].



Ryc. 3. Schemat regulacji ekspresji genu *ZFP36*, kodującego TTP, przez czynniki transkrypcyjne Elk-1 i Egr-1 w wyniku stymulacji komórek przez EGF [53].

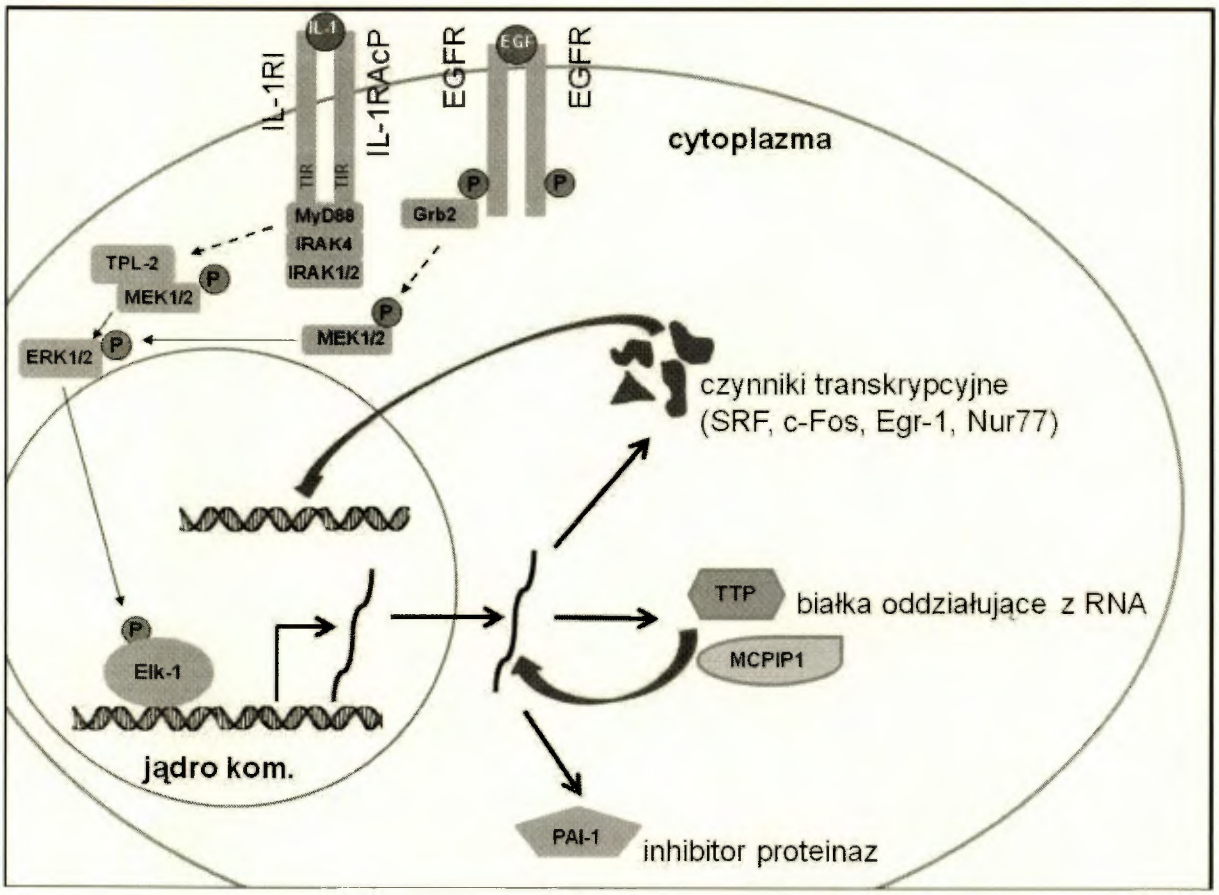
Podsumowanie osiągniętych wyników:

Wyniki osiągnięte w ramach cyklu prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego poszerzyły istniejący stan wiedzy na temat mechanizmów regulacji ekspresji genów przez cytokinę prozapalną IL-1β i czynnik wzrostu EGF. Pokazałam, iż oba białka są zaangażowane w indukcję ekspresji genów, które pełnią ważną rolę w przebiegu procesów nowotworowych i stanu zapalnego. W szczególności wykazałam, że:

1. Elk-1 reguluje ekspresję genu kodującego białko, będące jego partnerem podczas aktywacji wielu promotorów, białko SRF. Czynnik Elk-1 oddziałuje z czynnikiem SRF podczas regulacji ekspresji genu *SRF*. Koaktywator SRF – białko MAL, również może tworzyć kompleks z białkiem SRF podczas regulacji ekspresji genu *SRF*. Białka Elk-1 i MAL współzawodniczą ze sobą o miejsce wiązania do białka SRF. W zależności od tego jaki szlak przekazu sygnału jest włączany w komórce, szlak kinaz MAP czy szlak Rho, *SRF* jest regulowany przez kompleks Elk-1/SRF lub MAL/SRF.
2. EGF reguluje ekspresję PAI-1 w komórkach ludzkiej linii gruczolakoraka piersi MCF-7. Kinetyka ekspresji PAI-1 w badanym układzie przypomina kinetykę ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej. Maksymalny poziom transkryptu dla PAI-1 obserwowany jest po 45 min, maksymalny poziom białka po 6 godz. stymulacji komórek przez EGF. Związanie czynnika EGF do receptora indukuje aktywację kaskady kinaz MAP, prowadzącą między innymi do fosforylacji Elk-1. Elk-1 reguluje ekspresję PAI-1 za pośrednictwem sekwencji ets, obecnych w promotorze genu *PAI-1*. Elk-1 reguluje ekspresję PAI-1 bez udziału swojego partnera – białka SRF. Hormon sterydowy progesteron, który może mieć istotne znaczenie w rozwoju nowotworu piersi, zwiększa stymulujący efekt EGF na syntezę PAI-1.
3. IL-1β w bardzo krótkim czasie stymuluje ekspresję kluczowego regulatora stanu zapalnego – białka MCPIP-1. Regulacja ta ma miejsce zarówno w ludzkich makrofagach wywodzących się z monocytów krwi obwodowej jak i w komórkach wątrobiaka ludzkiego HepG2. Stymulacja komórek przez IL-1β prowadzi do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Elk-1, związanego do promotora genu kodującego MCPIP-1 (*ZC3H12A*). Elk-1 reguluje aktywację promotora *ZC3H12A* wspólnie ze swoim partnerem - białkiem SRF. Indukcja syntezy mRNA dla MCPIP-1 w wyniku stymulacji komórek przez IL-1β jest jedynie częściowo hamowana przez inhibitor kinazy ERK1/2, gdyż w regulację ekspresji *ZC3H12A* zaangażowany jest również czynnik transkrypcyjny NFκB.
4. Fosforylowany, w wyniku stymulacji komórek przez IL-1β, Elk-1 bierze udział w indukowaniu syntezy MCPIP-1, który z kolei uczestniczy w degradacji transkryptu dla IL-1β. Pokazuje to

istnienie pętli sprzężenia zwrotnego – IL-1β wpływa na ekspresję białka, które reguluje jej syntezę.

5. Elk-1 jest związany do badanych promotorów niezależnie od aktywacji kinaz MAP. Związanie Elk-1 do promotorów *ZC3H12A*, *EGR-1* czy *PAI-1* jest niezależne od stymulacji komórek przez IL-1β lub EGF. Bez aktywacji kinaz MAP nie dochodzi jednak do aktywacji promotorów, do których Elk-1 jest związany. Czynnikiem, który decyduje o indukcji ekspresji genów regulowanych przez Elk-1 jest modyfikacja potranslacyjna tego białka – jego fosforylacja.
6. Elk-1 reguluje ekspresję genu *ZFP36* kodującego TTP. Elk-1 wiąże się do promotora *ZFP36* bezpośrednio oraz indukuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego Egr-1, który również wiąże się do promotora *ZFP36*. Związanie obu czynników transkrypcyjnych do promotora ZFP36 jest konieczne do jego aktywacji przez EGF.
7. Poziom TTP jest obniżony w wielu typach nowotworów, a nadekspresja tego białka przyczynia się do spowolnienia wzrostu guzów i spowolnienia ich unaczynienia. Indukcja ekspresji TTP w komórkach ludzkiej linii gruczolakoraka piersi MCF-7 w wyniku działania na te komórki EGF pokazuje złożony wpływ EGF na komórki raka piersi. Pomimo, iż EGF jest w głównej mierze klasyfikowany jako czynnik, który promuje rozwój i wzrost nowotworów, indukuje on ekspresję TTP.
8. Elk-1 bierze udział w regulacji ekspresji białek biorących udział w kontroli poziomu transkryptów w komórce (Ryc. 4).
9. Elk-1 jest zaangażowany nie tylko w regulację ekspresji genów kodujących białka biorące udział w procesach proliferacji i apoptozy ale również w regulację ekspresji genów kodujących białka ważne w procesach zapalnych (Ryc. 4).



Ryc. 4. Uproszczony schemat przedstawiający funkcje biologiczne białek kodowanych przez geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny Elk-1 w wyniku stymulacji komórek przez IL-1β lub EGF. Regulacja ekspresji genów kodujących SRF, MCPIP-1, TTP, PAI-1 przez Elk-1 została wykazana przez habilitanta [33, 49, 53, 40].

6. **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:**

Pracę naukową rozpoczęłam w grupie prof. Aleksandra Koja, w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej UJ. Prowadzone badania dotyczyły regulacji reakcji ostrej fazy - złożonego procesu mającego na celu przywrócenie zaburzonej homeostazy organizmu. Do zaburzenia homeostazy może dojść w wyniku infekcji, wpływu szkodliwych czynników fizycznych, rozwoju nowotworów czy w wyniku martwicy tkanek. Przebieg reakcji ostrej fazy jest regulowany przez mediatory wydzielane przez różnego typu komórki, przy czym w inicjację reakcji ostrej fazy zaangażowane są głównie komórki układu immunologicznego, śródbłonka i fibroblasty. Istotną rolę w reakcji ostrej fazy odgrywa grupa białek, których ekspresja zmienia się w trakcie trwania reakcji ostrej fazy. Należą tu m.in. inhibitory proteaz, opsoniny, białka istotne dla procesu krzepnięcia. Są one

syntetyzowane w wątrobie i wspólnie zostały nazwane białkami ostrej fazy (ang. acute phase proteins). Moja praca magisterska, wykonana w latach 1990-1992, dotyczyła badań nad wpływem IL-6, analogu glikokortykoidów (deksametazonu) i kwasu retinowego na syntezę białek ostrej fazy w komórkach ludzkiego wątrobiaka HepG2 [54]. Tematyka związana z zagadnieniami dotyczącymi stanu zapalnego już na stałe pozostała w obszarze moich zainteresowań badawczych.

Niektóre z białek ostrej fazy, takie jak α1-antychymotrypsyna czy α1-antyproteinaza to inhibitory proteinaz serynowych, zwane również serpinami. Po podjęciu studiów doktoranckich pod kierunkiem prof. Adama Dubina, w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej UJ w roku 1992, rozpoczęłam badania nad regulacją biosyntezy i wydzielania serpin, w szczególności skupiłam się na inhibitorze elastaz z leukocytów końskich (HLEI, ang. horse leucocyte elastase inhibitor) [55]. W celu zbadania jakie receptory są związane z usuwaniem kompleksów serpina-proteinaza serynowa z powierzchni komórek wyjechałam na 8-miesięczne stypendium na Uniwersytet w Aarchus (Dania) do grupy prof. Petera Andreasena. W wyniku prowadzonych badań zidentyfikowałam nowe ligandy wiążące się do receptorów z rodziny receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości, określiłam specyficzność substratową tych receptorów oraz udział poszczególnych komponentów kompleksu serpina-proteinaza w jego wiązaniu się do badanego receptora. Wyniki opublikowane w *European Journal of Biochemistry* (obecnie FEBS J) [56] cieszą się dużą poczytnością. Praca była cytowana 63 razy.

Wśród badanych przeze mnie ligandów wyżej wymienionych receptorów znajdowały się białka wchodzące w skład systemu aktywacji plazminogenu, w tym PAI-1. Od pobytu na Uniwersytecie w Aarchus aż do chwili obecnej zajmuję się badaniem regulacji ekspresji PAI-1 przez cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu. Wynikiem tych badań są cztery prace doświadczalne. Poza pracą już wymienioną w ramach prac stanowiących podstawę habilitacji [40] wyniki dotyczące tej tematyki opublikowane zostały w *Journal of Neurochemistry*, *Cytokine* oraz *Journal of Physiology and Pharmacology* [39, 57, 58]. We wszystkich trzech pracach jestem ich pierwszym autorem.

Moje zainteresowania badawcze zogniskowały się na poznaniu mechanizmów związanych z regulacją ekspresji genów, szlaków przekazu sygnału aktywowanych przez cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu. Rezultatem badań prowadzonych w tej tematyce są prace, w których zajmowałam się poznaniem różnych aspektów aktywacji szlaku kinaz JAK/STAT przez cytokiny z rodziny IL-6. Opisałam regulację aktywności receptorów dwóch cytokin z grupy IL-6, czynnika hamującego białaczkę (LIF, ang. leukemia inhibitory factor) oraz onkostatyny M (OSM) w układzie komórkowym umożliwiającym nadekspresję obu cytokin [59]. Brałam również udział w badaniach wpływu partenolidu, występującego w wielu roślinach wykorzystywanych w medycynie, na aktywację

czynnika transkrypcyjnego STAT3 przez IL-6 [60]. Praca opublikowana w *Biochemical and Biophysical Research Communication* była cytowana 65 razy.

W celu poszerzenia swoich umiejętności o nowe techniki służące badaniu regulacji ekspresji genów wyjechałam na staż naukowy na Uniwersytet w Cleveland (USA), do grupy prof. Tomasza Korduli. Zajmowałam się tam regulacją ekspresji inhibitorów proteinaz (wspomnianego już PAI-1 [39] oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz-1 (TIMP-1)) przez IL-1 w pierwotnych ludzkich astrocytach [61]. Wyniki naszych badań nad mechanizmem regulacji ekspresji PAI-1 przez IL-1 i onkostatynę M (OSM) prowadzone w hodowlach pierwotnych astrocytów ludzkich wykazały, iż obie cytokiny stymulują ekspresję *PAI-1* poprzez indukcję ekspresji *FOS*. IL-1β aktywuje NFκB, który zwiększa aktywność SRF prowadząc do zwiększonej ekspresji *FOS*. OSM aktywuje czynniki transkrypcyjne STAT1 i STAT3, które również indukują gen *FOS*. Powstały c-Fos wspólnie z czynnikiem transkrypcyjnym c-Jun tworzy kompleks AP-1, który stymuluje syntezę mRNA dla PAI-1. Równocześnie IL-1β po dłuższym czasie stymulacji aktywuje mechanizmy, które powodują zahamowanie ekspresji *PAI-1*. Wyniki naszej pracy zostały opublikowane w *Journal of Neurochemistry* [39]. Wraz z pozostałymi członkami zespołu wykazałam, iż czynniki transkrypcyjne NFκB i ATF-2 kontrolują transkrypcję genu TIMP-1 w wyniku stymulacji komórek przez IL-1. Brak ekspresji TIMP-1, a tym samym zwiększona aktywność proteolityczna metaloproteinaz w komórkach glejaka, może być skorelowany z zaburzeniem aktywacji wyżej wymienionych czynników transkrypcyjnych [61]. W wyniku badania procesów rearanżacji chromatyny wyjaśniliśmy mechanizmy tkankowo-specyficznej regulacji ekspresji genów kodujących serpiny. Wyniki tych doświadczeń prowadzonych na astrocytach pierwotnych, linii komórkowej gwiaździaka U373-MG i wątrobiaka HepG2 zostały opublikowane w *Journal of Neurochemistry* [62].

Kolejny, ponad dwuletni, staż naukowy odbyłam w grupie prof. Andrew Sharrocksa na Uniwersytecie w Manchesterze (Wielka Brytania). Grupa ta zajmuje się regulacją ekspresji genów w wyniku aktywacji kaskady kinaz MAP. W szczególności badania dotyczą regulowanych przez kinazy MAP czynników transkrypcyjnych z rodziny ETS. Grupa prof. Sharrocksa specjalizuje się w badaniu funkcji i regulacji aktywności białek z podrodziny TCF, a zwłaszcza czynnika transkrypcyjnego Elk-1. Do aktywacji Elk-1 dochodzi w wyniku stymulacji komórek mitogenami, czynnikami wzrostu, cytokinami oraz na skutek stresu komórkowego. Prowadzone przeze mnie badania wykazały niezwykle istotną rolę Elk-1 w regulacji funkcji anty-apoptotycznych komórki. Zahamowanie ekspresji genów będących pod kontrolą Elk-1 prowadzi do zaburzeń cyklu komórkowego, zahamowania proliferacji i wchodzenia komórek w stan apoptozy. Wyniki tych doświadczeń opublikowane w *Molecular and Cellular Biology* cytowane były 46 razy [63]. Uczestniczyłam ponadto w badaniach mających na celu globalną identyfikację nowych genów regulowanych przez Elk-1 [64].

Po powrocie z Uniwersytetu w Manchesterze kontynuowałam badania regulacji aktywności genów przez Elk-1 czego wynikiem są trzy prace stanowiące podstawę habilitacji. Zajmowałam się ponadto tematyka związaną z procesami skorelowanymi z rozwojem nowotworów. Podczas pobytu w Northwick Park Institute for Medical Research (Londyn, Wielka Brytania) brałam udział w badaniach procesów związanych z regulacją angiogenezy przez oksygenazę hemową [65]. Uczestniczyłam ponadto w badaniu funkcji i regulacji mitochondrialnego białka, mimityny, w procesie apoptozy [66]. **Reasumując, 14 z cytowanych powyżej prac doświadczalnych dotyczy badania regulacji ekspresji genów przez cytokiny prozapalne lub epidermalny czynnik wzrostu. Sumaryczny IF tych prac wynosi: 59,383 (w tym IF prac doświadczalnych stanowiących podstawę habilitacji: 15,9), a całkowity IF wszystkich prac: 74,194.**

Literatura:

1. Akira S. (2011) Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366:2748-55. Review.
2. Jura J and Koj A. (2011) Regulatory Mechanisms Controlling Inflammation and Synthesis of Acute Phase Proteins in Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins; edited by Francisco Veas; InTech, 2011; ISBN 978-953-307-252-4:
3. Koj A. (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1317:84-94. Review.
4. Dinarello CA. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 117:3720-32. Review.
5. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. 2004 The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2434-9.
6. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, Voronov E, Martin MU, Dinarello CA, Apte RN. (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:2574-9.
7. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, Contassot E, Bachmann MF, French LE, Oxenius A, Kündig TM. 2011 Inflammasome activation and IL-1β target IL-1α for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:18055-60.
8. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK, Tschopp J. 2012 Inflammasome activators induce interleukin-1α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity.* 36:388-400.
9. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. (2006) The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 25:387-408. Review.
10. O'Neill LA. (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 226:10-8. Review.
11. Gantke T, Sriskantharajah S, Sadowski M, Ley SC. (2012) IκB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunol Rev.* 246:168-82. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01104.x. Review.

12. Sharrocks AD. (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:827-37. Review.
13. Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD. (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell.* 12:63-74.
14. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 2841:31-53. Review.
15. Pao W and Miller VA. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol.* 23:2556-68. Review.
16. Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. (2010) EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv Clin Chem.* 51:71-119. Review.
17. Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM. (2008) A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res.* 68:5878-87.
18. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 93:1246-56.
19. Uribe P and Gonzalez S. (2011) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract.* 207:337-42. Review.
20. Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. (2006) Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 25:3787-800. Review
21. Wen YH, Koeppen H, Garcia R, Chiriboga L, Tarlow BD, Peters BA, Eigenbrot C, Yee H, Steiner G, Greco MA. (2007) Epidermal growth factor receptor in osteosarcoma: expression and mutational analysis. *Hum Pathol.* 38:1184-91.
22. Meloche S and Pouyssegur J. (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. Oncogene. 26:3227-39. Review.
23. Dasgupta P, Sun J, Wang S, Fusaro G, Betts V, Padmanabhan J, Sebti SM, Chellappan SP. (2004) Disruption of the Rb--Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 24:9527-41.
24. Arlt A, Vorndamm J, Müerköster S, Yu H, Schmidt WE, Fölsch UR, Schäfer H. (2002) Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 62:910-6.
25. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, Nukiwa T. (2002) Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol.* 169:469-75.
26. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006) Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 72:1605-21. Review.
27. Xia Y, Padre RC, De Mendoza TH, Bottero V, Tergaonkar VB, Verma IM. (2009) Phosphorylation of p53 by IkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:2629-34.
28. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, Gotoh Y. (2002) Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem.* 277:21843-50.
29. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC. (2004) IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell.* 117:225-37.
30. Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin

AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC. (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol.* 10:138-48.

31. Jung H, Seong HA and Ha H. (2008) Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity. *J Biol Chem.* 283:20383-96.
32. Grivennikov SI and Karin M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21:11-9. Review.
33. Kasza A, O'Donnell A, Gascoigne K, Zeef LA, Hayes A, Sharrocks AD. (2005) The ETS domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF, *J Biol Chem.* 280:1149-55.
34. F. Blaschke, D. Bruemmer and R.E. Law. Egr-1 is a major vascular pathogenic transcription factor in atherosclerosis and restenosis, Rev Endocr Metab Disord. 5 (2004) 249-54. Review.
35. Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. (2007) Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals, *Oncogene.* 26:1-10. Review.
36. Ke N, Claassen G, Yu DH, Albers A, Fan W, Tan P, Grifman M, Hu X, Defife K, Nguy V, Meyhack B, Brachat A, Wong-Staal F, Li QX. (2004) Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis, *Cancer Res.* 64:8208-12.
37. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. (2006) Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77, *Mol Endocrinol.* 20:786-94.
38. Gruber F, Hufnagl P, Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Breuss JM, Huber-Beckmann R, Lucerna M, Papac N, Harant H, Lindley I, de Martin R, Binder BR. (2003) Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter regulates TNF alpha -induced PAI-1 expression, *Blood.* 101:3042-8.
39. Kasza A, Kiss DL, Gopalan S, Xu W, Rydel RE, Koj A, Kordula T. (2002) Mechanism of plasminogen activator inhibitor-1 regulation by oncostatin M and interleukin-1 in human astrocytes, *J Neurochem*. 83:696-703.
40. Wyrzykowska P, Stalińska K, Wawro M, Kochan J, Kasza A. (2010) Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1, *Biochim Biophys Acta – Gene Regul Mech.* 1799:616-21.
41. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review, *Int J Cancer.* 72:1-22. Review.
42. Ma Z, Paek D and Oh CK. (2009) Plasminogen activator inhibitor-1 and asthma: role in the pathogenesis and molecular regulation, Clin Exp Allergy. 39:1136-44. Review.
43. De Taeye B, Smith LH and Vaughan DE. (2005) Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease, *Curr Opin Pharmacol.* 5:149-54. Review.
44. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. (2009) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay, *Nature*. 458:1185-90.
45. Mizgalska D, Wegrzyn P, Murzyn K, Kasza A, Koj A, Jura J, Jarzab B, Jura J. (2009) Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1beta mRNA, *FEBS J.* 276:7386-99.
46. Li M, Cao W, Liu H, Zhang W, Liu X, Cai Z, Guo J, Wang X, Hui Z, Zhang H, Wang J, Wang L. (2012) MCPIP1 Down-Regulates IL-2 Expression through an ARE-Independent Pathway. *PLoS One*. 7:e49841. doi: 10.1371/journal.pone.0049841.
47. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, Yang Q, Kolattukudy PE, Fu M. (2010) MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling, *J Exp Med.* 207:2959-73.

48. Skalniak L, Mizgalska D, Zarebski A, Wyrzykowska P, Koj A, Jura J. (2009) Regulatory feedback loop between NF-kappaB and MCP-1-induced protein 1 RNase, *FEBS J.* 276:5892-905.
49. Kasza A, Wyrzykowska P, Horwacik I, Tymoszuk P, Mizgalska D, Palmer K, Rokita H, Sharrocks AD, Jura J. (2010) Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of ZC3H12A expression, *BMC Mol Biol.* 11:14
50. Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, Akira S. (2011) The IκB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. *Nat Immunol.* 12:1167-75.
51. Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. (2011) MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation, *Mol Cell.* 44:424-36.
52. Sanduja S, Blanco FF, Young LE, Kaza V, Dixon DA. (2012)The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Front Biosci.* 17:174-88. Review.
53. Florkowska M, Tymoszuk P, Balwierz A, Skucha A, Kochan J, Wawro M, Stalinska K, Kasza A. (2012) EGF activates TTP expression by activation of ELK-1 and EGR-1 transcription factors. *BMC Mol Biol.* 13:8.
54. Kasza A, Bugno M and Koj A. (1994) Long-term culture of HepG2 hepatoma cells as a model for liver acute phase response during chronic inflammation. Effects of interleukin-6, dexamethasone and retinoic acid. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375:779-83.
55. Kasza A, Korpula-Mastalerz R, Rose-John S and Dubin A. (1996) Biosynthesis and distribution of leucocyte elastase inhibitor. Production of recombinant inhibitor. *Acta Biochim Pol.* 43:497-501.
56. Kasza A, Petersen HH, Heegaard CW, Oka K, Christensen A, Dubin A, Chan L, Andreasen PA. (1997) Specificity of serine proteinase/serpin complex binding to very-low-density lipoprotein receptor and alpha2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein-receptor-related protein. *Eur J Biochem.* 248:270-81.
57. Kasza A, Kowanetz M, Pośledník K, Witek B, Kordula T, Koj A. (2001) Epidermal Growth Factor and proinflammatory cytokines regulate expression of plasminogen activation system in U373-MG astrocytoma cells. *Cytokine*, 16 187-90.
58. Kasza A and Koj A. (2002) Cytokines regulate plesminogen activation system in astrocytoma cells. *J. Physiol. Pharmacology,* 1:95-104.
59. Kasza A, Rogowski K, Kilarski W, Sobota R, Bernas T, Dobrucki J, Travis J, Koj A, Bugno M, Kordula T. (2001) Differential effects of oncostatin M and leukaemia inhibitory factor expression in astrocytoma cells. *Biochem J.* 355:307-14.
60. Sobota R, Szwed M, Kasza A, Bugno M, Kordula T. (2000) Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun*. 267:329-33.
61. Wilczynska KM, Gopalan SM, Bugno M, Kasza A, Konik BS, Bryan L, Wright S, Griswold-Prenner I, Kordula T. (2006) A novel mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 activation by interleukin-1 in primary human astrocytes. *J Biol Chem.* 281:34955-64.
62. Gopalan S, Kasza A, Xu W, Kiss DL, Wilczynska KM, Rydel RE, Kordula T. (2005) Astrocyte- and hepatocyte-specific expression of genes from the distal Serwin subcluster At 14q32.1 associates with tissue-specific chromatin structures. *J Neurochem* 94:763-73.

63. Vickers ER, Kasza A, Kurnaz IA, Seifert A, Zeef LA, O'donnell A, Hayes A, Sharrocks AD. (2004) Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. *Moll. Cell. Biol.* 24:10340-51.
64. Boros J, O'Donnell A, Donaldson IJ, Kasza A, Zeef L, Sharrocks AD. (2009) Overlapping promoter targeting by Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor family members. *Nucleic Acids Res.* 37:7368-80.
65. Dulak J, Józkowicz A, Foresti R, Kasza A, Frick M, Huk I, Green CJ, Pachinger O, Weidinger F, Motterlini R. (2002) Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxidant Redox Signalling,* 2:229-40.
66. Wegrzyn P, Yarwood SJ, Fiegler N, Bzowska M, Koj A, Mizgalska D, Malicki S, Pajak M, Kasza A, Kachamakova-Trojanowska N, Bereta J, Jura J, Jura J. (2009) Mimitin - a novel cytokine-regulated mitochondrial protein. *BMC Cell Biol.* 3110:23.

A. Kasza