# ZAŁĄCZNIK nr 3A

# AUTOREFERAT

## Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

dr Agnieszka Łoboda
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 2014

## 1. Imię i Nazwisko

Agnieszka Łoboda (z d. Siaśkiewicz)

## 2. Posiadane dyplomy oraz stopnie naukowe:

| | |
|---|---|
| **2006** | **doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii**<br>Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków<br><br>tytuł pracy doktorskiej *„Transkryptom angiogenny komórek śródbłonka mikronaczyń – wpływ niedotlenienia i oksygenazy hemowej-1"*<br><br>promotor: prof. dr hab. Józef Dulak |
| **2002** | **magister biochemii**<br>Zakład Biochemii Ogólnej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków<br><br>tytuł pracy magisterskiej *„Cytostatyczny i cytotoksyczny efekt działania taksolu i suraminy na komórki nowotworowe nerki HTB-44"*<br><br>promotor: prof. dr hab. Andrzej Klein |

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

| | |
|---|---|
| **01.2008 - nadal** | **adiunkt**<br>Zakład Biotechnologii Medycznej<br>Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii<br>Uniwersytet Jagielloński<br>ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków |
| **10.2006 – 12.2007** | **asystent**<br>Zakład Biotechnologii Medycznej<br>Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii<br>Uniwersytet Jagielloński<br>ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków |
| **10.2002 – 06.2006** | **studia doktoranckie**<br>Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii<br>Uniwersytet Jagielloński<br>ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków |

**4. 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.):**

**4. a. Tytuł osiągnięcia naukowego**

**Rola czynników transkrypcyjnych HIF i Nrf2 w regulacji ekspresji genów**

**4. b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa.**

1. Stachurska A, Ciesla M, Kozakowska M, Wolffram S, Boesch-Saadatmandi C, Rimbach G, Jozkowicz A, Dulak J, **Loboda A*.** Cross-talk between microRNAs, Nrf2 and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol Nutr Food Res. 2013: 57: 504-515*

***IF$_{2012}$ – 4,301*** ***MNISW - 45*** ***liczba cytowań – 5*** ***autor korespondencyjny***

2. Florczyk U, Czauderna S, Stachurska A, Tertil M, Nowak W, Kozakowska M, Poellinger L, Jozkowicz A, **Loboda A*,** Dulak J*. Opposite effect of HIF-1α and HIF-2α on regulation of IL-8 expression in endothelial cells. *Free Radic Biol Med, 2011: 51: 1882-1892*

***IF$_{2011}$ – 5,423*** ***MNISW - 40*** ***liczba cytowań – 11*** ***autor korespondencyjny***

3. Stachurska A, Kozakowska M, Jozkowicz A, Dulak J, **Loboda A*.** Aristolochic acid I and ochratoxin A differentially regulate VEGF expression in porcine kidney epithelial cells – the involvement of SP-1 and HIFs transcription factors. *Toxicol Lett; 2011: 204: 118-126*

***IF$_{2011}$ – 3,230*** ***MNISW - 35*** ***liczba cytowań – 2*** ***autor korespondencyjny***

4. **Loboda A*,** Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors - similar but not identical. *Mol Cells. 2010; 29: 435-442*

***IF$_{2010}$ – 2,046*** ***MNISW - 20*** ***liczba cytowań – 74*** ***autor korespondencyjny***

5. **Loboda A,** Stachurska A, Florczyk U, Rudnicka D, Jazwa A, Wegrzyn J, Kozakowska M, Stalinska K, Poellinger L, Levonen AL, Yla-Herttuala S, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 production in human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal, 2009a, 11: 1501-1517*

***IF$_{2009}$ – 7,581*** ***MNISW - 45*** ***liczba cytowań – 26***

6. **Loboda A,** Stachurska A, Dorosz J, Zurawski M, Wegrzyn J, Kozakowska M, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 attenuates Ref-1 expression in endothelial cells: reversal by siRNA and inhibition of geranylgeranylation. *Vascular Pharmacol, 2009b, 5: 133-139*

***IF$_{2009}$ – 2,044*** ***MNISW - 25*** ***liczba cytowań – 10***

7. Boesch-Saadatmandi C, **Loboda A,** Jozkowicz A, Huebbe P, Blank R, Wolffram S, Dulak J, Rimbach G. Effect of ochratoxin A on redox regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. *Food Chem Toxicol, 2008, 46: 2665-2671.*

***IF$_{2008}$ – 2,321*** ***MNISW - 35*** ***liczba cytowań – 21***

**Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: IF = 26,946**

**Sumaryczna punktacja MNISW** (wg załącznika do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 roku) **= 245**

**W sumie prace te były cytowane 149 razy** *(Web of Science, dane na dzień 18.05.2014)*

Oświadczenia wszystkich współautorów prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, określające ich udział w każdej publikacji, która stanowi podstawę postępowania habilitacyjnego, są zawarte w Załączniku nr 6.

**4. c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

W niniejszej części przedstawione zostały główne tezy oraz wyniki pracy habilitacyjnej zatytułowanej "Rola czynników transkrypcyjnych HIF i Nrf2 w regulacji ekspresji genów".

Pełna lista opublikowanych prac, osiągnięć naukowych oraz dane bibliometryczne zawarte zostały w Załączniku nr 4 (*Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki; załącznik 4a - wersja w języku polskim, załącznik 4b - wersja w języku angielskim*). Dodatkowo spis publikacji z dokładnym podziałem na pozycje oryginalne i przeglądowe opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia doktora zebrano w Załączniku nr 7.

Pozycje bibliograficzne stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego zaznaczono wytłuszczonym drukiem.

***Najważniejsze wnioski rozprawy habilitacyjnej:***

1. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (przez niedotlenienie, chemiczne aktywatory, nadekspresję HIF-1α za pomocą wektorów adenowirusowych) w komórkach śródbłonka prowadzi do zwiększonej ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGF, a równocześnie do obniżenia poziomu interleukiny 8 (IL-8) i oksygenazy hemowej-1 (HO-1). Zależne od HIF-1 zahamowanie ekspresji IL-8 jest spowodowane obniżeniem ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Ekspresja IL-8 jest natomiast niezależna od HO-1 **(Loboda et al. 2009a).**
2. W przeciwieństwie do HIF-1, czynnik HIF-2 zwiększa ekspresję IL-8 w sposób niezależny od Nrf2. HIF-2 zwiększa aktywność Sp-1 oraz ekspresję protoonkogenu c-Myc. W warunkach niedotlenienia pomimo stabilizacji obu izoform, HIF-1α oraz HIF-2α, dochodzi do zahamowania ekspresji IL-8 na drodze zależnej od blokowania Nrf2 oraz c-Myc **(Florczyk et al. 2011).** Wykazana przez nas odmienna regulacja ekspresji IL-8 przez HIF-1 oraz HIF-2 poszerza wiedzę na temat tych należących do tej samej rodziny, ale nie identycznych czynników regulowanych przez niskie stężenie tlenu **(Loboda et al. 2010).**

3. Aktywacja HIF-1 obniża ekspresję czynnika Ref-1, białka zaangażowanego w naprawę DNA oraz ważnego regulatora stanu oksydoredukcyjnego komórki. Z drugiej strony, wyciszenie ekspresji HIF-1 (poprzez zastosowanie siRNA) przeciwdziała zahamowaniu Ref-1 przez niedotlenienie, co może prowadzić do aktywacji mechanizmów naprawczych i zmniejszenia częstości mutacji/genetycznej niestabilności **(Loboda et al. 2009b).** Ekspresja Ref-1 jest również hamowana przez formę HIF-2 **(Loboda et al. 2010).**
4. Z kolei aktywacja czynnika HIF-2 odgrywa rolę w regulacji ekspresji VEGF w komórkach nabłonka nerki w warunkach patologicznych. Obniżenie ekspresji VEGF pod wpływem nefrotoksyny, ochratoksyny A (OTA) może być odwrócone przez nadekspresję HIF-2. Z drugiej strony, HIF-1 oraz Sp-1 są ważnymi mediatorami zwiększenia ekspresji VEGF pod wpływem innej toksyny, kwasu aristolochowego (AAI) **(Stachurska et al. 2011).**
5. Zahamowanie ekspresji czynnika Nrf2 i regulowanego przez ten czynnik genu antyoksydacyjnego, HO-1 jest ważnym mechanizmem działania czynników nefrotoksycznych, np. OTA **(Boesch-Saadatmandi et al. 2008).** Adenowirusowa nadekspresja Nrf2 przeciwdziała indukowanemu przez OTA wzrostowi profibrotycznego transformującego czynnika wzrostu (TGFβ) oraz poziomu reaktywnych form tlenu (RFT). Regulacja ekspresji genów antyoksydacyjnych wynika ze zmian w ekspresji mikroRNA. Zahamowanie ekspresji mikroRNA poprzez zastosowanie antagomirów, takich jak anti-miR-132 oraz anti-miR-200c przeciwdziała wywołanemu przez OTA spadkowi ekspresji HO-1, wzrostowi poziomu RFT i ekspresji TGFβ **(Stachurska et al. 2013).**

***Wprowadzenie i cel rozprawy habilitacyjnej***

Podstawowym celem pracy habilitacyjnej jest określenie roli indukowanych przez niedotlenienie czynników transkrypcyjnych z rodziny HIF (ang. *hypoxia inducible factor*) oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w regulacji ekspresji wybranych genów. Jako modeli badawczych użyto komórek śródbłonka mikronaczyń – komórek HMEC-1 (ang. *human microvascular endothelial cells-1*) oraz komórek proksymalnych nerki LLC-PK1 (ang. *renal proximal tubular epithelial cells*).

W odpowiedzi na niekorzystne bodźce, komórki organizmów żywych uruchamiają bogaty repertuar wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych prowadząc do zwiększonej/zmniejszonej aktywności czynników transkrypcyjnych oraz ekspresji regulowanych przez nich genów. Ponadto, dochodzi do zmian w ekspresji mikroRNA (miRNA), jednoniciowych cząsteczek RNA o długości ok. 21-23 nukleotydów, które zaangażowane są w regulację ekspresji ok. 30% ludzkich genów (Ciesla et al. 2011).

Podstawowym stanem aktywującym czynniki transkrypcyjne z rodziny HIF jest niedotlenienie (hipoksja). Spadek stężenia tlenu prowadzi również do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) oraz zaburzonej wydajności systemów antyoksydacyjnych powodując wystąpienie nasilonego stresu oksydacyjnego. Co ważne, występowanie niedotlenienia jest charakterystycznym objawem wielu stanów patologicznych, takich jak zawał

serca, udar mózgu czy rozwój nowotworów. Hipoksja występuje również w chronicznych chorobach nerek.

Dostosowanie do obniżonej dostępności tlenu wymaga zmian w ekspresji genów, prowadzących do zmniejszenia zużycia tlenu, jego zwiększonej dostawy oraz do zwalczenia negatywnych skutków niedotlenienia. Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulującymi te procesy są czynniki indukowane przez niedotlenienie, tzw. czynniki HIF (ang. *hypoxia inducible factor*) **(Loboda et al. 2010)**. Oprócz roli w walce z niedotlenieniem, czynniki te mogą zapewniać ochronę przed stresem oksydacyjnym tworzącym się podczas niedotlenienia, ponieważ wiele produktów ekspresji regulowanych przez nie genów może mieć działanie antyoksydacyjne. Ponadto, kluczowe funkcje w ochronie komórek przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego pełni czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear erythroid 2-related factor*), regulujący ekspresję wielu genów cytoprotekcyjnych, enzymów II fazy i enzymów antyoksydacyjnych, w tym oksygenazy hemowej-1 (HO-1) (Florczyk et al. 2010). Zarówno ekspresja Nrf2 jak i poziom HO-1 są modyfikowane przez niskie stężenie tlenu (praca przeglądowa: Loboda et al. 2008, **Loboda et al. 2009a**).

Chociaż odmienne i należące do innych rodzin, czynniki transkrypcyjne z rodziny HIF i Nrf2 mogą współdziałać w ochronie komórek przed niekorzystnymi efektami niedotlenienia i stresu oksydacyjnego. Co ciekawe, badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej pokazują również ich powiązanie w regulacji ekspresji genów angiogennych, kluczowych dla procesu formowania naczyń krwionośnych.

Proces angiogenezy czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych z istniejących kapilar zachodzi w warunkach fizjologicznych, ale ogromne znaczenie ma angiogeneza patologiczna, charakteryzująca rozwój wielu chorób, takich jak wzrost nowotworów (prace przeglądowe: Loboda et al. 2012b, Tertil et al. 2014). W warunkach takich dochodzi do nasilonej produkcji czynników angiogennych, np. czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*). Zahamowanie nadmiernej produkcji VEGF u pacjentów z różnymi typami nowotworów poprzez zastosowanie przeciwciała monoklonalnego przeciw VEGF, tzw. Avastinu (Bevacizumabu) może mieć pozytywne efekty, jednak ostatnie badania wskazują na dość silne efekty uboczne w postaci uszkodzenia nerek pacjentów leczonych tym związkiem (zwiększona proteinuria, mikroangiopatia zakrzepowa, ogólna niewydolność nerek) (praca przeglądowa: Izzedine et al. 2010, Hayman et al. 2012). Wskazuje to, że odpowiedni poziom VEGF odgrywa kluczową rolę we właściwym funkcjonowaniu komórek nerek. Wiadomo, że oprócz funkcji angiogennej, VEGF odpowiada za utrzymanie prawidłowej przepuszczalności komórek nabłonkowych kłębuszków nerkowych oraz odpowiednią filtrację nerkową (Eremina et al. 2004). W procesach prowadzących do chorób nerek znaczącą rolę odgrywają też czynniki z rodziny HIF. Co ważne, rola niedotlenienia w chorobach nerek jest badana w aspekcie zmian

wywołanych toksynami, które prowadząc do rozwoju zwłóknienia nerek uszkadzają te organy i mogą prowadzić do ich całkowitej dysfunkcji. Toksyny te mogą też zaburzać odpowiedź antyoksydacyjną komórki oraz regulować ekspresję mikroRNA.

Podsumowując, celem niniejszej rozprawy habilitacyjnej jest określenie roli czynników transkrypcyjnych HIF oraz Nrf2 w regulacji ekspresji wybranych genów istotnych w biologii komórek śródbłonka i komórek proksymalnych nerki.

***Krótka charakterystyka czynników należących do rodziny HIF***

Białka indukowane przez niedotlenienie to heterodimery zbudowane z podjednostki α i podjednostki β. Znane są trzy izoformy wrażliwej na stężenie tlenu podjednostki α (HIF-1α, HIF-2α i HIF-3α) oraz trzy paralogi niezależnej od stężenia tlenu podjednostki β (Arnt1, Arnt2 i Arnt3), spośród których najważniejsze są kompleksy utworzone przez podjednostki HIF-1α i HIF-2α oraz HIF-1β (prace przeglądowe: Stachurska et al. 2010, **Loboda et al. 2010**; Loboda et al. 2012a; Loboda et al. 2014). Aktywne kompleksy HIF-1 i HIF-2 wykazują duże podobieństwo strukturalne, ale charakteryzują się odmiennym wzorem ekspresji i mogą oddziaływać z różnymi kofaktorami. HIF-1α jest powszechnie występującą izoformą, natomiast ekspresja HIF-2α jest tkankowo-specyficzna (np. czynnik ten występuje głównie w nerce). Istniejące niewielkie różnice strukturalne pomiędzy izoformami wynikają głównie z budowy specyficznej, N-końcowej domeny transaktywacyjnej (NAD, ang. *N-terminal transactivation domain*). To właśnie ta domena wpływa na specyficzność substratową izoform HIF-1α i HIF-2α. Z drugiej strony, domena C-końcowa (CAD) determinuje regulację wspólnej grupy genów, regulowanych zarówno przez HIF-1 jak i HIF-2.

Co ważne, pod wpływem obniżonego stężenia tlenu dochodzi do stabilizacji podjednostek α i oba czynniki HIF-1 oraz HIF-2 wiążą się do takiej samej sekwencji DNA (5'-(A/G) CGTG-3'), znanej jako element odpowiedzi na niedotlenienie (HRE, ang. *hypoxia response element*). Prowadzi to do przyłączenia szeregu kofaktorów i uruchomienia transkrypcji wielu genów, których produkty białkowe są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy tlenu i ułatwiają adaptację komórek do niekorzystnych warunków niedotlenienia. W procesie stabilizacji podjednostki HIF-α kluczową rolę odgrywają hydroksylazy prolinowe (PHD, ang. *prolyl hydroxylases*) - w warunkach normalnego stężenia tlenu dochodzi do hydroksylacji reszt prolinowych w podjednostkach α, co prowadzi do przyłączenia białka pVHL (ang. *von Hippel-Lindau*) i zależnej od ubikwityny proteasomowej degradacji HIF-1.

***Krótka charakterystyka czynnika transkrypcyjnego Nrf2***

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear erythroid 2-related factor*) pełni kluczowe funkcje w ochronie komórek przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego wynikającego z

podwyższonej produkcji RFT czy działania elektrofilnych metabolitów, ksenobiotyków i czynników rakotwórczych. W normalnych warunkach Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie związanej z białkiem cytoszkieletu Keap-1 (ang. *Kelch like-ECH-associated protein 1*). W warunkach stresowych, na skutek działania elektrofili czy RFT dochodzi do oddysocjowania Nrf2 z nieaktywnego kompleksu z Keap1, translokacji Nrf2 do jądra komórkowego i po związaniu do sekwencji ARE (z ang. *antioxidant redox element*) do aktywacji ekspresji genów, w tym reduktazy NAD(P)H: chinonowej 1 (NQO1, ang. *NAD(P)H quinone reductase 1*), S-transferazy glutationu (GST, ang. *glutathione S-transferase*) czy oksygenazy hemowej-1 (HO-1, ang. *heme oxygenase-1*). Ponadto, Nrf2 reguluje ekspresję molekularnych chaperonów/składników proteasomu, przenośników komórkowych, enzymów naprawczych DNA czy białek anty-zapalnych, co wpływa na eliminację związków toksycznych oraz wspomaga działanie enzymów odtruwających (prace przeglądowe: Florczyk et al. 2010; Loboda et al. 2012c).

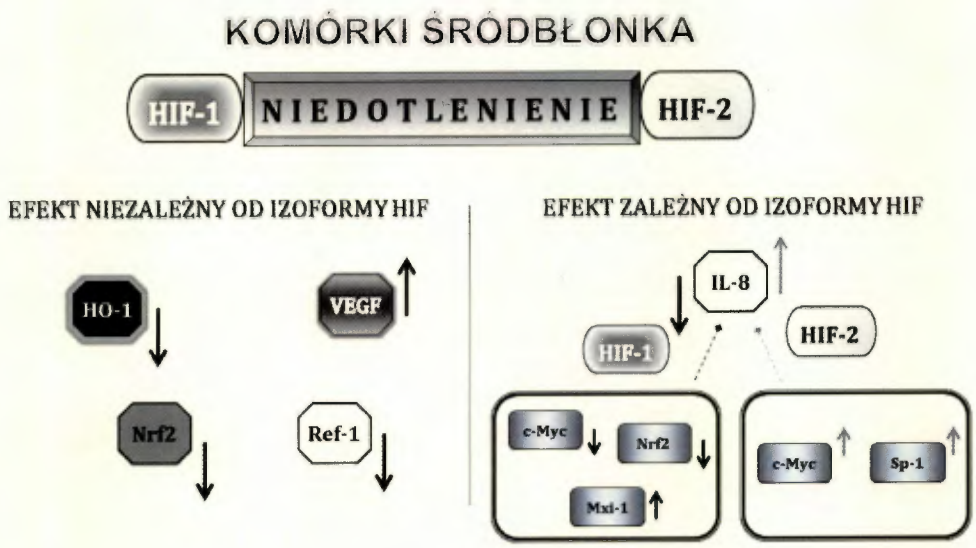
***Wpływ czynnika transkrypcyjnego HIF-1 na produkcję czynników angiogennych w komórkach śródbłonka.***

Około 2% wszystkich genów może być regulowane w sposób bezpośredni bądź pośredni przez czynnik HIF-1 (Manalo et al. 2005). Wiele prac wskazuje na zależną od HIF-1 indukcję ekspresji genów angiogennych, stymulujących wzrost naczyń krwionośnych. Taka regulacja wydaje się być naturalnym mechanizmem kompensującym niekorzystne działanie niedotlenienia – konieczna jest indukcja ekspresji czynników, które stymulują tworzenie naczyń krwionośnych a tym samym prowadzą do zwiększonego przepływu krwi czy dostarczenia składników odżywczych. Sztandarowym przykładem takiego czynnika angiogennego jest VEGF, którego ekspresja jest regulowana przez niedotlenienie na wielu poziomach – m.in. poprzez zwiększenie transkrypcji, stabilności mRNA oraz translacji.

W swoich badaniach sprawdzałam wpływ niedotlenienia, tzn. niskiego stężenia tlenu (0,5-2%) korzystając ze specjalnych komór hipoksyjnych bądź inkubatorów komórkowych z możliwością zmiany stężenia tlenu. Dodatkowo, w celu aktywacji czynników HIF wykorzystywałam związki, których działanie naśladuje niedotlenienie, np. dimetyloksalyglicynę (DMOG) czy N-oksalylglicynę (NOG), pochodne α-ketoglutaranu, blokujące (podobnie jak niskie stężenie tlenu) działanie PHD i stabilizujące podjednostkę HIF-α. Wykazałam, że wspomniane związki mogą być z powodzeniem używane w celu indukcji czynników HIF i badania zależnych od nich procesów **(Loboda et al. 2009a, Loboda et al. 2009b).**

Wyniki moich badań wskazują, iż poziom białka VEGF rośnie pod wpływem niedotlenienia jak i chemicznych aktywatorów czynnika HIF. Stymulacja DMOG (1 mM) prowadziła do około 9-krotnej indukcji ekspresji VEGF a traktowanie komórek innym analogiem α-ketoglutaranu, NOG (1 mM) powodowało około 2,5-krotne zwiększenie produkcji VEGF

**(Loboda et al. 2009a).** Co ciekawe, wyniki wcześniej przeprowadzonych przeze mnie badań wskazywały na ciekawą i odmienną od VEGF, regulację ekspresji łożyskowego czynnika wzrostu (PlGF, ang. *placenta growth factor*) pod wpływem niedotlenienia. Czynnik ten należy do rodziny czynników VEGF i ma działanie proangiogenne, jednak jak pokazały przeprowadzone przeze mnie analizy makromacierzy i PCR w czasie rzeczywistym, jego ekspresja ulegała obniżeniu w komórkach śródbłonka hodowanych przez 24h w atmosferze 1% $O_2$ (Loboda et al. 2006). Te zaskakujące wyniki skłoniły nas do przeanalizowania wpływu obniżonego stężenia tlenu na ekspresję innego czynnika produkowanego przez komórki śródbłonka - mediatora angiogenezy, zapalenia, wzrostu i przerzutowania nowotworów - interleukiny-8 (IL-8). Nasze badania wskazują, iż niedotlenienie i aktywacja czynnika transkrypcyjnego HIF pod wpływem chemicznych induktorów (DMOG, NOG) wpływają hamująco na ekspresję IL-8 w ludzkich komórkach śródbłonka mikronaczyń HMEC-1 **(Loboda et al. 2009a)**. Ponadto, dzięki transdukcji komórek wektorami adenowirusowymi ze stabilną formą HIF-1α i powodujących silną ekspresję tego czynnika również dochodziło do zahamowania produkcji IL-8. Wykazałam, iż te efekty są zależne od czynnika HIF-1α – zastosowanie małych RNA przeciwko HIF-1α (siRNA) odwracało obniżenie ekspresji IL-8 wywołane przez niedotlenienie. Co ważne, siRNA przeciwko HIF-1α odwracało również wpływ niedotlenienia na ekspresję VEGF **(Loboda et al. 2009a)**.Badania te wskazują na odmienną regulację ekspresji różnych czynników angiogennych – niedotlenienie i aktywacja czynnika HIF-1 może prowadzić do zwiększenia ekspresji niektórych białek proangiogennych, ale równocześnie poziom innych czynników o takim samym działaniu może ulegać obniżeniu. Sumaryczny efekt niedotlenienia może więc zależeć od relatywnej ekspresji poszczególnych czynników angiogennych w danym typie komórek **(Ryc. 1).**




***Ryc. 1.*** *Podsumowanie wpływu niedotlenienia i aktywacji różnych izoform czynników HIF na ekspresję genów angiogennych, antyoksydacyjnych i zaangażowanych w naprawę DNA.*

Co ważne, wyniki tych badań mogą mieć duże znaczenie kliniczne. Przykładowo, w leczeniu nowotworów jedną z proponowanych terapii jest terapia antyangiogenna, szczególnie terapia anty-HIF. Nasze oraz pojawiające się badania innych grup wyraźnie wskazują, że w niektórych warunkach hamowanie ekspresji/aktywności czynnika HIF-1 jako proponowane leczenie prowadzące do zahamowania tworzenia naczyń krwionośnych może być niewystarczające i powinno być połączone z innymi terapiami. Przykładowo, Mizukami i współpracownicy zaobserwowali, że w komórkach raka jelita grubego z wyłączonym genem HIF-1, pomimo hamowania VEGF, nie dochodzi do obniżenia odpowiedzi angiogennej ze względu na równoczesną indukcję ekspresji IL-8 (Mizukami et al. 2005). Ponadto, kolejne prace sugerują, że również inne związki o charakterze proangiogennym mogą przejmować funkcje VEGF w warunkach zahamowania jego ekspresji. Na przykład stwierdzono, że chociaż skuteczna we wczesnej fazie leczenia raka trzustki czy glejaka terapia hamowania receptora VEGFR-2 w końcu może prowadzić do ponownego wzrostu guza, z uwagi na aktywację innych szlaków angiogennych, takich jak szlak związany z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) (Casanovas et al. 2005, Paez-Ribes et al. 2009). Podczas leczenia czerniaka ludzkiego (Ebos et al. 2009) oraz glejaka (Norden et al. 2008; Lu et al. 2013) za pomocą inhibitorów receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, hamującej m.in. receptor VEGF obserwowano podobne problemy. Jednym z proponowanych mechanizmów odpowiedzialnych za niedostateczną odpowiedź nowotworu na to leczenie jest indukcja alternatywnych do VEGF czynników o charakterze proangiogennym, głównie bFGF, PDGF-C czy SDF-1α (Lu et al. 2013).

Jeśli, jak wykazały również moje badania, po zahamowaniu ekspresji czynnika HIF-1, zwiększa się poziom IL-8, końcowym wynikiem terapii anty-HIF-1 może nie być zmniejszenie produkcji czynników stymulujących wzrost naczyń krwionośnych, ale wręcz przeciwnie, może to prowadzić do zwiększonej produkcji określonych czynników angiogennych, jak np. IL-8. Równocześnie dochodzi co prawda do obniżenia ekspresji VEGF, jednak odmienna regulacja ekspresji IL-8 czy PlGF (moje badania) oraz innych czynników (np. bFGF, SDF-1α – na co wskazują inne prace) w warunkach niedotlenienia może wskazywać na kompensacyjny mechanizm prowadzący do nasilenia angiogenezy. Wyniki tych badań muszą być brane pod uwagę przy planowaniu nowych terapii leczenia np. nowotworów.

***Odmienne efekty czynników transkrypcyjnych HIF-1 i HIF-2 na regulację ekspresji genów angiogennych w komórkach śródbłonka***

Jak wspomniano na wstępie, choć podobne strukturalnie, czynniki HIF-1 i HIF-2 mogą cechować się swoistymi właściwościami, odmienną budową (szczególnie domeny NAD) i mogą oddziaływać z różnymi kofaktorami. Ostatnie badania pokazują również, że czynniki te wykazują

specyficzność w regulowaniu ekspresji genów docelowych (referencje w pracach przeglądowych: **Loboda et al. 2010;** Loboda et al. 2012a). Dzięki naszym badaniom stwierdziliśmy, że genem odmiennie regulowanym przez różne izoformy HIF jest też IL-8 **(Ryc. 1), (Loboda et al. 2009a; Florczyk et al. 2011).**

Obserwacje wskazujące na obniżenie ekspresji IL-8 przez czynnik HIF-1 w komórkach śródbłonka **(Loboda et al. 2009a)** skłoniły nas do sprawdzenia wpływu drugiego czynnika - HIF-2 na ekspresję czynników angiogennych, takich jak VEGF i IL-8. Wykazaliśmy, iż nadekspresja stabilnej formy czynnika HIF-2α powoduje zwiększenie ekspresji IL-8 na poziomie aktywności promotora, mRNA oraz białka **(Florczyk et al. 2011).** Dowiedliśmy, że w tej samej linii komórkowej, tj. w komórkach HMEC-1 nadekspresja HIF-1 i HIF-2 może wywierać całkowicie odmienny wpływ na ekspresję IL-8. Równocześnie, wyniki przeprowadzonych przez nas badań wskazują, że pewne geny, takie jak VEGF są regulowane w dokładnie ten sam sposób przez aktywację czynników HIF-1 i HIF-2. Wyniki tych doświadczeń poszerzają naszą wiedzę na temat specyficznej roli poszczególnych czynników HIF. Badania ostatnich lat wskazują bowiem, że istnieją geny, których ekspresja jest regulowana przez określoną izoformę, np. HIF-2 reguluje ekspresję Oct-4 (Covello et al. 2006) czy erytropoetyny (Rankin et al. 2007), zaś ekspresja enzymów glikolitycznych jest kontrolowana głównie przez czynnik HIF-1. Podsumowując, do listy czynników różnie/odmiennie regulowanych przez poszczególne izoformy czynnika HIF w komórkach śródbłonka mikronaczyń należy dodać też IL-8.

W zastosowanych przez nas warunkach hipoksji przeważa przede wszystkim aktywność HIF-1 i dlatego obserwujemy spadek produkcji IL-8. Niewykluczone, że działanie HIF-2 może się jednak przejawiać w innych warunkach. Wiadomo, że czynnik HIF-2 jest odpowiedzialny za regulację ekspresji genów w odpowiedzi na łagodne niedotlenienie (5% $O_2$), natomiast HIF-1 jest stabilizowany przy niższym stężeniu tlenu (Lofstedt et al. 2007). Sugeruje to, że ekspresja IL-8 może być odmiennie regulowana w komórkach narażonych na działanie różnego stężenia tlenu. Jak pokazały jednak nasze badania, zarówno pod wpływem 0,5% jak i 5% stężenia tlenu obserwowaliśmy aktywację HIF-1α oraz HIF-2α z równoczesnym spadkiem ekspresji IL-8, co sugeruje jednak silniejsze, nadrzędne działanie izoformy HIF-1α na ekspresję IL-8 w warunkach niedotlenienia, niezależnie od stężenia tlenu **(Florczyk et al. 2011).**

***Zależności między czynnikami transkrypcyjnymi HIF oraz Nrf2 w regulacji ekspresji genów angiogennych i antyoksydacyjnych***

W warunkach niedotlenienia, oprócz czynników HIF-1 i/lub HIF-2 może dochodzić do aktywacji/represji wielu innych czynników transkrypcyjnych. Na podstawie pojawiających się w literaturze sugestii o wzajemnych zależnościach między czynnikami HIF oraz Nrf2 (Kim et al. 2011) oraz faktu, że czynnik Nrf2 reguluje ekspresję czynników antyoksydacyjnych a w

warunkach niedotlenienia dochodzi do indukcji stresu oksydacyjnego przeprowadzono badania zmierzające do określenia współdziałania czynników HIF-1/HIF-2 i Nrf2 w regulacji ekspresji czynników angiogennych i antyoksydacyjnych **(Loboda et al. 2009a; Florczyk et al. 2011).**

Dane literaturowe podają, że ekspresja IL-8 może być regulowana przez czynnik Nrf2. (Zhang et al. 2005). Celem naszych badań było sprawdzenie, czy Nrf2 bierze udział w regulacji IL-8 w warunkach niedotlenienia. Wykazaliśmy, że aktywacja HIF poprzez zastosowanie DMOG czy nadekspresji HIF-1α powoduje zahamowanie ekspresji Nrf2 **(Loboda et al. 2009a).** Co więcej, udowodniliśmy, że to zahamowanie ekspresji Nrf2 a równocześnie indukcja jego represora, białka Bach1 występująca na skutek aktywacji HIF-1α prowadzi do obniżenia produkcji IL-8 **(Loboda et al. 2009a).**

Promotor IL-8 zawiera sekwencje, do których mogą wiązać się różne czynniki transkrypcyjne. Oprócz sekwencji ARE (ang. *antioxidant response element*) odpowiedzialnej za wiązanie czynnika Nrf2, obecne są w nim sekwencje wiążące m.in. czynniki NF-κB, AP-1 czy Sp-1 (Xie 2001). Hipotetycznie, wszystkie te czynniki mogą być zaangażowane w regulację ekspresji IL-8 podczas niedotlenienia czy też na skutek indukcji HIF-1α/HIF-2α. Spośród przebadanych czynników transkrypcyjnych (za pomocą przejściowej transfekcji plazmidami reporterowymi) po indukcji HIF-1α zaobserwowano spadek aktywności czynników AP-1 i NF-κB **(Loboda et al. 2009a).** Jak wspomniano powyżej, nadekspresja drugiej izoformy, HIF-2α powoduje zwiększenie ekspresji IL-8. Postawiliśmy więc hipotezę, iż może kryć się za tym indukcja Nrf2. Co ciekawe wykazaliśmy jednak, że czynnik Nrf2 nie jest zaangażowany w regulację ekspresji IL-8 zależną od czynnika HIF-2 **(Florczyk et al. 2011).** Obserwowaliśmy natomiast, że za wzrost ekspresji IL-8 pod wpływem HIF-2α odpowiedzialny jest czynnik Sp-1, aktywowany w komórkach HMEC-1 poddanych transdukcji wektorami adenowirusowymi z HIF-2α **(Florczyk et al. 2011).** Co więcej, efekt HIF-2α na ekspresję IL-8 był odwracany przez mitramycynę A, chemiczny inhibitor aktywności Sp-1.

Badania ostatnich lat wskazują na duży udział czynników z rodziny c-Myc w zależnej od HIF regulacji ekspresji genów. Pokazano, że HIF-2α zwiększa, natomiast HIF-1α obniża aktywność c-Myc poprzez modulowanie ekspresji Mxi-1, antagonisty c-Myc czy też przez wpływ na interakcję z czynnikiem Sp-1, koaktywatorem c-Myc (cytacje w pracy przeglądowej Loboda et al. 2012a). Z drugiej strony, Yoo i współpracownicy udowodnili, że zahamowanie ekspresji Mxi-1, antagonisty c-Myc prowadzi do zwiększenia ekspresji IL-8 (Yoo et al. 2007). Na podstawie tych danych literaturowych postawiliśmy hipotezę, iż różne efekty izoform HIF na produkcję IL-8 mogą wynikać z odmiennej regulacji białek c-Myc/Mxi-1 **(Ryc. 1).** Hipoteza ta okazała się być prawdziwa – wykazaliśmy, że niedotlenienie (0,5% $O_2$) powoduje zwiększenie ekspresji Mxi-1 i równocześnie prowadzi do spadku c-Myc, a związanie c-Myc do promotora IL-8 jest obniżane w warunkach niedotlenienia i aktywacji HIF-1α. Ponadto, zahamowanie ekspresji Mxi-1 przez

specyficzne siRNA prowadziło do odwrócenia hamującego wpływu niedotlenienia na ekspresję IL-8 **(Florczyk et al. 2011).**

Uzyskane wyniki wskazują zatem na zaangażowanie odmiennych czynników w regulację ekspresji IL-8 przez dwie formy HIF: zależne od HIF-1 zahamowanie ekspresji IL-8 jest spowodowane obniżeniem ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz aktywację Mxi-1, inhibitora c-Myc natomiast czynnik HIF-2 zwiększa ekspresję IL-8 w sposób niezależny od Nrf2, a poprzez indukcję Sp-1 oraz c-Myc. Podsumowując, w komórkach śródbłonka, w warunkach niedotlenienia pomimo stabilizacji obu izoform, HIF-1α oraz HIF-2α, przeważa aktywność HIF-1 i dochodzi do zahamowania ekspresji IL-8 na drodze zależnej od blokowania Nrf2 oraz c-Myc **(Loboda et al. 2009a, Florczyk et al. 2011).**

Jednym z genów regulowanych przez czynnik Nrf2 jest oksygenaza hemowa-1 (HO-1), kluczowy enzym uczestniczący w modulacji procesów zapalnych, białko o działaniu anty-apoptotycznym oraz antyutleniającym (praca przeglądowa: Loboda et al. 2008). Badania przeprowadzone przez nasz zespół wskazują również na jego kluczową rolę w regulacji ekspresji czynników angiogennych i procesu tworzenia nowych naczyń krwionośnych (Jozkowicz et al. 2003; Cisowski et al. 2005). Ciekawym zagadnieniem jest regulacja ekspresji HO-1 przez niedotlenienie. Wyniki naszych badań oraz rezultaty innych badaczy wskazują, że ekspresja HO-1 jest regulowana przez niskie stężenie tlenu a regulacja ta jest gatunkowo-zależna – u gryzoni dochodzi do indukcji, natomiast w większości przebadanych ludzkich komórkach obserwuje się spadek ekspresji HO-1 pod wpływem obniżonego stężenia tlenu (praca przeglądowa (Loboda et al. 2008). Przeprowadzone przez nas badania wskazują faktycznie na taką zależność – stymulacja ludzkich komórek śródbłonka aktywatorami HIF-1, DMOG i NOG, czy nadekspresja HIF-1α prowadziła do obniżenia ekspresji HO-1 **(Ryc. 1).** Z drugiej strony, w mysich fibroblastach NIH3T3 indukcja HIF powoduje zwiększenie ekspresji HO-1 **(Loboda et al. 2009a**).

Ponieważ ekspresja IL-8 może być regulowana przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 (Zhang et al. 2005) i jak pokazały nasze badania, zależne od HIF-1 zahamowanie ekspresji IL-8 jest spowodowane obniżeniem ekspresji Nrf2 **(Loboda et al. 2009a)** w kolejnym etapie badań skoncentrowaliśmy się na hipotetycznym udziale HO-1 w regulacji ekspresji IL-8. Co ciekawe w literaturze można znaleźć prace wskazujące na taką zależność. Ockaili i współpracownicy pokazali, że traktowanie komórek HMEC-1 inhibitorem hydroksylaz prolinowych aktywującym HIF, DMOG prowadzi do obniżenia syntezy IL-8 poprzez indukcję HO-1 (Ockaili et al. 2005). Wyniki te nie znajdują potwierdzenia w naszych badaniach. Przeprowadzone przez nasz zespół analizy wskazują na niezależną od HO-1 regulację ekspresji IL-8 w komórkach HMEC-1 – zarówno zahamowanie ekspresji HO-1 przez specyficzne siRNA jak również adenowirusowa nadekspresja HO-1 nie wpływała na regulację ekspresji IL-8 **(Loboda et al. 2009a).** Te

odmienne wyniki uzyskane przez dwa zespoły mogą wynikać z różnic w hodowli komórek czy specyficznych warunków przeprowadzenia doświadczeń. Niezależna od HO-1 modulacja ekspresji IL-8 jest odmienna od regulacji VEGF -badania naszego zespołu, w tym moje doświadczenia przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej oraz wynikające z udziału we wcześniejszych projektach wskazują, że ekspresja VEGF zależy od HO-1 (Cisowski et al. 2005; Loboda et al. 2005).

Podsumowując, regulacja Nrf2 przez HIF i niedotlenienie i jego udział w regulacji czynników angiogennych mogą być potencjalnie istotne w warunkach klinicznych, ze względu na postulowany wpływ Nrf2 w procesach tworzenia naczyń krwionośnych i rozwoju nowotworów. Powyższe wyniki wskazują na skomplikowaną regulację różnych czynników angiogennych w warunkach niedotlenienia i podkreślają zróżnicowanie udziału możliwych szlaków przekazu sygnału prowadzących do indukcji bądź zahamowania ekspresji danego czynnika angiogennego. Informacje te mogą być przydatne w opracowywaniu nowych terapii leczenia chorób zależnych od niedotlenienia i mogą wskazywać na nowe cele terapeutyczne np. w leczeniu nowotworów.

***Wpływ czynników HIF na ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA***

Jak wspomniano powyżej, znane jest wspólne działanie czynników HIF-1 oraz c-Myc w regulacji ekspresji czynników angiogennych. Podobną kooperację wykazano dla czynników c-Myc oraz Sp-1 oraz białek HIF w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za naprawę DNA. Wykazano, że ekspresja genów naprawczych takich jak MSH2, MSH6 i NBS1 ulega obniżeniu na skutek aktywacji osi HIF-1-c-Myc (To et al. 2005; Bindra et al. 2007). Koshiji i wsp. pokazali, że HIF-1α hamuje ekspresję MSH2 i MSH6 poprzez mechanizm zastępowania c-Myc przez Sp-1, który wiąże się z promotorami tych genów w warunkach niedotlenienia (Koshiji et al. 2005). Wyniki te wskazują, że niedotlenienie, poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych HIF w istotny sposób przyczynia się do zwiększenia niestabilności genetycznej.

Nasze badania dotyczyły innego białka o działaniu naprawczym – Ref-1 (ang. *redox factor-1*), endonukleazy biorącej udział w naprawie spontanicznych uszkodzeń DNA. Wykazaliśmy, iż niskie stężenie tlenu hamuje ekspresję Ref-1 w komórkach śródbłonka HMEC-1 **(Loboda et al. 2009b).** Co więcej, badanie wpływu specyficznych izoform HIF wskazało na podobny efekt HIF-1 i HIF-2 **(Ryc. 1).** Nadekspresja HIF-1α prowadziła do obniżenia ekspresji Ref-1 a użycie siRNA przeciwko tej izoformie HIF powodowało odwrócenie hamującego wpływu niedotlenienia na ekspresję badanej endonukleazy **(Loboda et al. 2009b)**. Podobną zależność obserwowaliśmy po transdukcji komórek HMEC-1 wektorami niosącymi cDNA dla stabilnej formy HIF-2α **(Loboda et al. 2010),** co wskazuje na niezależną od specyficznej izoformy HIF regulację czynnika Ref-1. Zauważyliśmy również, że pod wpływem aktywacji HIF dochodzi do

zmiany wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka Ref-1 – w warunkach normalnych lokowało się ono w jądrze komórkowym, ale pod wpływem aktywacji HIF wędrowało do cytoplazmy **(Loboda et al. 2009b).** Ta zmiana lokalizacji białka Ref-1 może być związana z jego działaniem antyoksydacyjnym. Wykazano w innych badaniach, że Ref-1 w komórkach śródbłonka może hamować produkcję $H_2O_2$ poprzez obniżenie ekspresji GTP-azy rac-1 (Angkeow et al. 2002). Lokalizację cytoplazmatyczną wykazano również dla komórek aktywnych metabolicznie: hepatocytów czy spermatocytów (Kakolyris et al. 1998). Co ważne, lokalizacja cytoplazmatyczna Ref-1 cechuje również komórki nowotworowe i może być negatywnym czynnikiem prognostycznym (Di Maso et al. 2007).

Zmniejszenie ekspresji genów regulujących naprawę DNA w warunkach niedotlenienia może być ważnym mechanizmem zaburzenia genetycznej stabilności np. podczas rozwoju nowotworu. Zaobserwowano, że podobnie jak w naszych badaniach, niedotlenienie powodowało obniżenie ekspresji Ref-1 w normalnych komórkach śródbłonka np. HUVEC czy CPAE (Hall et al. 2001) ale w komórkach raka szyjki macicy dochodziło do zwiększonej ekspresji tego czynnika (Hedley et al. 2004). Regulacja ekspresji Ref-1 przez niedotlenienie, szczególnie w aspekcie biologii nowotworów wydaje się więc bardzo ciekawym zagadnieniem.

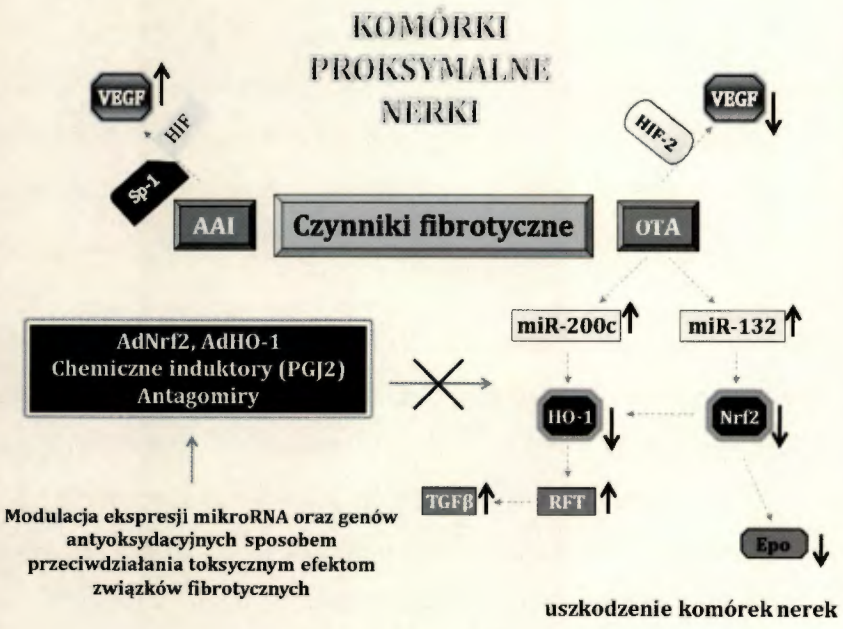
***Rola czynników transkrypcyjnych z rodziny HIF w regulacji ekspresji VEGF w komórkach proksymalnych nerki***

Jak wspomniano powyżej, jednym z lepiej poznanych genów angiogennych regulowanych przez czynnik HIF jest VEGF. Czynnik ten pełni istotne funkcje nie tylko w układzie krążenia, ale również w nerkach, gdzie odpowiada za utrzymanie prawidłowej przepuszczalności komórek nabłonkowych kłębuszków nerkowych. Wysoką ekspresję VEGF wykazano głównie w podocytach oraz w komórkach nabłonka kanalików nerkowych (Baderca et al. 2006). Zaburzenia ekspresji VEGF w komórkach kanalików stwierdzono w różnych chorobach nerek, np. w nefropatii cukrzycowej (Lindenmeyer et al. 2007).

Wyniki naszych badań, zrealizowanych w ramach kierowanego przez mnie projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N N401 297835), wskazują, że zaburzenie produkcji czynników angiogennych na drodze zależnej od czynników HIF prowadzące do zmian naczyniowych oraz dysfunkcji nerek obserwuje się również podczas niekorzystnego działania nefrotoksyn wywołujących włóknienie nerek – kwasu arystolochowego (AAI) oraz ochratoksyny A (OTA) **(Ryc. 2).**

Chociaż mechanizmy działania obu toksyn są badane przez różne grupy badawcze, niewiele wiadomo o ewentualnym zaangażowaniu czynników HIF w efekty wywoływane przez AAI oraz OTA. Biorąc pod uwagę fakt, iż ważnym aspektem włóknienia nerek jest rozwijające się

niedotlenienie, określenie zaangażowania specyficznych izoform HIF-α podczas rozwoju zwłóknienia jest ważnym zagadnieniem, również z klinicznego punktu widzenia.




***Ryc. 2.*** *W komórkach proksymalnych nerki, czynniki HIF są zaangażowane w regulację ekspresji VEGF pod wpływem działania różnych czynników nefro-toksycznych. Dodatkowo, zmiany w regulacji ekspresji mikroRNA prowadzą do zaburzenia odpowiedzi anty-oksydacyjnej, spadku ekspresji białek anty-utleniających Nrf2 i HO-1, co prowadzi do indukcji ekspresji TGFβ, wzrostu RFT a finalnie prowadzi do uszkodzenia nerek.*

Nasze badania wskazują na odmienną regulację ekspresji VEGF pod wpływem badanych toksyn. W świńskich komórkach proksymalnych nerki LLC-PK1 obserwowaliśmy zwiększenie transkrypcji oraz translacji VEGF pod wpływem AAI. Co ciekawe, traktowanie komórek drugą toksyną, OTA wywierało zupełnie odwrotny efekt, prowadząc do zahamowania produkcji VEGF **(Stachurska et al. 2011).** Przeprowadziliśmy również badania *in vitro* na innym typie komórek – pierwotnych mysich komórkach kanalików proksymalnych czy *in vivo*, analizując wpływ OTA na ekspresję VEGF w nerkach myszy C57Bl/6xFvB. W obu przypadkach OTA hamowała ekspresję VEGF (dane niepublikowane). Nasze dalsze badania skoncentrowały się na określeniu potencjalnego udziału czynników HIF w regulacji ekspresji VEGF pod wpływem badanych toksyn. W kolejnym etapie badań wykazaliśmy, że pod wpływem OTA dochodzi do obniżenia wiązania czynników HIF do sekwencji HRE oraz do spadku ekspresji obu izoform – HIF-1α oraz HIF-2α **(Stachurska et al. 2011).** Dysponując wektorami adenowirusowymi z sekwencjami kodującymi stabilne białka HIF-1α oraz HIF-2α, pokazaliśmy, że tylko HIF-2α odwracał hamujący wpływ OTA na poziom VEGF. Ponadto, niedotlenienie przeciwdziałało obniżeniu produkcji VEGF spowodowanego przez OTA **(Stachurska et al. 2011).** Wyniki te świadczą o zdecydowanie większej roli czynnika HIF-2α a nie HIF-1α w toksyczności OTA w komórkach proksymalnych nerki i sugerują, iż czynnik ten może działać protekcyjnie i może być używany jako czynnik terapeutyczny w leczeniu niektórych chorób nerek. Pamiętać jednak należy, że długotrwała indukcja HIF-2α i znaczne zwiększenie ekspresji VEGF może wywołać negatywne skutki, nasilając włóknienie czy promując nowotworzenie. W ostrych uszkodzeniach nerek,

można rozważyć użycie nadekspresji HIF-2α jako strategii terapeutycznej w celu kompensacji niekorzystnych efektów działania wybranych nefrotoksyn, ale podejście takie wymaga dalszych, wnikliwych badań.

Co ciekawe, nasze analizy wskazują, że HIF-1 oraz inny czynnik transkrypcyjny, Sp-1 są ważnymi mediatorami działania drugiej badanej przez nas toksyny, AAI, prowadząc do indukcji ekspresji VEGF w komórkach LLC-PK1. Wykazaliśmy, że pod wpływem AAI dochodzi do indukcji ekspresji HIF-1α oraz HIF-2α oraz zwiększonego wiązania HIF do sekwencji HRE, co prowadzi do nasilonej transkrypcji VEGF. Ponadto, żeby pokazać bezpośrednią zależność między obserwowanym wzrostem produkcji VEGF a aktywacją/stabilizacją HIF pod wpływem AAI, zastosowaliśmy chetomin, chemiczny inhibitor przyłączania kofaktora p300/CBP do HIF a tym samym blokujący aktywność HIF. Zwiększona pod wpływem AAI produkcja VEGF była obniżana przy równoczesnej stymulacji chetominem, sugerując faktycznie zaangażowanie w regulację VEGF czynników z rodziny HIF **(Stachurska et al. 2011).** Wiele innych czynników transkrypcyjnych poza rodziną białek HIF, np. Sp-1, AP-1 i NF-κB, może regulować ekspresję VEGF. Spośród nich ciekawym w aspekcie zmian fibrotycznych wywoływanych przez AAI i OTA jest Sp-1. Czynnik ten, zaangażowany w wiele procesów komórkowych, takich jak regulacja cyklu komórkowego, różnicowanie i angiogeneza, może również regulować ekspresję głównego czynnika pro-fibrotycznego - transformującego czynnika wzrostu - β (TGF-β, ang. *transforming growth factor*). Dane te sugerują, iż aktywacja/dezaktywacja czynnika Sp-1 może odgrywać ważną rolę w efektach czynników fibrotycznych. Faktycznie, udało nam się wykazać, że obserwowany w komórkach proksymalnych nerki wzrost ekspresji VEGF pod wpływem AAI jest też zależny od aktywacji czynnika Sp-1. Zahamowanie aktywności czynnika Sp-1 za pomocą mitramycyny A powodowało obniżenie indukowanej przez AAI ekspresji VEGF – zarówno aktywności promotora VEGF, poziomu mRNA oraz białka **(Stachurska et al. 2011).**

Wyniki wskazujące na indukcję ekspresji VEGF pod wpływem AAI znajdują potwierdzenie w danych literaturowych, ale można znaleźć również odmienne doniesienia. U szczurów, u których wywoływano ostrą (Wen et al. 2008) czy chroniczną (Sun et al. 2006) nefropatię arystolochową obserwowano spadek ekspresji VEGF. Z drugiej jednak strony w nekrozie komórek tubularnych wywołanych AAI (tzw. AA-ATN - *AA-induced acute tubular necrosis*) ekspresja VEGF była podwyższona (Yang et al. 2007). Należy jednak pamiętać, że nasze badania, przeprowadzone *in vitro*, na linii komórek proksymalnych nerki, nie mogą być bezpośrednio porównywane z badaniami *in vivo*, gdzie określano wpływ AAI w nerce, zbudowanej z różnych typów komórek.

Podsumowując, wykazaliśmy, że czynniki HIF odgrywają dużą rolę w regulacji ekspresji VEGF w komórkach proksymalnych nerki, i co ciekawe, efekt – zahamowanie lub aktywacja HIF-zależą np. od rodzaju toksyny wywołującej zmiany w poziomie VEGF **(Ryc. 2).**

***Rola czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w regulacji ekspresji genów w komórkach proksymalnych nerki***

Jednym z możliwych mechanizmów toksyczności związków wywołujących uszkodzenia nerek są zaburzenia systemu antyoksydacyjnego związane ze zwiększoną produkcją RFT czy zahamowaniem ekspresji/aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Czynnik transkrypcyjny Nrf2 pełni ważne funkcje w nerkach, o czym świadczyć mogą np. badania na myszach Nrf2$^{-/-}$ wskazujące na większą podatność zwierząt na działanie toksycznych substancji oraz zmniejszony potencjał przeciwutleniający. Biorąc pod uwagę spektrum regulowanych przez Nrf2 genów, w tym genów detoksykacyjnych, upośledzenie aktywności Nrf2 czy regulowanej przez ten czynnik HO-1 może odgrywać bardzo dużą rolę w komórkach proksymalnych nerki narażonych na bezpośrednie działanie toksycznych substancji. Można postulować, że modulacja ekspresji tych protekcyjnych czynników i przeciwdziałanie np. spadkowi ich ekspresji będą korzystne dla funkcjonowania uszkodzonych komórek.

Wyniki naszych badań wskazują, że zahamowanie ekspresji genów antyoksydacyjnych, Nrf2 i HO-1 może być ważnym mechanizmem działania OTA, toksyny o charakterze czynnika pro-fibrotycznego **(Boesch-Saadatmandi et al. 2008; Stachurska et al. 2013), (Ryc. 2).** Ponadto, spadek ekspresji lub aktywności innych enzymów antyoksydacyjnych regulowanych przez czynnik Nrf2 – np. transferazy S-glutationu czy dysmutazy ponadtlenkowej jest ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za toksyczne efekty OTA **(Boesch-Saadatmandi et al. 2008)**. Wyniki te wskazują, że wywoływanie zaburzeń w prawidłowo działającym systemie antyoksydacyjnym jest ważnym aspektem działania związków o charakterze pro-fibrotycznym. W związku z tym, nasze badania skoncentrowały się w dalszym etapie na próbie przeciwdziałania toksycznym efektom OTA poprzez modulację ekspresji HO-1 czy Nrf2. Poprzez zastosowanie chemicznych aktywatorów czy też wektorów adenowirusowych AdNrf2 czy AdHO-1 wykazaliśmy, że zwiększenie ekspresji powyższych czynników przeciwutleniających przeciwdziała efektom badanej toksyny **(Stachurska et al. 2013).** Po pierwsze zaobserwowaliśmy, że chemiczna indukcja aktywności Nrf2 za pomocą prostaglandyny J2 (PGJ2) obniża wywołany przez OTA wzrost ekspresji profibrotycznego czynnika TGFβ-1. Efekty nadekspresji Nrf2 za pomocą wektorów adenowirusowych były bardziej widoczne – odwracany był nie tylko wpływ OTA na indukcję TGFβ, ale również możliwe było częściowe przeciwdziałanie spadkowi ekspresji HO-1 czy erytropoetyny. Podobne efekty wywoływało zastosowanie AdHO-1 – zwiększenie ekspresji HO-1 obniżało wywołany przez OTA wzrost ekspresji TGFβ-1 czy TGFβ-2. Z drugiej strony, zastosowanie protoporfiryny cyny (SnPPIX), inhibitora aktywności HO-1 prowadziło do nasilenia ekspresji profibrotycznych genów Nasze badania wykazały również, że w przypadku zastosowania wysokich, toksycznych dawek OTA,

nadekspresja Nrf2 i HO-1 powoduje przeciwdziałanie spadkowi żywotności oraz zwiększenia produkcji RFT **(Stachurska et al. 2013).**

Podsumowując, dzięki zastosowaniu chemicznych inhibitorów/aktywatorów Nrf2/HO-1 czy strategii nadekspresji Nrf2 oraz HO-1 przy pomocy wektorów adenowirusowych precyzyjnie określono rolę tych czynników w regulacji ekspresji genów w komórkach proksymalnych nerki oraz ich wpływ na zapobieganie zmianom wywoływanym przez OTA. Nasze dalsze badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu Nrf2 oraz HO-1 potwierdzają znaczenie tych białek w rozwoju chorób nerek spowodowanych ekspozycją na OTA. Ponadto u myszy, które były równocześnie traktowane aktywatorem Nrf2 i HO-1, protoporfiryną kobaltu (CoPPIX) obserwowaliśmy odwrócenie efektów OTA na ekspresję genów profibrotycznych, prozapalnych czy antyoksydacyjnych (Łoboda et al., praca w przygotowaniu).

***Rola mikroRNA w regulacji ekspresji systemu Nrf2/HO-1 i próby modulacji ich ekspresji jako metoda przeciwdziałania rozwojowi chorób***

Jak wspomniano powyżej, nasze badania wskazują na kluczową rolę czynników antyoksydacyjnych takich jak Nrf2 czy HO-1 na ekspresję genów uruchamiających szlak związany z rozwojem włóknienia. Ponieważ badania ostatnich lat wskazują na doniosłą rolę mikroRNA (miRNA), małych, niekodujących RNA, w regulacji ekspresji genów, moje zainteresowania badawcze skoncentrowały się na próbie sprawdzenia zależności między modulacją ekspresji czynników antyoksydacyjnych a mikroRNA. Temat ten był realizowany z kierowanego przeze mnie grantu z programu Iuventus Plus finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (IP2011 031071).

Istnieje wiele dowodów no to, że miRNA regulują różne procesy biologiczne w tym proliferację, różnicowanie czy apoptozę, co może mieć znaczenie w warunkach fizjologicznych, ale ostatnio sugeruje się ich znaczną rolę w różnych stanach chorobowych. Wiele miRNA jest regulowanych przez specjalne warunki panujące w danych stanach patologicznych. Zidentyfikowano miRNA, których ekspresja ulega zmianom np. pod wpływem niedotlenienia i dąży się do ich zastosowania jako potencjalnych biomarkerów chorób takich jak nowotwory (Ciesla et al. 2011). Dostępne są również dane literaturowe wskazujące na zaangażowanie specyficznych miRNA w chorobach nerek, np. w rozwoju włóknienia. Kato i wsp. pokazali, że ekspresja miR-192 oraz miR-200b/c ulega zwiększeniu w kłębuszkach nerkowych myszy z cukrzycą typu 1 i typu 2 jak również w hodowanych *in vitro* komórkach mezangialnych stymulowanych TGF-β1 (Kato et al. 2007, Kato et al. 2011). Z drugiej strony, nadekspresja pewnych miRNA może przeciwdziałać chorobom nerek. Wyniki badań przeprowadzonych przez grupę Wang i wsp. sugerują, iż miR-200a hamuje zwłóknienie nerek poprzez zahamowanie ekspresji TGF-β2 (Wang et al. 2011). Mechanizm działania innego miRNA z rodziny miR-200,

miR-200c może wiązać się z regulacją ekspresji E-kadheryny, czynnika anty-fibrotycznego (Tryndyak et al. 2010).

Pomimo obszernej wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do rozwoju włóknienia, badania łączące aspekty wzajemnej regulacji miRNA oraz białek antyoksydacyjnych w takich warunkach, stanowią nowatorskie zagadnienie. Podobnie, chociaż sugerowano udział różnych miRNA w rozwoju włóknienia nerek, nie ma żadnych danych dotyczących roli miRNA w toksyczności OTA. Nasze badania przeprowadzone na komórkach LLC-PK1 wskazują, że zmiany ekspresji miRNA są ważnym mechanizmem działania OTA i są one odpowiedzialne za obserowane różnice w ekspresji Nrf2 i regulowanej przez ten czynnik HO-1. Pod wpływem OTA obserwowaliśmy wzrost poziomu całej puli miRNA oraz ich prekursorów, tzw. pre-miRNA oraz podwyższenie ekspresji białek odpowiedzialnych za dojrzewanie miRNA, takich jak DGCR8 czy Lin28 **(Stachurska et al. 2013)**. Co istotne, nasze badania koncentrujące się na wyselekcjonowanych miRNA, których miejsce wiązania są obecne w sekwencjach 3'UTR w Nrf2 czy HO-1 wskazują na ważny ich udział w regulacji ekspresji genów antyoksydacyjnych. Spośród zbadanych przez nas miRNA stwierdziliśmy, że spadek eskpresji genów antyoksydacyjnych jest związany ze wzrostem ekspresji m.in. miR-132 (może wiązać się do sekwencji Nrf2) oraz miR-200c (sekwencja wiążąca w genie HO-1). Co szczególnie ważne, zastosowanie specyficznych antagomirów, tzn. anti-miR-132 oraz anti-miR-200c częściowo przeciwdziałało wywołanemu przez OTA spadkowi Nrf2 (tylko anti-miR-132), wzrostowi RFT i TGFβ-2 (oba antagomiry) **(Stachurska et al. 2013).**

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że obniżenie ekspresji Nrf2 i HO-1 jest wynikiem zwiększonej ekspresji miR-132 i miR-200c a zahamowanie ekspresji tych miRNA pozwala na przeciwdziałanie toksycznym efektom OTA. Te wyniki wskazują na ważną rolę czynników antyoksydacyjnych takich jak Nrf2 i HO-1 w przeciwdziałaniu toksycznym efektom związków o charakterze pro-fibrotycznym, np. OTA.

Regulacja ekspresji miRNA może odbywać się nie tylko poprzez zastosowanie odpowiednich antagomirów (hamowanie ekspresji) czy wprowadzanie specyficznych prekursorów miRNA (zwiększenie ekspresji). Modulacja ich ekspresji poprzez zastosowanie naturalnych związków, znanych ze swych protekcyjnych właściwości wydaje się być bardzo korzystną strategią mogącą znaleźć wykorzystanie w leczeniu różnych jednostek chorobowych. Przykładowo wykazaliśmy, że kwercetyna, flawonoid o dobrze udokumentowanych właściwościach przeciwzapalnych prowadzi do indukcji ekspresji protekcyjnych Nrf2 i HO-1. Co ciekawe, udowodniliśmy, że równocześnie kwercetyna obniża ekspresję miR-155, mikroRNA znanego z regulacji procesów zapalnych (Boesch-Saadatmandi et al. 2011). Coraz więcej wiadomo również na temat regulacji miRNA przez inne aktywatory Nrf2, np. kurkuminę czy

CDDO. Wiadomości te przedstawiłam w jednym z rozdziałów pracy przeglądowej (Loboda et al. 2012c).

Badanie dokładnej roli miRNA w różnych jednostkach chorobowych, określanie ich wpływu na ekspresję genów, poszukiwanie nowych targetów dla miRNA w a końcu poszukiwanie związków, regulujących ekspresję poszczególnych miRNA pogłębia naszą wiedzę na temat patogenezy wielu chorób, i przede wszystkim może stanowić nowy cel interwencji terapeutycznych.

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

W niniejszej części omówiłam wybrane aspekty moich prac badawczych, których wyniki nie zostały włączone do rozprawy habilitacyjnej. Prace te są wynikiem udziału w licznych projektach oraz badań prowadzonych we współpracy z krajowymi oraz zagranicznymi grupami naukowymi. Wszystkie opisane badania były przeprowadzone po uzyskaniu doktoratu, cytowane prace, związane z realizacją tych projektów również powstały po obronie doktoratu.

***Temat badawczy: Rola polimorfizmu apolipoproteiny E w medycynie regeneracyjnej.***

W ramach kierowanego przeze mnie projektu pod podanym wyżej tytułem, finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu POMOST (POMOST-2010/5-8) badamy czy i jak polimorfizm apolipoproteiny E (ApoE) wpływa na ekspresję genów angiogennych i zapalnych *in vitro* oraz na procesy regeneracyjne, np. na gojenie ran *in vivo*. ApoE odgrywa ważną rolę w metabolizmie cholesterolu i trójglicerydów i występuje w postaci trzech znanych izoform ApoE2, ApoE3 i ApoE4. W swoich badaniach wykazałam, że mysie makrofagi z nadekspresją ApoE4 cechują się wyższą ekspresją cytoprotekcyjnej i proangiogennej HO-1 (Jofre-Monseny et al. 2007). W dalszym etapie prac pokazaliśmy, że również ekspresja głównego mediatora tworzenia naczyń krwionośnych, VEGF, jest najwyższa w komórkach z nadekspresją ApoE4. Ponadto ekspresja innych czynników proangiogennych, takich jak MMP-9, SDF-1, CXCR4 oraz NO była podwyższona w makrofagach z nadekspresją ApoE4. Wyniki te pozwoliły na postawienie hipotezy o korzystnym wpływie izoformy E4 na procesy regeneracyjne. Wyniki naszych analiz sugerują, że różnice w ekspresji powyższych czynników związane są z różnym poziomem specyficznych mikroRNA, np. z obniżeniem ekspresji miR-200c. W badaniach *in vivo*, polegających na badaniu tempa gojenia ran oraz określania udziału poszczególnych mediatorów tego procesu w różnych dniach po zranieniu u myszy typu knock-in, z ekspresją ludzkiej izoformy ApoE mają zweryfikować wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* i są obecnie w toku.

Wyniki tego projektu były wielokrotnie przedstawiane przeze mnie bądź przez osoby uczestniczące w realizacji projektu zarówno w formie prezentacji ustnych jak i plakatów na

polskich i międzynarodowych konferencjach. Obecnie przygotowujemy też pracę oryginalną podsumowującą przeprowadzone do tej pory badania.

*Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:*

1. Jofre-Monseny L, **Loboda A.** Wagner AE, Huebbe P, Boesch-Saadatmandi C, Jozkowicz A, Minihane AM, Dulak J, Rimbach G. Effects of apoE genotype on macrophage inflammation and heme oxygenase-1 expression. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 357: 319-324. *$IF_{2007}$ – 2,648*

***Temat badawczy: Rola oksygenazy hemowej-1 w rozwoju zwyrodnienia stawów***

Zwyrodnienie stawów jest przewleką chorobą zapalną, podczas której dochodzi do zapalenia błony maziowej stawów, co prowadzi do degradacji chrząstki podstawowej i kości. Ze względu na dobrze udokumentowane anty-zapalne efekty HO-1, coraz więcej badań koncentruje się na poznaniu protekcyjnego działania tego enzymu w różnych modelach chorób zapalnych, w tym chorób stawów. Do badań tych najczęściej używa się chemicznych inhibitorów bądź stymulatorów ekspresji/aktywności HO-1. Co ciekawe, chociaż wykazano, że w mysim modelu zapaleniu stawów wywołanym kolagenem indukcja HO-1 za pomocą protoporfiryny kobaltu (CoPPIX) znanego induktora HO-1 prowadzi do zahamowania produkcji głównych mediatorów toczącego się procesu zapalnego, PGE2, IL-1β czy TNF-α i zmniejszenia objawów zapalenia, to jednak takie same efekty zaobserwowano po podaniu inhibitora HO-1, protoporfiryny cyny (SnPPIX) (Devesa et al. 2005). Wyniki te wskazują, iż używanie chemicznych stymulatorów/inhibitorów HO-1 może być obarczone efektami ubocznymi wspomnianych związków. Znacznie lepszym modelem badawczym są myszy pozbawione genu HO-1 i w takim modelu wykazaliśmy, iż występowanie i nasilenie objawów zwyrodnienia stawów jest zwiększone u myszy pozbawionych jednego bądź obu alleli genu HO-1 w porównaniu do myszy $HO\text{-}1^{+/+}$. Wykorzystując technologię *Luminex* w celu określenia poziomu czynników angiogennych i zapalnych w surowicy myszy, pokazaliśmy, iż szereg mediatorów wspomnianego procesu, w tym MMP-3, MCP-1, PAI-1 czy E-selektyna były znacznie podniesione u chorych myszy $HO\text{-}1^{-/-}$. Z drugiej strony ekspresja czynnika angiogennego VEGF oraz niektórych cytokin takich jak IFNγ była obniżona w porównaniu do myszy $HO\text{-}1^{+/+}$ oraz $HO\text{-}1^{+/-}$.

Wyniki tych badań mogą mieć znaczenie kliniczne, bowiem w populacji ludzkiej istnieje polimorfizm genu HO-1 charakteryzujący się wyższą lub niższą ekspresją tego czynnika. Istnieją przesłanki wskazujące, iż pacjenci z genotypem SS i wyższą ekspresją HO-1 mają lepsze rokowania niż pozostali chorzy z zapaleniem stawów. Badania świadczące o większej wrażliwości myszy pozbawionych jednego bądź dwóch alleli HO-1 na rozwój zwyrodnienia

stawów mogą stanowić odniesienie do populacji ludzkiej i pozwalają na lepsze zrozumienie opisywanych mechanizmów.

*Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:*


1. Brines R, Maicas N, Ferrándiz ML, **Loboda A.** Jozkowicz A, Dulak J, Alcaraz MJ. Heme oxygenase-1 regulates the progression of K/BxN serum transfer arthritis. *PloS One, 2012; 7: e52435. $IF_{2011}$ – 4,092;*

2. **Loboda A.** Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal, 2008 Oct;10(10):1767-812, Review. $IF_{2008}$ – 6,190,*


***Temat badawczy: Rola oksygenazy hemowej-1 w rozwoju nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem roli mikroRNA***

HO-1 oprócz funkcji cytoprotekcyjnych, antyapoptotycznych i antyzapalnych odgrywa ważną rolę w angiogenezie. Wykazaliśmy, że proangiogenne działanie HO-1 jest związane ze stymulacją produkcji głównego czynnika zaangażowanego w tworzenie naczyń krwionośnych – VEGF (Jozkowicz et al. 2003; Cisowski et al. 2005). Wiadomo, że HO-1 jest indukowana przez liczne czynniki powodujące stres oksydacyjny, do których należą z pewnością stosowane w leczeniu nowotworów chemioterapia, radioterapia czy terapia fotodynamiczna. Podwyższona ekspresja HO-1 w wielu rodzajach nowotworów może być czynnikiem ograniczającym skuteczność terapii. Badania, w których brałam udział wskazują, że HO-1 może też być czynnikiem blokującym różnicowanie komórek nowotworowych, a tym samym może zmniejszać efektywność terapii różnicujących, stosowanych lub planowanych w leczeniu takich nowotworów jak np. mięsak prążkowanokomórkowy. Wykazaliśmy, że HO-1 pełni istotną rolę w regulacji ekspresji mikroRNA, zaangażowanych m.in. w procesy różnicowania komórek macierzystych. Zaburzenie tych procesów przez podwyższoną aktywność HO-1 może sprzyjać transformacji nowotworowej komórek macierzystych i jak sugerują nasze najnowsze badania, może być jednym z czynników inicjujących i/lub nasilających rozwój mięsaka prążkowanokomórkowego (Kozakowska et al. 2012).

Badania roli HO-1 w regulacji ekspresji mikroRNA przeprowadziliśmy również w innym modelu badawczym, wykorzystując komórki niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H292. Wykazaliśmy, że nadekspresja HO-1 co prawda zwiększa całkowitą ilość mikroRNA, ale, co szczególnie ważne, reguluje ekspresję specyficznych miRNA, ważnych dla rozwoju nowotworu. W komórkach raka płuca HO-1 powoduje spadek ekspresji miRNA przyczyniających się do wzrostu i angiogenezy nowotworu i równocześnie prowadzi do wzrostu ekspresji poziomu mikroRNA hamujących wzrost nowotworu (Skrzypek et al. 2013). Nasze badania pokazały, że miR-378, mikroRNA o działaniu pro-onkogennym i pro-angiogennym było najbardziej obniżone

w komórkach z nadekspresją HO-1. W dalszych etapach badań udowodniliśmy, przeprowadzając również badania *in vivo*, że HO-1 obniża, a miR-378 zwiększa potencjał nowotworowy i angiogenny niedrobnokomórkowego raka płuca. Badania te mogą mieć duże zastosowanie kliniczne, bo wskazują, że w tym typie nowotworu wyższa ekspresja HO-1, obniżająca poziom pro-onkogennego i proangiogennego miR-378, może być korzystna dla pacjentów. Tematyka rozwoju nowotworów, roli miRNA ale również niedotlenienia zaowocowały nie tylko pracami oryginalnymi, ale również kilkoma pracami przeglądowymi, w których opisywałam nasze doświadczenia jak również obowiązujący stan wiedzy na ten temat.

*Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:*

1. Tertil M, Skrzypek K, **Łoboda A*.** Signaling and structural abnormalities in tumor angiogenesis. *In: Angiogenesis and vascularisation – cellular and molecular mechanisms in health and diseases, Edited by Jozef Dulak, Alicja Jozkowicz, Agnieszka Loboda, Publisher: Springer, 2014, ISBN: 978-3-7091-1427-8, * autor korespondencyjny, współedytor książki*

2. Skrzypek K, Tertil M, Golda S, Ciesla M, Weglarczyk K, Collet G, Guichard A, Kozakowska M, Boczkowski J, Was H, Gil T, Kuzdzal J, Muchova L, Vitek L, **Loboda A,** Jozkowicz A, Kieda C, Dulak J. Interplay between heme oxygenase-1 and miR-378 affects non-small cell lung carcinoma growth, vascularization and metastasis. *Antioxid Redox Signal. 2013; 19: 644-660 $IF_{2012}$ – 7,189;*

3. Kozakowska M, Ciesla M, Stefanska A, Skrzypek K, Was H, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Szymula A, Sierpniowska A, Mazan M, Yagensky O, Lemke K, Florczyk U, Zebzda A, Dyduch G, Nowak WN, Szade K, Stepniewski J, Majka M, Derlacz R, **Loboda A,** Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxid Redox Signal. 2012; 16: 113-127 $IF_{2012}$ – 7,189;*

4. **Loboda A*,** Was H, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Hypoxia-driven angiogenesis and other means of blood vessel formation in tumours – implication for anti-tumour therapy *In: Tumor Hypoxia: Molecular Mechanisms and Clinical Implications., Edited by Silvia Pastorekova and Jaromir Pastorek, Publisher: VEDA & ELSEVIER, 2012, pp. 160-194, ISBN: 978-80-224-1261-2, * autor korespondencyjny*

***Temat badawczy: Badanie aktywatorów czynnika transkrypcyjnego Nrf2 – aspekty chemicznej modyfikacji cząsteczek.***

Jedną z metod stosowanych w celu zahamowania, odwrócenia lub opóźnienia rozwoju nowotworu jest chemoprewencja. Pomimo badania wielu czynników, zarówno syntetycznych związków chemicznych jak i składników naturalnie występujących w przyrodzie, wciąż dąży się do poszukiwania związków lepiej działających – tzn. cechujących się lepszą biodostępnością, działających w niższym stężeniu czy wykazujących mniej skutków ubocznych.

Jedną z lepiej poznanych grupą związków, które aktywują czynnik Nrf2 są triterpenoidy z naturalnie występującym kwasem oleanowym oraz jego syntetycznymi pochodnymi takimi jak CDDO, jego ester metylowy (CDDO-Me) czy pochodna imidazolowa (CDDO-Im). Wciąż dąży się

do opracowania nowych pochodnych kwasu oleanowego. We współpracy z chemikami, prof. Lucjuszem Zaprutko oraz dr Barbarą Bednarczyk-Cwynar z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, którzy zsyntetyzowali nowe związki, pochodne kwasu oleanowego, przeprowadziliśmy badania biochemiczne sprawdzające wpływ tych nowych syntetycznych pochodnych na ekspresję czynnika Nrf2 i regulowanych przez niego genów. Dzięki tym badaniom, udało nam się wyselekcjonować trzy nowe pochodne kwasu oleanowego, które znacznie zwiększały ekspresję białka i aktywność czynnika Nrf2 oraz ekspresję regulowanej przez Nrf2 oksygenazy hemowej-1 (Loboda et al. 2012c). Ciekawym aspektem naszych badań były również spostrzeżenia, że wpływ triterpenoidów na aktywację czynnika Nrf2 może być komórkowo-zależny. Te same związki prowadziły do indukcji czynnika Nrf2 w linii komórek HMEC-1 ale nie nasilały aktywacji Nrf2 w ludzkich keratynocytach HaCaT (Loboda et al. 2012c).

Innym aspektem podobnych badań związanych z chemiczną obróbką związków był udział w projekcie dotyczącym modyfikacji kurkuminy, związku o działaniu anty-oksydacyjnym i antyzapalnym, używanym jako lek przeciwnowotworowy, np. w leczeniu nowotworu okrężnicy. We współpracy z grupą prof. Marii Nowakowskiej z Wydziału Chemii UJ, która opracowała nową, liposomową formę kurkuminy przetestowaliśmy biologiczne działanie liposomowej formy, która wnikała szybciej do komórek melanoma B16F10 oraz wykazywała lepszy efekt cytotoksyczny niż wolna kurkumina, wskazując na lepszą biodostępność formy liposomowej (Karewicz et al. 2013).

*Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:*

1. Karewicz A, Bielska D, **Loboda A.** Gzyl B, Bednar J, Józkowicz A, Dulak J, Nowakowska M. Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. *Colloids Surf B Biointerfaces, 2013*; 109C: 307-316. *$IF_{2012}$ – 3,456;*

2. **Loboda A*.**. Rojczyk-Golebiewska E, Bednarczyk-Cwynar B, Zaprutko L, Jozkowicz A, Dulak J. Targeting Nrf2-mediated gene transcription by triterpenoids and their derivatives. *Biomol Ther, 2012c; 20: 499-505, $IF_{2011}$ – 0,694; * autor korespondencyjny*

3. Florczyk U, **Łoboda A.** Stachurska A, Józkowicz A, Dulak J. Rola czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny. *Postępy biochemii, 2010;56(2): 147-55,*

***Temat badawczy: Rola HO-1 oraz Nrf2 w procesie waskularyzacji – wpływ na komórki progenitorowe***

Asahara i wsp. w 1997 roku donieśli, że neowaskularyzacja w dorosłym organizmie zachodzi nie tylko na drodze angiogenezy i arteriogenezy czyli poprzez tworzenie nowych naczyń z istniejących kapilar i dojrzewanie sieci naczyń krwionośnych ale również dzięki waskulogenezie tzn. z udziałem komórek progenitorowych, mobilizowanych ze szpiku kostnego

w miejsce uszkodzonej czy niedotlenionej tkanki. Od tego czasu zaangażowanie komórek progenitorowych śródbłonka w procesach neowaskularyzacji jest szeroko badanym zagadnieniem. Nasze zainteresowania koncentrują sie na poznaniu roli czynników antyoksydacyjnych, Nrf2 oraz HO-1 w tych procesach. Ostatnio opublikowane prace doświadczalne, w których uczestniczyłam, wskazują na ważną rolę czynnika Nrf2 we właściwościach angiogennych progenitorowych komórek środbłonka. Co ciekawe, w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na myszach pozbawionych czynnika Nrf2, chociaż mobilizacja komórek progenitorowych ze szpiku do krwi obwodowej była obniżona, to jednak stopień rewaskularyzacji niedotlenionej tkanki był lepszy. Efekt ten może być wytłumaczony zwiększoną ekspresją czynników prozapalnych u myszy $Nrf2^{-/-}$. Wykazaliśmy również, że HO-1 jest konieczna do prawidłowego funkcjonowania komórek proangiogennych izolowanych ze szpiku kostnego a brak nawet jednego allelu HO-1 prowadzi do zaburzeń w procesie rewaskularyzacji u myszy cukrzycowych. Wyniki tych prac poszerzają wiedzę na temat roli Nrf2 i HO-1 w procesie waskularyzacji ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w biologii komórek progenitorowych.

*Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:*

1. Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Kozakowska M, Starowicz K, Jagodzinska J, Stachurska A, Volger OL, Bukowska-Strakova K, Florczyk U, Tertil M, Jazwa A, Szade K, Stepniewski J, **Loboda A.** Horrevoets AJ, Dulak J, Jozkowicz A Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization. *Antioxid Redox Signal. 2014; 20: 1677-1692, $IF_{2012}$ – 7,189*

2. Florczyk U, Jazwa A, Maleszewska M, Mendel M, Szade K, Kozakowska M, Grochot-Przeczek A, Viscardi M, Czauderna S, Bukowska-Strakova K, Kotlinowski J, Jozkowicz A, **Loboda A**, Dulak J. Nrf2 Regulates Angiogenesis: Effect on Endothelial Cells, Bone Marrow-Derived Proangiogenic Cells and Hind Limb Ischemia. *Antioxid Redox Signal. 2014; 20: 1693-1708, $IF_{2012}$ – 7,189*

***Temat badawczy: Rola genów zegara okołodobowego u Drosophila melanogaster – potencjalny wpływ oksygenazy hemowej-1***

Bardzo ciekawe badania wykonuję również we współpracy z prof. Elżbieta Pyzą oraz dr Mileną Damulewicz z Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ. W celu analizy ekspresji wybranych genów w określonej strukturze płata wzrokowego *Drosophila melanogaster* opracowałam metodę jej izolacji przy użyciu mikrodysekcji laserowej, co pozwoliło na precyzyjne pobranie tkanki bez zanieczyszczeń z warstw sąsiednich. Ten unikatowy model zaowocował wieloma danymi, które były poddane dalszej analizie przez dr Milenę Damulewicz, są obecnie przygotowywane do wspólnej publikacji oraz stanowią punkt wyjścia do dalszych analiz, gdyż umożliwiły przygotowanie i uzyskanie grantu z Narodowego Centrum Nauki w ramach

Cisowski, J., A. Loboda, A. Jozkowicz, S. Chen, A. Agarwal, J. Dulak (2005). "Role of heme oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced VEGF synthesis: effect of HO-1 knockout." Biochem Biophys Res Commun **326**(3): 670-676.

Covello, K.L., J. Kehler, H. Yu, J.D. Gordan, A.M. Arsham, C.J. Hu, P.A. Labosky, M.C. Simon, B. Keith (2006). "HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth." Genes Dev **20**(5): 557-570.

Devesa, I., M.L. Ferrandiz, M.C. Terencio, L.A. Joosten, W.B. van den Berg, M.J. Alcaraz (2005). "Influence of heme oxygenase 1 modulation on the progression of murine collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **52**(10): 3230-3238.

Di Maso, V., C. Avellini, L.S. Croce, N. Rosso, F. Quadrifoglio, L. Cesaratto, E. Codarin, G. Bedogni, C.A. Beltrami, G. Tell, C. Tiribelli (2007). "Subcellular localization of APE1/Ref-1 in human hepatocellular carcinoma: possible prognostic significance." Mol Med **13**(1-2): 89-96.

Ebos, J.M., C.R. Lee, W. Cruz-Munoz, G.A. Bjarnason, J.G. Christensen, R.S. Kerbel (2009). "Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis." Cancer Cell **15**(3): 232-239.

Eremina, V., S.E. Quaggin (2004) "The role of VEGF-A in glomerular development and function." Curr Opin Nephrol Hypertens. **13**(1):9-15.

Florczyk, U., A. Loboda, A. Stachurska, A. Jozkowicz, J. Dulak (2010). "[Role of Nrf2 transcription factor in cellular response to oxidative stress]." Postepy Biochem **56**(2): 147-155.

**Florczyk, U., S. Czauderna, A. Stachurska, M. Tertil, W. Nowak, M. Kozakowska, L. Poellinger, A. Jozkowicz, A. Loboda, J. Dulak (2011). "Opposite effects of HIF-1alpha and HIF-2alpha on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells." Free Radic Biol Med 51(10): 1882-1892.**

Florczyk, U., A. Jazwa, M. Maleszewska, M. Mendel, K. Szade, M. Kozakowska, A. Grochot-Przeczek, M. Viscardi, S. Czauderna, K. Bukowska-Strakova, J. Kotlinowski, A. Jozkowicz, A. Loboda, J. Dulak (2013). "Nrf2 Regulates Angiogenesis: Effect on Endothelial Cells, Bone Marrow-Derived Proangiogenic Cells and Hind Limb Ischemia." Antioxid Redox Signal.

Grochot-Przeczek, A., J. Kotlinowski, M. Kozakowska, K. Starowicz, J. Jagodzinska, A. Stachurska, O.L. Volger, K. Bukowska-Strakova, U. Florczyk, M. Tertil, A. Jazwa, K. Szade, J. Stepniewski, A. Loboda, A.J. Horrevoets, J. Dulak, A. Jozkowicz (2013). "Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization." Antioxid Redox Signal.

Hall, J.L., X. Wang, A. Van, Y. Zhao, G.H. Gibbons (2001). "Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and tumor necrosis factor-induced endothelial cell apoptosis through nuclear factor-kappab-independent and -dependent pathways." Circ Res **88**(12): 1247-1253.

Hayman, S.R., N. Leung, J.P. Grande, V.D. Garovic (2012). "VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity." Curr Oncol Rep **14**(4): 285-294.

Hedley, D., M. Pintilie, J. Woo, T. Nicklee, A. Morrison, D. Birle, A. Fyles, M. Milosevic, R. Hill (2004). "Up-regulation of the redox mediators thioredoxin and apurinic/apyrimidinic excision (APE)/Ref-1 in hypoxic microregions of invasive cervical carcinomas, mapped using multispectral, wide-field fluorescence image analysis." Am J Pathol **164**(2): 557-565.

Izzedine, H., C. Massard, J.P. Spano, F. Goldwasser, D. Khayat, J.C. Soria (2010) VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management. Eur J Cancer. **46**(2): 439-448.

Jofre-Monseny, L., A. Loboda, A.E. Wagner, P. Huebbe, C. Boesch-Saadatmandi, A. Jozkowicz, A.M. Minihane, J. Dulak, G. Rimbach (2007). "Effects of apoE genotype on macrophage inflammation and heme oxygenase-1 expression." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 319-324.

Jozkowicz, A., I. Huk, A. Nigisch, G. Weigel, W. Dietrich, R. Motterlini, J. Dulak (2003). "Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX." Antioxid Redox Signal **5**(2): 155-162.

Kakolyris, S., L. Kaklamanis, A. Giatromanolaki, M. Koukourakis, I.D. Hickson, G. Barzilay, H. Turley, R.D. Leek, P. Kanavaros, V. Georgoulias, K.C. Gatter, A.L. Harris (1998). "Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) protein: a basis for its role in human disease." Histopathology **33**(6): 561-569.

konkursu OPUS. W ramach tego projektu, kierowanego przez prof. Pyzę, zamierzamy określić rolę oksygenazy hemowej w regulacji pracy zegara okołodobowego muszki owocowej oraz poznać dokładny mechanizm transdukcji światła. Ważnym aspektem zaplanowanych analiz jest też określenie roli miRNA w regulacji zegara okołodobowego.

**Temat badawczy: *Poszukiwanie nowych inhibitorów oksygenazy hemowej-1 jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych.***

Jednym z najnowszych projektów, w który jestem zaangażowana jest projekt realizowany wspólnie z firmą Selvita, a finansowany w ramach Programu Badań Stosowanych z NCBIR. Celem projektu jest opracowanie i badanie nowych inhibitorów HO-1 z zamiarem ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Założenia projektu oparte są na naszych badaniach, w których wykazaliśmy, iż w nowotworach dochodzi do zwiększenia ekspresji HO-1, co pociąga za sobą zwiększenie potencjału proliferacyjnego, migracyjnego i angiogennego komórek nowotworowych, a zarazem ogranicza skuteczność terapii przeciwnowotworowych, ze względu na antyoksydacyjne właściwości tego enzymu. Co ważne, wśród obecnie dostępnych inhibitorów HO-1 nie ma związków, które cechowałyby się wystarczającą specyficznością działania i odpowiednią biodostępnością.

**Bibliografia** (prace stanowiące podstawę habilitacji zaznaczono wytłuszczonym drukiem).


Angkeow, P., S.S. Deshpande, B. Qi, Y.X. Liu, Y.C. Park, B.H. Jeon, M. Ozaki, K. Irani (2002). "Redox factor-1: an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis." Cell Death Differ **9**(7): 717-725.

Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J.M. Isner (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.

Baderca, F., R. Lighezan, A. Dema, A. Alexa, M. Raica (2006). "Immunohistochemical expression of VEGF in normal human renal parenchyma." Rom J Morphol Embryol **47**(4): 315-322.

Bindra, R.S., P.M. Glazer (2007). "Co-repression of mismatch repair gene expression by hypoxia in cancer cells: role of the Myc/Max network." Cancer Lett 252(1): 93-103.

**Boesch-Saadatmandi, C., A. Loboda, A. Jozkowicz, P. Huebbe, R. Blank, S. Wolffram, J. Dulak, G. Rimbach (2008). "Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells." Food Chem Toxicol 46(8): 2665-2671.**

Boesch-Saadatmandi, C., A. Loboda, A.E. Wagner, A. Stachurska, A. Jozkowicz, J. Dulak, F. Doring, S. Wolffram, G. Rimbach (2011). "Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155." J Nutr Biochem 22(3): 293-299.

Casanovas, O., D.J. Hicklin, G. Bergers, D. Hanahan (2005). "Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors." Cancer Cell **8**(4): 299-309.

Ciesla, M., K. Skrzypek, M. Kozakowska, A. Loboda, A. Jozkowicz, J. Dulak (2011). "MicroRNAs as biomarkers of disease onset." Anal Bioanal Chem **401**(7): 2051-2061.

Karewicz, A., D. Bielska, A. Loboda, B. Gzyl-Malcher, J. Bednar, A. Jozkowicz, J. Dulak, M. Nowakowska (2013). "Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives." Colloids Surf B Biointerfaces **109**: 307-316.

Kato, M., L. Arce, M. Wang, S. Putta, L. Lanting, R. Natarajan (2011). "A microRNA circuit mediates transforming growth factor-beta1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells." Kidney Int **80**(4): 358-368.

Kato, M., J. Zhang, M. Wang, L. Lanting, H. Yuan, J.J. Rossi, R. Natarajan (2007). "MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3432-3437.

Kim, T.H., E.G. Hur, S.J. Kang, J.A. Kim, D. Thapa, Y.M. Lee, S.K. Ku, Y. Jung, M.K. Kwak (2011). "NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1alpha." Cancer Res **71**(6): 2260-2275.

Koshiji, M., K.K. To, S. Hammer, K. Kumamoto, A.L. Harris, P. Modrich, L.E. Huang (2005). "HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression." Mol Cell **17**(6): 793-803.

Kozakowska, M., M. Ciesla, A. Stefanska, K. Skrzypek, H. Was, A. Jazwa, A. Grochot-Przeczek, J. Kotlinowski, A. Szymula, A. Bartelik, M. Mazan, O. Yagensky, U. Florczyk, K. Lemke, A. Zebzda, G. Dyduch, W. Nowak, K. Szade, J. Stepniewski, M. Majka, R. Derlacz, A. Loboda, J. Dulak, A. Jozkowicz (2012). "Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs." Antioxid Redox Signal **16**(2): 113-127.

Lindenmeyer, M.T., M. Kretzler, A. Boucherot, S. Berra, Y. Yasuda, A. Henger, F. Eichinger, S. Gaiser, H. Schmid, M.P. Rastaldi, R.W. Schrier, D. Schlondorff, C.D. Cohen (2007). "Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy." J Am Soc Nephrol **18**(6): 1765-1776.

Loboda, A., A. Jazwa, B. Wegiel, A. Jozkowicz, J. Dulak (2005). "Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **51**(4): 347-355.

Loboda, A., A. Jazwa, A. Jozkowicz, G. Molema, J. Dulak (2006). "Angiogenic transcriptome of human microvascular endothelial cells: Effect of hypoxia, modulation by atorvastatin." Vascul Pharmacol **44**(4): 206-214.

Loboda, A., A. Jazwa, A. Grochot-Przeczek, A.J. Rutkowski, J. Cisowski, A. Agarwal, A. Jozkowicz, J. Dulak (2008). "Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **10**(10): 1767-1812.

**Loboda, A., A. Stachurska, U. Florczyk, D. Rudnicka, A. Jazwa, J. Wegrzyn, M. Kozakowska, K. Stalinska, L. Poellinger, A.L. Levonen, S. Yla-Herttuala, A. Jozkowicz, J. Dulak (2009a). "HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 expression in human endothelial cells." Antioxid Redox Signal 11(7): 1501-1517.**

**Loboda, A., A. Stachurska, J. Dorosz, M. Zurawski, J. Wegrzyn, M. Kozakowska, A. Jozkowicz, J. Dulak (2009b). "HIF-1 attenuates Ref-1 expression in endothelial cells: reversal by siRNA and inhibition of geranylgeranylation." Vascul Pharmacol 51(2-3): 133-139.**

**Loboda, A., A. Jozkowicz, J. Dulak (2010). "HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical." Mol Cells 29(5): 435-442.**

Loboda, A., A. Jozkowicz, J. Dulak (2012a). "HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other?" Vascul Pharmacol **56**(5-6): 245-251.

Loboda, A., H. Was, U. Florczyk, A. Jozkowicz, J. Dulak (2012b). „Hypoxia-driven angiogenesis and other means of blood vessel formation in tumours – implication for anti-tumour therapy" *In: Tumor Hypoxia: Molecular Mechanisms and Clinical Implications., Edited by Silvia Pastorekova and Jaromir Pastorek, Publisher: VEDA & ELSEVIER, 2012, pp. 160-194, ISBN: 978-80-224-1261-2,*

Loboda, A., E. Rojczyk-Golebiewska, B. Bednarczyk-Cwynar, Z. Lucjusz, A. Jozkowicz, J. Dulak (2012c). "Targeting Nrf2-Mediated Gene Transcription by Triterpenoids and Their Derivatives." Biomol Ther (Seoul) **20**(6): 499-505.

Loboda, A., A. Jozkowicz, J. Dulak (2014). "Molecular mechanisms of hypoxia-regulated angiogenesis. " In: Angiogenesis and vascularisation – cellular and molecular mechanisms in health and

diseases, *Edited by Jozef Dulak, Alicja Jozkowicz, Agnieszka Loboda, Publisher: Springer, ISBN: 978-3-7091-1427-8,* .

Lofstedt, T., E. Fredlund, L. Holmquist-Mengelbier, A. Pietras, M. Ovenberger, L. Poellinger, S. Pahlman (2007). "Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer." Cell Cycle **6**(8): 919-926.

Lu, K.V.G. Bergers (2013). "Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma." CNS Oncol **2**(1): 49-65.

Manalo, D.J., A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B.D. Kelly, S.Q. Ye, J.G. Garcia, G.L. Semenza (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1." Blood **105**(2): 659-669.

Mizukami, Y., W.S. Jo, E.M. Duerr, M. Gala, J. Li, X. Zhang, M.A. Zimmer, O. Iliopoulos, L.R. Zukerberg, Y. Kohgo, M.P. Lynch, B.R. Rueda, D.C. Chung (2005). "Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells." Nat Med **11**(9): 992-997.

Norden, A.D., J. Drappatz, P.Y. Wen (2008). "Antiangiogenic therapy in malignant gliomas." Curr Opin Oncol **20**(6): 652-661.

Ockaili, R., R. Natarajan, F. Salloum, B.J. Fisher, D. Jones, A.A. Fowler, 3rd, R.C. Kukreja (2005). "HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H542-548.

Paez-Ribes, M., E. Allen, J. Hudock, T. Takeda, H. Okuyama, F. Vinals, M. Inoue, G. Bergers, D. Hanahan, O. Casanovas (2009). "Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis." Cancer Cell **15**(3): 220-231.

Rankin, E.B., M.P. Biju, Q. Liu, T.L. Unger, J. Rha, R.S. Johnson, M.C. Simon, B. Keith, V.H. Haase (2007). "Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo." J Clin Invest **117**(4): 1068-1077.

Skrzypek, K., M. Tertil, S. Golda, M. Ciesla, K. Weglarczyk, G. Collet, A. Guichard, M. Kozakowska, J. Boczkowski, H. Was, T. Gil, J. Kuzdzal, L. Muchova, L. Vitek, A. Loboda, A. Jozkowicz, C. Kieda, J. Dulak (2013). "Interplay Between Heme Oxygenase-1 and miR-378 Affects Non-Small Cell Lung Carcinoma Growth, Vascularization, and Metastasis." Antioxid Redox Signal **19**(7): 644-660.

**Stachurska, A., M. Kozakowska, A. Jozkowicz, J. Dulak, A. Loboda (2011). "Aristolochic acid I and ochratoxin A differentially regulate VEGF expression in porcine kidney epithelial cells--the involvement of SP-1 and HIFs transcription factors." Toxicol Lett 204(2-3): 118-126.**

**Stachurska, A., M. Ciesla, M. Kozakowska, S. Wolffram, C. Boesch-Saadatmandi, G. Rimbach, A. Jozkowicz, J. Dulak, A. Loboda (2013). "Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells." Mol Nutr Food Res 57(3): 504-515.**

Sun, D., J.M. Feng, C. Dai, L. Sun, T. Jin, Z.Q. Wang, J.F. Ma, L.N. Wang (2006). "Influence of hypoxia caused by impairment of peritubular capillary on the progression of chronic aristolochic acid nephropathy." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **86**(21): 1464-1469.

Tertil, M., K. Skrzypek, A. Loboda (2014) "Signaling and structural abnormalities in tumor angiogenesis". In: Angiogenesis and vascularisation – cellular and molecular mechanisms in health and diseases, *Edited by Jozef Dulak, Alicja Jozkowicz, Agnieszka Loboda, Publisher: Springer, ISBN: 978-3-7091-1427-8,*

To, K.K., M. Koshiji, S. Hammer, L.E. Huang (2005). "Genetic instability: the dark side of the hypoxic response." Cell Cycle **4**(7): 881-882.

Tryndyak, V.P., F.A. Beland, I.P. Pogribny (2010). "E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells." Int J Cancer **126**(11): 2575-2583.

Wang, B., P. Koh, C. Winbanks, M.T. Coughlan, A. McClelland, A. Watson, K. Jandeleit-Dahm, W.C. Burns, M.C. Thomas, M.E. Cooper, P. Kantharidis (2011). "miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF-beta2 expression." Diabetes **60**(1): 280-287.

Wen, Y.J., L. Qu, X.M. Li (2008). "Ischemic injury underlies the pathogenesis of aristolochic acid-induced acute kidney injury." Transl Res **152**(1): 38-46.

Xie, K. (2001). "Interleukin-8 and human cancer biology." Cytokine Growth Factor Rev **12**(4): 375-391.

Yang, L., X. Li, H. Wang (2007). "Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis." Nephrol Dial Transplant **22**(2): 445-456.

Yoo, K.H., Y.H. Sung, M.H. Yang, J.O. Jeon, Y.J. Yook, Y.M. Woo, H.W. Lee, J.H. Park (2007). "Inactivation of Mxi1 induces Il-8 secretion activation in polycystic kidney." Biochem Biophys Res Commun **356**(1): 85-90.

Zhang, X., X. Chen, H. Song, H.Z. Chen, B.H. Rovin (2005). "Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression." Eur J Immunol **35**(11): 3258-3267.

***Podsumowanie***

Powyżej zebrałam najważniejsze osiągnięcia mojej pracy naukowej, stanowiącej podstawę rozprawy habilitacyjnej i podsumowałam realizację projektów badawczych, w których biorę udział zarówno jako kierownik projektu czy wykonawca.

Reasumując, mój dorobek badawczy obejmuje łącznie 45 publikacji naukowych (33 po doktoracie). Spośród nich, 35 prac (24 po doktoracie - 16 prac oryginalnych, 8 prac przeglądowych) zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się na tzw. liście filadelfijskiej, o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 129,233. Według bazy Web of Science na dzień 18.05.2014 opublikowane prace były cytowane 731 razy (670 bez autocytowań). Mój aktualny indeks Hirscha jest równy 15 (Web of Science); 16 (Scopus). W moim dorobku naukowym znajdują się również rozdziały w książkach związanych z tematyką biologii naczyniowej, m.in. dwa rozdziały w wydanej w 2014r. przez wydawnictwo Springer pozycji *Angiogenesis and vascularisation - cellular and molecular mechanisms in health and diseases,* książki, której byłam współredaktorem.

Uczestniczyłam w wielu międzynarodowych i krajowych zjazdach i konferencjach naukowych, podczas których wygłosiłam 26 prezentacji ustnych. Aktywny udział w konferencjach zaowocował również prezentacjami około 45 plakatów. Ponadto, byłam współautorem plakatów prezentowanych przez innych członków zespołu na konferencjach, w których bezpośrednio nie brałam udziału. Jestem/byłam wykonawcą w 13 projektach badawczych, z czego w 3 pełniłam również rolę kierownika projektu.

Ważnym aspektem mojej aktywności naukowej jest również praca dydaktyczna. Jestem promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich (jeden zakończony obroną doktoratu w czerwcu 2013 roku), sprawuję opiekę naukową nad pracami magisterskimi oraz licencyjnymi. Recenzuję prace magisterskie na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, jak również publikacje w czasopismach międzynarodowych i krajowych (wykonałam ok. 40 recenzji). Byłam członkiem komisji podczas obrony pracy doktorskiej na Uniwersytecie w Walencji (mgr Nuria Maicas Blasco, 06.05.2011). Brałam udział w organizacji wielu konferencji i spotkań naukowych, aktywnie działam w kilku stowarzyszeniach i towarzystwach naukowych.

Od 2011 roku jestem sekretarzem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, jestem członkiem Wydziałowej Komisji Dydaktycznej a od 2012 roku pełnię funkcję skarbnika Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Za swoje osiągnięcia naukowe wielokrotnie otrzymywałam prestiżowe stypendia i nagrody naukowe, m.in. dwukrotnie stypendium START z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej czy stypendium tygodnika POLITYKA w ramach programu „Zostańcie z nami". W latach 2010-2013 zostałam uhonorowana stypendium naukowym dla wybitnych młodych naukowców Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, a w roku ubiegłym uzyskałam nagrodę dla badaczek kończących pracę habilitacyjną - Nagrodę L'Oreal Polska Dla Kobiet i Nauki.

Szczegółowo, te i inne formy mojej aktywności zawodowej przedstawiłam w Załączniku 4 (*Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki; załącznik 4a - wersja w języku polskim, załącznik 4b - wersja w języku angielskim). Dokładny spis publikacji z podziałem na prace opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia doktora znajduje się w Załączniku 7.*

Agnieszka Łoboda

**Agnieszka Łoboda**

**Kraków, 19.05.2014**