Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Agnieszka Wolnicka-Głubisz

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

2.1 Tytuł magistra

- **Data uzyskania:** 11 czerwca 1997 r.
- **Tytuł pracy:** Zastosowanie morfometrycznych metod cytometrii obrazu w diagnostyce nowotworowych zmian trzustki.
- **Kierunek:** biologia w zakresie biologia molekularna
- **Miejsce realizacji pracy:** Zakład Biologii Komórki Instytut Biologii Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
- **Promotor:** prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda
- **Jednostka przyznająca:** Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

2.2 Tytuł doktora nauk biologicznych

- **Data uzyskania:** 19 listopada 2002 r.
- **Tytuł pracy:** Porównanie fotoreaktywności i fototoksyczności 8-MOP, CPZ i TMA w przypadku układów modelowych i limfocytów w warunkach *in vitro.*
- **specjalność:** biofizyka
- **Miejsce realizacji pracy:** Zakład Biofizyki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
- **Promotor:** prof. dr hab. Tadeusz Sarna
- **Recenzenci:** prof. dr. hab. Juliusz Pryjma (Zakład Immunologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński) oraz dr hab. Zofia Zarębska (Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk w Warszawie)
- **Jednostka przyznająca**: Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
- **Numer dyplomu**: D04013/194/2002 (**Załącznik 2**)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2006 – do chwili obecnej: adiunkt; Zakład Biofizyki, Wydz. Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

2003 – 2006: staż podoktorski; Photobiology and Photoimmunology, George Washington University Medical Center, SPHHS, Washington DC, Stany Zjednoczone Ameryki Północnej

2002 – 2003: asystent; Zakład Biofizyki, Wydz. Biotechnologii, UJ, Kraków

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Stan zapalny i czerniak jako efekty działania promieniowania UV na skórę w wybranych modelach mysich

b) Autor/autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Cykl publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego obejmuje 2 prace przeglądowe oraz 4 prace doświadczalne:

1. **A. Wolnicka-Glubisz*** i F. P. Noonan. **(2006)** Neonatal susceptibility to UV induced cutaneous malignant melanoma in a mouse model. Review. *Photochem. Photobiol. Sciences,* 5, 254-60.

***IF: 2.208 MNiSW: 20 liczba cytowań: 13 autor korespondujący**

2. **A. Wolnicka-Glubisz*** i P.Płonka. **(2007**) Rola promieniowania UV w etiopatogenezie czerniaka skóry. Praca przeglądowa. *Współczesna Onkologia,* 11, 419-429.

***IF:0, IF $_{2013:}$ 0.215 MNiSW: 15 liczba cytowań: 3 autor korespondujący**

3. **A. Wolnicka-Glubisz**, Damsker J, Constant S, Corn S, De Fabo E, Noonan F. **(2007)** Deficient inflammatory response to UV radiation in neonatal mice. *J Leukoc Biol.*, 81, 1352-61.

IF: 4.128 MNiSW: 35 liczba cytowań: 19

4. **A. Wolnicka-Glubisz***, E de Fabo, F.P. Noonan. **(2013 a)** Functional melanocortin 1 receptor mc1r is not necessary for an inflammatory response to UV radiation in adult mouse skin. *Exp. Dermatol.*, 22: 226-228.

IF: 3.58 MNiSW: 40 liczba cytowań: 7 autor korespondujący

5. **A. Wolnicka-Glubisz***, A. Pecio, D. Podkowa, , P.M. Plonka, M. Grabacka. **(2013 b)** HGF/SF increases number of skin melanocytes but does not alter quality or quantity of follicular melanogenesis. *Plos One*, 8,(11), e74883.

IF: 4.115 MNiSW: 40 liczba cytowań: 3 autor korespondujący

6. **A. Wolnicka-Glubisz,** F. Strickland, A. Wielgus, M. Anver, G. Merlino, E. De Fabo, F. Noonan. **(2015**) A melanin-independent interaction between Mc1r and Met signalling pathways is required for HGF-dependent melanoma. *International Journal of Cancer.* 2015 Feb 15;136: 752-60. doi: 10.1002/ijc.29050.

IF 5.0 MNiSW: 35 liczba cytowań: 0

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji *(wg bazy Journal Citation Reports zgodnie z datą opublikowania, dla publikacji opublikowanych przed 2007 IF* z 2007. 2007 r. jest najwcześniejszą datą dostępną w tej bazie danych))*	**18.98**
Sumaryczna punktacja MNiSW (wg załącznika do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 17.12.2013)	**185**
Liczba cytowań *(Web of Science, dane na dzie*ń *02.01.2015)*	**45**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W niniejszej części przedstawione zostały główne tezy oraz wyniki pracy habilitacyjnej zatytułowanej "Stan zapalny i czerniak jako efekty działania promieniowania UV na skórę w wybranych modelach mysich". Pełna lista opublikowanych prac wraz z opisem indywidualnego wkładu habilitanta oraz osiągnięć dydaktycznych zostały podane w Załączniku 5.

1. Najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

1. Zwarte przedstawienie stanu wiedzy i hipotez badawczych na temat wrażliwości dziecięcej na czerniaka skóry indukowanego promieniowaniem UV i modelu zwierzęcym myszy HGF/SF (ang. *hepatocyte growth factor/scatering factor*) transgenicznej (**Wolnicka-Głubisz i Noonan** *Photochem. Photobiol. Sciences* **2006, Wolnicka-Głubisz i Płonka** *Współczesna Onkologia* **2007**).

2. Wykazanie, że noworodki mysie dzikie jak i HGF/SF transgeniczne nie rozwijają odpowiedzi zapalnej na działanie promieniowania UV i UVB, tak jak osobniki dorosłe, mimo, iż promieniowanie to indukuje uszkodzenia DNA w komórkach skóry (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *J Leukoc Biol***. 2007**).

3. Potwierdzenie, że HGF zmniejsza odczyn zapalny indukowany promieniowaniem UV z wykorzystaniem myszy FVB z nadekspresją HGF/SF (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *J Leukoc Biol***. 2007**).

4. Wykazanie, że nadekspresja HGF/SF u myszy C57BL/6 warunkuje pozawłosową lokalizacje melanocytów w skórze właściwej, ale nie wpływa na rodzaj ani ilość syntetyzowanych przez nie melanin (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *Plos One* **2013**).

5. Wykazanie różnic pomiędzy modelem mysim tj. C57BL/6-Mc1r $^{e/e}$, a ludźmi z polimorfizmem w MC1R w kontekście wrażliwości na działanie promieniowania UV tj. odczynu zapalanego,

immunosupresji oraz nadwrażliwości kontaktowej (CHS) i noworodkowej tolerancji immunologicznej (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *Exp. Dermatol.* **2013**).

6. Wykazanie, że funkcjonalny receptor Mc1r jest niezbędny do przeżycia pozawłosowych melanocytów w skórze myszy HGF transgenicznych (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *Int. J. Cancer* **2015**).

7. Wykazanie, że do wywołania czerniaka skóry przez promieniowanie UV u myszy HGF/SF transgenicznych niezbędny jest funkcjonalny receptor Mc1r (**Wolnicka-Głubisz i wsp.** *Int. J. Cancer* **2015**).

2. Zwięzła prezentacja wyników, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

Wstęp

Czerniak (melanoma malignum), złośliwy nowotwór skóry, błon śluzowych albo błony naczyniowej gałki ocznej, wywodzący się z melanocytu należy do najbardziej złośliwych nowotworów ze stale wzrastającym współczynnikiem zachorowalności, również w Polsce (Kycler i Teresiak 2006). Jednym z czynników etiologicznych odpowiedzialnych za postawanie czerniaka jest promieniowanie UV, komponenta promieniowania słonecznego. Promieniowanie UV, które dociera do powierzchni ziemi, składa się głównie z pasma UVA (95%; 320-400nm), a w mniejszym stopniu ok. 5% z pasma UVB (280-300nm). Pasmo UVC (200-280nm) całkowicie ulega odbiciu i pochłonięciu przez atmosferę ziemską (Wolnicka-Glubisz & Plonka 2007). Jednak wraz z wzrastającym ubytkiem warstwy ozonowej zwiększa się udział komponenty UVB, co w konsekwencji może prowadzić do zwiększenia ryzyka wystąpienia raków i czerniaka skóry.

Również nad terenem Polski obserwuje się niedobory całkowitej zawartości ozonu w okresie wiosna-lato, między październikiem, a grudniem, a w latach 2003-2007 oraz w roku obecnym odnotowano nawet kilkudniowe tzw. „mini-dziury ozonowe" wg raportu zespołu Geofizyki PAN i Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej (Wolnicka-Glubisz & Plonka 2007).

Oszacowano, że 1% spadek warstwy ozonowej zwiększa ryzyko śmiertelności ze strony czerniaka o ok. 1-2% (Hoffman 1987). Wzrost zachorowalności na czerniaka skóry szczególnie wśród ludzi młodych wskazuje na ważność badań szczególnie dotyczących mechanizmów powstawania czerniaka w skórze pod wpływem UV. Takie badania jednak możliwe są tylko z zastosowaniem modeli zwierzęcych, a nie na noworodkach ludzkich. Choć od lat w wielu laboratoriach świata prowadzi się badania czerniaka, stosunkowo mało wiadomo o mechanizmach odpowiedzialnych za powstanie tego nowotworu indukowane promieniowaniem UV, co spowodowane było w dużej mierze trudnościami w znalezieniu odpowiedniego modelu zwierzęcego (Wolnicka-Glubisz & Plonka 2007).

Zbadanie związku pomiędzy stanem zapalnym indukowanym przez promieniowanie UV, a indukcją czerniaka, oraz wpływem podłoża genetycznego pigmentacji na przykładzie receptora melanokortyny typu 1 (Mc1r) na te procesy, wymagało wykorzystania do badań myszy

transgenicznych z genem czynnika wzrostu hepatocytów/czynnikiem rozproszenia (HGF/SF z ang. *hepatocyte growth factor/scattering factor*). HGF/SF jest wielofunkcyjną cytokiną odpowiedzialną m.in. za proliferację, różnicowanie oraz migrację komórek posiadających receptor kinazy tyrozynowej c-Met, takich jak hepatocyty, melanocyty, keratynocyty i inne (Komada i wsp. 1993).W efekcie nadekspresji HGF u myszy HGF/SF transgenicznych występują pozawłosowe melanocyty (Noonan i wsp.2001, 2012). Myszy takie stanowią układ modelowy naśladujący strukturę ludzkiej skóry (melanocyty występują u tych osobników dodatkowo w skórze, w przeciwieństwie do myszy dzikich, które mają melanocyty jedynie w mieszku włosowym). Wykorzystano też mysz z niefunkcjonalnym genem Mc1r $^{e/e}$ typu dzikiego jak i HGF transgeniczne (podwójne mutanty –HGF-Mc1r$^{e/e}$), u których w melanocytach syntetyzowana jest głównie feomelanina.
W przeciwieństwie do innych modeli, u których indukowano jedynie czerniaka typu zwierzęcego, podobny do ludzkiego czerniak typu szerzącego się powierzchniowo (SSM z ang. *superficial spreading melanoma*) rozwija się jedynie w wyniku naświetlania ultrafioletem noworodków myszy transgenicznej HGF/SF (Noonan i wsp. 2001, Wolnicka-Głubisz i Płonka 2007, Noonan i wsp. 2012).

Znaczenie

Poznanie mechanizmów wpływających na powstanie czerniaka skóry pod wpływem UV może stanowić podstawę do dalszych badań klinicznych, doprowadzić do lepszej protekcji skóry przed szkodliwymi skutkami działania promieniowania słonecznego. Ponadto wyniki badań mogą być wykorzystane w projektowaniu kosmeceutyków, nowych strategii i leków dla ukierunkowanej molekularnie terapii czerniaka skóry u ludzi.

I . Indukcja stanu zapalnego i immunosupresji przez promieniowanie UV w modelu mysim

a) **rola wieku myszy w indukcji stanu zapalnego i tolerancji (Wolnicka-Glubisz i Noonan 2006, Wolnicka-Głubisz i wsp. 2007, Wolnicka-Glubisz & Plonka 2007)**

Badania epidemiologiczne sugerują zwiększoną podatność dzieci na czerniaka skóry indukowanego przez promieniowanie UV (Whiteman i wsp. 2001, Wolnicka-Glubisz & Plonka 2007). Potwierdzają to również badania na mysim modelu czerniaka, ponieważ jedynie naświetlanie noworodków myszy HGF/SF transgenicznej, a nie osobników dorosłych, prowadzi z wiekiem do rozwoju czerniaka skóry (Noonan i wsp. 2001; Noonan i wsp. 2012). Mechanizmy dziecięcej wrażliwości na indukcję nowotworów, szczególnie czerniaka, nie są do końca poznane. Nasze rozważania na ten temat i stan ówczesnej wiedzy zawarłam w pracy przeglądowej (Wolnicka-Głubisz i Noonan, 2006).
Noworodki mysie charakteryzują się rozwojem odpowiedzi immunologicznej na drodze Th2 lub immunotolerancją (Adkins i wsp. 2004; Adkins 2005) stąd można by przypuszczać, że odpowiedź immunologiczna na promieniowanie UV będzie się różnić u osobników dorosłych i noworodków. Odpowiedz immunologiczna może mieć znaczący udział we wrażliwości dzieci na indukcję czerniaka przez promieniowanie UV.
Istotnie, nasze badania opublikowane w 2007r i prezentowane na 3 konferencjach międzynarodowych wykazały, że osobniki albinotyczne dorosłe zarówno dzikie jak i HGF/SF transgeniczne rozwijają stan

zapalny po napromieniowywaniu UV w przeciwieństwie do 3-5 dniowych noworodków, mimo, iż promieniowanie to wywołuje uszkodzenia DNA typu dimerów pirymidynowych w komórkach naskórka niezależnie od wieku myszy, co potwierdziłam poprzez badania immunohistochemiczne. Wyniki potwierdziły również, że to UVB a nie UVA indukuje zmiany zapalne w skórze myszy dorosłej (Wolnicka-Głubisz i wsp. 2007).

Do analizy ilościowej wykorzystałam opracowaną przez siebie procedurę dezintegracji skóry i izolacji z niej pojedynczych komórek (Wolnicka-Glubisz i wsp. 2005), które po barwieniu fluorescencyjnie wyznakowanymi przeciwciałami przeciw MHC klasy II, CD11b, Ly6G lub ich izotypów analizowałam za pomocą cytometrii przepływowej. Okazało się, że w ciągu 24-72 godz. po zakończeniu naświetlania promieniowaniem UV zwiększa się odsetek leukocytów (CD11b+), pojawiają się neutrofile (Ly6G+), co potwierdziliśmy barwieniem Giemsa, a także zmniejsza się odsetek komórek MHC klasy II+ u osobników dorosłych, ale nie u 3-5 dniowych noworodków.

Potwierdziliśmy również, że noworodki nie rozwijają też odpowiedzi zapalnej ani na skórną aplikację trichlorobenzenu (TNCB), ani na dootrzewnowe podanie sterylnego kwasu tioglikolowego (TG). Wykazaliśmy, że choć w krwi noworodków jest więcej neutrofili i monocytów, niż u dorosłych osobników, to część neutrofili jest niedojrzała i wykazuje słabszą ekspresję CXCR2, receptora dla Gro-α (u ludzi IL-8), co może tłumaczyć ich niższy indeks chemotaktyczny *in vitro* i przez analogię *in vivo.* Co ciekawe, w przypadku stymulacji przez pochodną bateryjną analog fMLP, okazuje się, że te same komórki reagują silniej, tzn. prawie dwukrotnie zwiększa się ich indeks chemotaktyczny, w porównaniu do wyizolowanych neutrofili z krwi obwodowej dorosłych myszy dzikich i HGF/SF transgenicznych. Nasze badania wykazały, że w skórze noworodków jest więcej komórek tucznych, niż u osobników dorosłych, a liczba ich zmniejsza się wraz z wiekiem myszy (Wolnicka-Głubisz i Noonan 2006), co może mieć znaczący wpływ na fotoimmunosupresję. Skórne komórki tuczne odgrywają kluczową rolę w procesie immunosupresji indukowanej przez promieniowanie UV, ponieważ u myszy pozbawionych tych komórek nie występuje fotoimmunosupresja (Hart i wsp. 2002).

W badaniach noworodkowej immunotoleracji wykorzystaliśmy model nadwrażliwości kontaktowej (z ang. *contact hypersensitivity;* CHS). Reakcja CHS zależy od aktywności komórek Langerhansa, które po wychwyceniu haptenu i jego przetworzeniu wędrują do regionalnych węzłów chłonnych, w których prezentują antygen limfocytom T i uruchamiają komórkową odpowiedź immunologiczną. Reakcja CHS u myszy jest wskaźnikiem statusu immunologicznego regulowanego przez komórki T (Reeve i wsp., 2002). I tak aplikacja TNCB na skórę noworodka myszy HGF/SF transgenicznej rozwija specyficzną tolerancję na ten związek w wieku późniejszym, która zwiększa się w sposób istotny jeśli myszy zostaną uprzednio naświetlone promieniowaniem UV (dawka 4,5 kJ/m^2) (Wolnicka-Glubisz i Noonan, 2006; Wolnicka-Głubisz i wsp.2007).

Większość badań wykonałam sama, lub z udziałem studentów, których byłam opiekunem naukowym w laboratorium Fotobiologii i Fotoimmunologii, George Washington University, Washyngton, USA.

Podsumowanie

Nasze badania wskazały, że mimo pojawiających się uszkodzeń DNA w wyniku napromieniowywania w komórkach naskórka, odczyn zapalny pojawia się jedynie u osobników

dorosłych, a nie noworodków. Brak stanu zapalnego może stwarzać sprzyjające warunki do indukcji melanomagenezy u myszy HGF/SF transgenicznych, zwłaszcza, że potwierdziliśmy, iż nadekspersja HGF zmniejsza wywołany promieniowaniem UV odczyn zapalny w skórze dorosłych zwierząt doświadczalnych.

Ponadto nasze badania potwierdziły, że odpowiedz immunologiczna w naświetlonym promieniowaniem UV noworodku może mieć znaczący wpływ na wrażliwość noworodków mysich na wywołany przez promieniowanie UV czerniak, ponieważ rozwijają odpowiedz immunologiczną, która nie tylko jest słabsza niż osobników dorosłych, ale która może prowadzić do pewnej immunotolerancji stwarzając warunki dla przeżycia transformowanego melanocytu.

Związek pomiędzy czerniakiem indukowanym promieniowaniem UV, stanem zapalnym, a wiekiem i genotypem myszy zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ promieniowania UV na indukcję stanu zapalnego i czerniaka w skórze myszy FVB w zależności od wieku i nadekspresji HGF/SF. N/D nie określona

wiek	**Genotyp myszy**	**melanocyty skórne**	**noworodkowa tolerancja TNCB / UV+TNCB**	**stan zapalny**	**czerniak**
Noworodek (3-5 dni)	typ dziki	-	- / +	-	-
	HGF/SF transgeniczna	+	+ / ++	-	+
Mysz dorosła	typ dziki	-	N/D	++	-
	HGF/SF transgeniczna	++	N/D	+	-

b) **Rola receptora Mc1r w indukcji stanu zapalnego i tolerancji (Wolnicka-Głubisz et al. 2013 a)**

Receptor melanokortyny typu 1 (MC1R) u ludzi, ale również u innych ssaków (Mc1r) jest ważnym determinantem koloru skóry i włosów. Gen MC1R cechuje wysoki polimorfizm. Mutacje w obrębie genu receptora dla Mc1r skutkują obniżoną produkcją lub brakiem powstawania eumelaniny, a syntetyzowana głównie feomelanina nadaje rude zabarwienie włosom (Slominski i wsp. 2004). MC1R występuję na powierzchni nie tylko skórnych i mieszkowych melanocytów, ale i makrofagach, limfocytach, neutrofilach i komórkach dendrytycznych, (García-Borrón i wsp.2005), co sugeruje jego role nie tylko w procesie melanogenezy, ale i procesach zapalnych. Wiele badań wskazuję na przeciwzapalną rolę melanokortyn w modelach doświadczalnych ostrego i chronicznego stanu zapalnego; nieswoistego zapalenia jelit (choroby Bowel'a), alergii i innych (Richard i wsp. 1984; Cerani i wsp.1994). MC1R (melanokortyny α-MSH, z ang. *melanocyte stimulating hormone*) podlega parakrynnej lub/i autokrynnej regulacji przez czynniki, takie jak hormon α-melanotropowy i hormon adrenokortykotropowy (kortykotropina, ACTH), które są syntetyzowane w skórze pod wpływem

promieniowania UV. Oba pochodzą od proopiomelanokortyny (POMC) – polipeptydu prekursorowego, który ulega obróbce potranslacyjnej. Uważa się, że hormony te chronią przed indukowanymi przez UV uszkodzeniami DNA i apoptozą (Abdel-Malek i wsp..2000; Bohm i wsp.2005; Scott i wsp.2002). Sugeruje się, że jako receptor, MC1R jest odpowiedzialny za przeciwzapalne działanie α-MSH i podobnych peptydów poprzez inhibicję aktywacji NF-κB (Manna i wsp. 1998; Kalden i wsp. 1999) i ochronę przed degradacją IκBα (Ichiyama i wsp. 1999), co skutkuje zmniejszeniem ekspresji cytokin prozapalnych (Mason i wsp. 1989) i cząsteczek adhezyjnych (Kalden i wsp. 1999) przez co wpływa na komórkową i humoralną fazę odpowiedzi immunologicznej (Hiltz i Lipton 1998; Lipton i Catania.1998). Również Grabbe i wsp. wykazali, że α-MSH hamuje odpowiedź CHS i indukuje tolerancję u myszy (Grabbe i wsp.1996). Większość badań skupia się na przeciwzapalnych właściwościach α-MSH, na podstawie których wyciąga się wnioski na temat MC1R i wrażliwości na UV. Liczba receptorów mysich Mc1r różni się od ludzkich MC1R, występują również różnice w oddziaływaniu z α-MSH (Jakson i wsp. 2007). Poza tym u myszy C57BL/6-Mc1r$^{e/e}$, Mc1r jest całkowicie niefunkcjonalny natomiast u ludzi polimorfizm MC1R częściowo zaburza lub zmienia funkcjonalność receptora.

Nasze badania z wykorzystaniem myszy C57BL/6-Mc1r$^{e/e}$, u której receptor Mc1r jest niefunkcjonalny, wykazały brak różnic w indukowanym przez UV stanie zapalnym, wrażliwość myszy niezależnie od dawki UV była taka sama jak u myszy czarnych C57BL/6 i albinotycznych C57BL/6 -c. Ponadto indukcja reakcji CHS oraz tolerancji noworodkowej i indukowanej UV immunosupresji u myszy C57BL/6-Mc1r$^{e/e}$ była nie zaburzona (Wolnicka-Głubisz i wsp. 2013 a), co z pozoru nie zgadza się z badaniami Grabbe (Grabbe i wsp.1996). Można jednak spekulować, że rolę tę przejmuje inny receptor, a mianowicie Mc3r, który również może wiązać α-MSH (Konda i wsp. 1994), ponieważ to właśnie jego rola, a nie Mc1r, została potwierdzona w modelu mysim (Masser i wsp.2006). Ponadto ze względu na ekspresję Mc2r w skórze myszy C57BL/6 (Ermak i Slominski 1997) nie można wykluczyć roli ACTH w tych procesach. Co ciekawe, badania u ludzi też są nie jednoznaczne i często się wykluczają wskazując na istnienie lub brak korelacji pomiędzy MC1R a erytemą (Flanagan i wsp. 2001, Smith i wsp. 2007) oraz między MC1R a odpowiedzią immunologiczną (Auriemma i wsp.2012, Cooper i wsp.2005).

Prace *in vivo* wykonałam w laboratorium Fotobiologii i Fotoimmunologii, George Washington University, Washington, USA natomiast badania histochemiczne i analizę statystyczną w Zakładzie Biofizyki, UJ w Krakowie.

Podsumowanie

Nasze badania wykazały, że Mc1r u myszy, choć jest kluczowym czynnikiem determinującym kolor sierści, nie jest związany z ich wrażliwością na indukowany przez UV stan zapalny i immunosupresję. Ponadto zwróciły uwagę na możliwe zaangażowanie innych receptorów melanokortyny, jak Mc2r lub/i Mc3r w regulację odpowiedzi immunologicznej tj. stanu zapalnego i fotoimmunosupresji wywołanej promieniowaniem UV na skórę myszy.

Wyniki tych badań okazały się na tyle ciekawe, że w tym samym czasopiśmie Exp Dermatol w 2013 ukazały się dwa komentarze od wydawców: Zmijewski i Słominski oraz Bohm i wsp, w których zwracają oni uwagę na ważność wyników opublikowanych w naszej pracy (Slominski & Zmijewski 2013, Bohm et al. 2013).

II. Wpływ pigmentacji na indukcję czerniaka przez promieniowanie UV w modelu mysim

Melaniny są amorficznymi, wielofunkcyjnymi biopolimerami, a ich skład chemiczny zależy od substratu oraz warunków w jakich powstają. Melaniny syntetyzowane przez melanocyty skórne i włosowe są z reguły kopolimerami dwóch form: eumelaniny i feomelaniny. Materiałem wyjściowym do wytwarzania, zarówno brązowo-czarnych eumelanin jak i żółto-czerwonych feomelanin są: L-tyrozyna i L-fenyloalanina oraz L-cysteina (Slominski i wsp. 2004; Schallreuter i wsp. 2008). Funkcją melanin w skórze jest nie tylko nadawanie barwy, ale i ochrona organizmu przed fototoksycznym działaniem promieniowania UV. Fotoochronne działanie melaniny opiera się na zdolności do bezpośredniej absorpcji fotonów i bezpiecznej dyssypacji energii w postaci ciepła oraz zmiatania reaktywnych form tlenu (ROS), które są generowane w wyniku wzbudzania chromoforów komórkowych takich jak np. NADH oraz wygaszania wzbudzonych elektronowo stanów chromoforów (Meredith i Sarna 2006). Dodatkową funkcją melanin jest sekwestracja jonów metali ciężkich (Riley 1997).
Melanina w skórze może pełnić rolę nie tylko fotoprotektora, ale i fotouczulacza (fotosensybilizatora) odpowiadającego za fotostarzenie się skóry i fotokarcinogenezę. Uważa się, że feomelanina jest bardziej fototoksyczna niż eumelaniny (Takeuchi i wsp. 2004). Nieoczekiwanie fototoksyczne działanie melaniny potwierdzają badania na modelu mysim, w którym występuje głównie eumelanina (Noonan i wsp. 2012). Praca, której jestem współautorem, zwraca uwagę na szczególnie istotny aspekt, a mianowicie rolę eumelanin i promieniowania UVA w indukcji czerniaka złośliwego w skórze zwierząt doświadczanych. Okazało się bowiem, że myszy czarne C57BL/6-HGF/SF transgeniczne rozwijają czerniaka pod wpływem promieniowania UVA oraz w mniejszym stopniu spontanicznie w przeciwieństwie do myszy albinotycznych C57BL/6-HGF/SF-c (Noonan i wsp. 2012), co nasuwa pytanie, jaki wpływ wywiera HGF na melanogenezę u myszy?

a) wpływ HGF na melanogenezę u myszy (Wolnicka-Głubisz et al. 2013b)

Badania mające na celu wyjaśnienie**,** czy stopień dojrzałości melanocytów skóry, właściwości biofizyczne i morfologiczne zawartych w nich melanosomów (rodzaj i ilość melanin) mają znaczenie w odpowiedzi na fototoksyczne działanie UV w modelu mysim oraz czy nadekspersja HGF wpływa na proces melanogenezy podjęłam po powrocie do Polski w Zakładzie Biofizyki, Wydz. BBiBt, UJ w Krakowie. W ramach nawiązanej przeze mnie współpracy z dr hab. Anną Pecio i dr Dagmarą Podkową z Zakładu Anatomii Porównawczej IZ, UJ wykonałyśmy badania z pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, które potwierdziły, że w skórze myszy C57BL/6-HGF/SF pozawłosowe melanocyty występują jedynie w skórze właściwej w warstwie brodawkowej i podbrodawkowej, ale nie w warstwie podstawnej naskórka, jak ma to miejsce w skórze ludzkiej. Melanocyty te w zależności od

wieku zwierzęcia: u 3-7 dniowych noworodków są mniej liczne i słabiej upigmentowane niż u osobników starszych niż 21 dni, ale bez względu na wiek, zawierają dojrzałe eumelanosomy. Ponieważ elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) jest bezpośrednią i specyficzną metodą badań jakości i zawartości melanin w próbkach (Płonka 2009), przeprowadziliśmy takie pomiary. Analiza próbek skóry mysiej w różnym wieku za pomocą EPR okazała się być bardziej skomplikowana ze względu na cykl włosowy, zwłaszcza, że HGF zwiększa liczbę mieszków włosowych i wydłuża ich cykl (Lindner i wsp. 2001). Uzyskany sygnał EPR melaniny ze skóry mysiej reprezentuje bowiem sumę melaniny zawartej w melanocytach mieszka włosowego i łodygi włosa oraz melanocytów skórnych. Problemu tego nie ma w przypadku analizy skóry myszy 21 dniowych, ponieważ zawiera ona jedynie mieszki telogenowe, dające szczątkowy sygnał EPR, zatem zmierzona ilość melaniny z grubsza zależy od jej ilości w melanocytach skórnych. Ponieważ u noworodków cykl włosowy jest w stadium 7/8 morfogenezy, które przypomina anagen VI w skórze dorosłej myszy, to sygnał ten jest mocniejszy ze względu na obecność licznych melanocytów mieszkowych. Zatem nie da się bezpośrednio porównać ilości melaniny w skórze zwierząt w różnym wieku, bez dodatkowych danych takich jak waga, grubość skóry, liczba mieszków włosowych. Ponieważ potwierdziliśmy, że HGF/SF nie wpływa na grubość skóry, ale zwiększa liczbę mieszków włosowych w skórze myszy transgenicznych, znormalizowaliśmy te dane przeliczając ilość melaniny nie tylko na wagę próbki, ale również na jej grubość oraz liczbę mieszków. Grubość skóry u myszy zmienia się bowiem wyłącznie w zależności od cyklu włosowego (Płonka 2009). Badanie istotnie potwierdziły, że HGF nie wpływa na jakość syntetyzowanych melanin, zarówno w skórze jak i w sierści jest to eumelanina, nie ma feomelaniny. Ilość eumelaniny w skórze jest większa u zwierząt HGF/SF transgenicznych, co wynika z obecności dodatkowej populacji melanocytów skórnych. Ilość eumelaniny w sierści myszy dzikich i transgenicznych melanina jest taka sama (Wolnicka-Głubisz i wsp. 2013 b).
Praca w całości wykonana w Zakładzie Biofizyki UJ w Krakowie.

Podsumowanie

Wyniki pracy wykazały, że choć HGF/SF wpływa na pozawłosową lokalizację melanocytów w skórze myszy C57BL/6-HGF/SF transgenicznej oraz zwiększa liczbę mieszków włosowych w porównaniu do myszy dzikiej C57BL/6, to nie wpływa na jakość ani ilość syntetyzowanych melanin. Dlatego też zwiększona wrażliwość na indukcję czerniaka przez UVA u myszy C57BL/6-HGF/SF transgenicznej nie jest wynikiem zwiększonej produkcji feomelaniny, a raczej związana jest z eumelaniną.

b) rola Mc1r w indukcji czerniaka pod wpływem promieniowania UV w modelu HGF (Wolnicka-Glubisz i wsp. 2015)

Polimorfizm w obrębie genu MC1R (receptor melanokortyny typu 1) prowadzący do mutacji, której skutkiem jest zaburzenie przekazu sygnału w ścieżce cAMP i produkcji eumelaniny, w rezultacie którego w wyższych proporcjach produkowana jest feomelanina, cechuje osoby o fototypie 1. Z badań epidemiologicznych wynika, że osoby o fototypie 1, czyli rudych włosach i jasnej cerze skłonnej do

oparzeń słonecznych, charakteryzują się większą podatnością na indukowane ultrafioletem słonecznym nowotwory skóry, w tym czerniaki złośliwe (Williams i wsp. 2011, Duffy i wsp. 2010).

Rola promieniowania UV i pigmentacji jest trudna do kontrolowania u ludzi, trudno wnioskować o mechanizmach na podstawie analiz danych statycznych uzyskanych z pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem wyidukowany nieznaną dawką UV. Pomimo znacznych i odnotowanych różnic pomiędzy modelami zwierzęcymi, w tym mysim, a człowiekiem, zaletą badań na zwierzętach jest kontrolowanie warunków doświadczalnych i określonych modyfikacji genetycznych przyczyniających się do rozwoju czerniaka, co nie jest możliwe w badaniach klinicznych na ludziach, a szczególnie dzieciach.

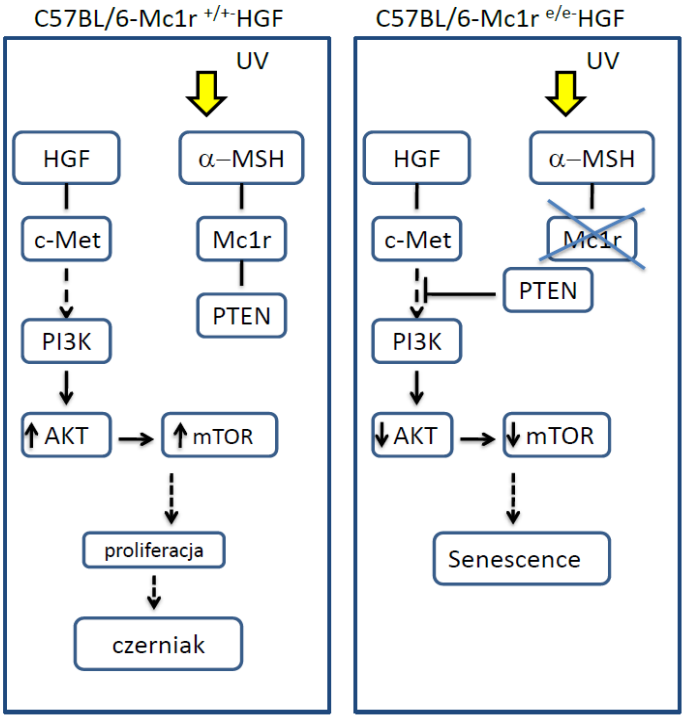
We współpracy z prof. Frances Noonan i prof. Edwardem de Fabo z Uniwersytetu Waszyngtona uzyskałam zaskakujące wyniki badań wskazujące, że myszy C57BL/6-HGF/SF transgeniczne z niefunkcjonalnym receptorem dla melanokortyn typu 1 ($Mc1r^{e/e}$) nie rozwijają czerniaka skóry ani spontanicznie, ani pod wpływem UV w przeciwieństwie do myszy HGF/SF z funkcjonalnym receptorem ($Mc1r^{+/+}$). Natomiast u heterozygot Mc1r $^{e/+}$ myszy HGF transgenicznych powstaje mniej czerniaków, zarówno indukowanych UV jak i spontanicznych (Wolnicka-Glubisz i wsp. 2014). Choć jest to sytuacja odwrotna, niż ma to miejsce w skórze ludzkiej, to podobne obserwacje uzyskano na innych modelach zwierzęcych, choć nie indukowano w nich czerniaków promieniowaniem UV. Żółte świnie Sinclair z mutacją w genie Mc1r lub ASIP nie rozwijają czerniaków, w przeciwieństwie do osobników czarnych tego samego szczepu (Lamoreux i wsp. 2010). Z kolei siwe konie Lipicańskie z brakiem ASIP są bardziej podatne na czerniaka, niż konie z funkcjonalnym ASIP (Rosengren i wsp. 2008).

Badania histochemiczne i immunohistochemiczne wykazały, że u myszy Mc1r $^{e/e}$ HGF/SF transgenicznych, pomimo nadekspresji HGF z wiekiem zwierzęcia drastycznie zmniejsza się liczba pozawłosowych melanocytów, w efekcie czego nie ma ich wcale w skórze osobników dorosłych, natomiast u heterozygot czyli Mc1r $^{e/+}$-HGF czy homozygot dominujących Mc1r $^{+/+}$-HGF liczba melanocytów zwiększa się wraz z wiekiem myszy. Zatem funkcjonalny Mc1r jest niezbędny do przeżycia pozawłosowych melanocytów w skórze myszy HGF transgenicznej, co jest nową obserwacją ponieważ do tej pory jedynym znanym czynnikiem odpowiedzialnym za migrację melanocytów mieszkowych do skóry u myszy był c-kit (CD117). Nasze obserwacje potwierdzają niedawno opublikowane badania Chou i wsp. 2013, które wykazały, że Mc1r odgrywa istotna rolę w migracji melanocytów z mieszka włosowego do naskórka, indukowanej zranieniem lub promieniowaniem UV. Choć brak pozawłosowych melanocytów tłumaczy, dlaczego u zwierząt $Mc1r^{e/e}$-HGF nie rozwija się czerniak, to nie wyjaśnia faktu dlaczego u heterozygot Mc1r $^{e/+}$-HGF, które fenotypowo nie różnią się od homozygot Mc1r $^{+/+}$-HGF rozwija się go mniej. Przeprowadzone analiza jakości i ilości melanin w skórze zwierząt potwierdziła obecność feomelaniny u skórze myszy $Mc1r^{e/e}$-HGF oraz podobna ilość eumelaniny w skórze myszy C57BL/6-Mc1r $^{e/+}$-HGF i C57BL/6-Mc1r $^{+/+}$-HGF. Związek pomiędzy czerniakiem indukowanym promieniowaniem UV a Mc1r, rodzajem i ilością melaniny w skórze myszy HGF/SF transgenicznej ilustruje tabela 2.

Tabela 2. Zestawienie wybranych cech badanych myszy C57BL/6-HGF transgenicznych oraz wpływu promieniowania UVB na indukcje czerniaka skóry

genotyp C57BL6-	**Mc1r**	**kolor sierści**	**melanocyty skórne**	**feomelanina**	**eumelanina**	**Czerniak indukowany UV** liczba myszy z rozwiniętym czerniakiem (n) / liczba myszy naświetlonych UV (n)
-HGF	+/+	czarny	++	-	++	20 / 26 (77%)
	e/+	czarny	++	-	++	7 / 27 (26%)
	e/e	żółty	+	++	-	0 / 30 (0 %)
-HGF-c	+/+	biały	++	-	-	6 / 18 (33%)

Oprócz kluczowej roli w pigmentacji, MC1R odgrywa rolę w naprawie DNA zarówno w systemie NER (z ang. *nucleotide excision repair*, naprawa przez wycinanie nukleotydów) (Hauser i wsp. 2006), odpowiedzialnym za naprawę uszkodzeń indukowanych przez UVB oraz BER (z ang. *base excision repair*, naprawa przez wycięcie zasad) odpowiedzialnym za naprawę uszkodzeń oksydacyjnych, które mogą powstać w melanocycie np. pod wpływem UVA i melaniny (Noonan i wsp. 2012).
Wykazaliśmy, że uszkodzenia DNA typu dimerów cyklobutanowych wywołane promieniowaniem UV w skórze noworodków C57BL/6-Mc1r-$^{e/+}$ i-Mc1r $^{+/+}$ są podobne, a melanocyty w napromieniowanej skórze heterozygot aktywnie proliferują (Wolnicka-Glubisz i wsp. 2015).
Zatem zmniejszona zdolność rozwijania się czerniaka u heterozygot Mc1r $^{e/+}$-HGF wynika z obniżonej interakcji pomiędzy Mc1r, a ścieżką sygnałową Met koniecznej do rozwoju tego nowotworu.
Choć obecnie nie ma badań wskazujących na specyficzną interakcję pomiędzy Mc1r a MET, to wiele badań wskazuje na interakcję pomiędzy receptorami sprzężonymi z białkami G a receptorową kinazą tyrozynową (Natarajan i wsp. 2006). Można by spekulować, co należałoby zbadać, że taką cząsteczką regulującą ścieżki sygnałowe MC1R z C-MET jest PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted*). Badania Cao wskazują na zależną od promieniowania UVB interakcję pomiędzy MC1R a PTEN, negatywnym regulatorem AKT (serynowo-treoninowa kinaza białkowa). PTEN chroni przed degradacją i ogranicza aktywację AKT. Badania Cao wykazały, że u ludzi polimorfizm MC1R upośledza wiązanie się PTEN pod wpływem UVB, w rezultacie którego, melanocyty wchodzą w senescence (Cao i wsp.2013). Z kolei badania na innych niż czerniak nowotworach, np. raku wątroby, mięsaku nabłonkopodobnym, wskazują na blokowanie przez PTEN ścieżek PI3K/AKT/mTOR i HGF/c-Met (Venepalli i Goff 2013, Imura i wsp. 2014). Zatem przypuszczam, że u heterozygot ze względu na obniżona ekspresję Mc1r PTEN może odgrywać ważna rolę w hamowaniu rozwoju czerniaka indukowanego promieniowaniem UV, co należałoby potwierdzić. Moją hipotezę badawczą przedstawia Rys.1



Rys.1 Schematyczne przedstawienie hipotetycznej interakcji zależnej od PTEN pomiędzy Mc1r a ścieżką c-Met/AKT/mTOR

Podłoże genetyczne czerniaka skóry jest złożone i zależne od wielu genów. U ponad 50% czerniaków ludzkich zaobserwowano utratę supresorowych funkcji genu *INK4a/ARF* (Sharpless i wsp. 2003) będącego regulatorem cyklu komórkowego, a w liniach komórkowych wywodzących się z czerniaka, aż 90% mutacji występuje w obrębie tego genu (Cachia 2000). Badania przeprowadzone na guzach czerniaka pochodzących od transgenicznych myszy HGF/SF naświetlanych UV w 3-5 dniu po urodzeniu wykazały u 3 z 7 guzów utratę dwóch egzonów w obrębie genu *Ink4a/arf*, a tylko u jednego z ośmiu - zmiany w p53. Ponadto u myszy pozbawionych *Ink4a/arf* i heterozygot w obecności genu *HGF/SF*, promieniowanie UV prowadziło do wzmożonego rozwoju czerniaka (Otsuka i wsp. 1998, Wolnicka-Głubisz & Płonka 2007).

U chorych na czerniaka skóry znaleziono również mutacje w obrębie onkogenów *N-RAS* (15-30%) i *B-RAF* (ok.60-80%), które wzajemnie się wykluczają (Brose i wsp. 2002, Davies 2002). W przypadku *c-H-ras* i *c-N-ras* nie zaobserwowano żadnych zmian u myszy HGF transgenicznych (Otsuka i wsp. 1998, Wolnicka-Głubisz & Płonka 2007). Gen *B-RAF* domeny kinazy serynowo-treoninowej jest kluczowym składnikiem ścieżki sygnałowej kinaz MAPK. Pomimo, iż mutacje w obrębie genu *B-RAF* są powszechne w czerniaku oraz znamionach barwnikowych, to rola promieniowania UV w uszkodzeniach *BRAF* wciąż nie jest do końca jasna. Choć badania Mitra i wsp. wykazały na modelu mysim z mutacją B-Raf V600E, najczęstszą mutacją w ludzkich czerniakach, że obecność feomelaniny u myszy Mc1r $^{e/e}$ promuje rozwój czerniaka, to powstały nowotwór jest typu zwierzęcego o rozwoju dermalnym bez komponenty naskórkowej. Praca ani nie opisuje wpływu promieniowania UV na ten model, ani nie pokazuje pozawłosowych melanocytów (Mitra i wsp. 2012). W przypadku guzów pochodzących od myszy HGF transgenicznych nie zaobserwowano mutacji w B-Raf (dane nie

opublikowane). Również w czerniaku ludzkim rola HGF nie zależy od ścieżki sygnałowej *B-RAF* (Straussman i wsp. 2012, Wilson i wsp. 2012).

Podsumowanie

Wykazanie istnienia nieznanej ścieżki sygnałowej między Mc1r i HGF/Met w indukcji czerniaka przez promieniowanie UV może mieć znaczenie w wykorzystaniu inhibitorów kinazy c- Met w terapii nowotworów ludzkich, jako leków hamujących inwazyjność czerniaków.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Zagadnienia z zakresu onkologii i fotobiologii interesowały mnie już na studiach, dlatego też temat mojej pracy magisterskiej dotyczył diagnostyki raka trzustki, którą wykonywałam w Zakładzie Biologii Komórki , Inst. Biologii Molekularnej, UJ we współpracy z Zakładem Patomorfologii Collegium Medicum UJ w Krakowie. Badania zostały opublikowane w Folia Biol. (Krakow) w 1998. Zainteresowana nie tylko diagnostyką, ale i fototerapiami, w ramach studiów doktoranckich w latach 1997- 2002 prowadziłam badania nad fotooksycznością i fotoreaktywnością 8-MOP, CPZ i TMA w przypadku ludzkich leukocytów i układów modelowych pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Sarny w Zakładzie Biofizyki UJ, które zakończyłam obroną doktoratu. Na badania te otrzymałam dofinansowanie w ramach grantu dla młodego badacza, oraz byłam głównym wykonawcą w grancie promotorskim. Z tematyki tej opublikowałam 5 prac doświadczalnych i 1 przeglądową, uczestniczyłam w 6 międzynarodowych konferencjach. W trakcie studiów doktoranckich dzięki otrzymanym stypendiom naukowym (NUFFIC, OAD, Rene Touraine) odbyłam kilka staży naukowych u prof Gerada Beijerbergen van Henegowen (Uniwersytet w Leiden Holandia, 2 razy) i u prof. dr hab.med. Roberta Knobler'a i prof. dr hab. med. Franza Trautinger' a (Uniwersytet Medyczny w Wiedniu, Austria 2 razy). Badania te rozszerzyły moją wiedzę i warsztat badawczy nie tylko z zakresu fotobiofizyki i fotobiologii, ale zwróciły uwagę na zjawiska immunologiczne indukowane w skórze przez promieniowanie UV.

W 2001 r. ukazała się w Nature publikacja grupy profesor Frances Noonan na temat czerniaka indukowanego promieniowaniem UV w modelu mysim. Praca ta zainspirowała mnie i skłoniła do nawiązania kontaktu z profesor Noonan, w rezultacie którego wyjechałam do USA w 2003 r. w ramach stażu podoktorskiego. Celem projektu, w jaki zostałam włączona, było uzyskanie populacji żywych melanocytów ze skóry albinotycznych zwierząt HGF/SF transgenicznych. Dlatego opracowałam metodę izolacji wykorzystując c-kit -znany marker melanocytów i melanoblastów oraz Sca-1 i CD34 - markery dla komórek macierzystych. Jednak okazało się, że Sca-1 i CD34 występują na powierzchni preadipocytów i adipocytów, a nie ma ich na melanocytach. Obecność markerów komórek macierzystych na komórkach tłuszczowych i ich duża plastyczność ma znaczenie w wykorzystaniu komórek tłuszczowych w medycynie regeneracyjnej i transplantologii, co opublikowałam w J Invest. Dermatol. 2005. Badania skóry mysiej z zastosowaniem sortowania komórkowego w oparciu o różne markery pozwoliły uchwycić fakt, że skóra noworodków zawiera wysoki odsetek komórek tucznych, który wraz z wiekiem myszy zmniejsza się, co może mieć wpływ na rozwój stanu zapalnego u myszy w zależności od wieku. Okazało się, że w pewnych warunkach, noworodki mysie podobnie, jak ludzkie, rozwijają odpowiedz immunologiczną, która nie tylko jest słabsza, niż osobników dorosłych, ale która może prowadzić do pewnej immunotolerancji, co może promować rozwój czerniaka indukowanego przez UV (Wolnicka-Głubisz i Noonan 2006; Wolnicka-Glubisz i wsp. 2007).
Tematyka związana z fotoimmunologią skóry szczególnie w procesach związanych z indukcją czerniaka jest rzadziej podejmowana, dlatego dysponując myszami HGF transgenicznymi o różnym podłożu genetycznym pigmentacji rozpoczęłam badania nad rolą melanin w indukcji stanu zapalnego

i w procesie fotokarcinogenezy. Praca (Noonan i wsp, 2012), której jestem współautorem, zwraca uwagę na szczególnie istotny aspekt, a mianowicie na rolę eumelaniny i promieniowania UVA w indukcji czerniaka złośliwego w skórze zwierząt doświadczanych, co koreluje z licznymi pracami wskazującymi na rolę UVA w indukcji czerniaka w skórze ludzkiej eksponowanej na to promieniowanie.

Po powrocie do Polski w 2006 r. kontynuowałam badania nad znaczeniem melanin w odpowiedzi na fototoksyczne działanie UV w modelach mysich w Zakładzie Biofizyki, Wydz. BBiBt, UJ w Krakowie**.** W wyniku nawiązanej współpracy z dr hab. Anną Pecio z Zakładu Anatomii Porównawczej IZ, UJ podjęłam badania nad skórą żaby *Hymenochirus boettgerii,* które wykazały obecność feomelaniny, niespotykaną w skórze płazów, co opublikowaliśmy w Exp. Dermatol. w 2012r. Jest to ważny przyczynek do badań nad ewolucją melanogenezy u kręgowców.
Badałam wpływ kurkuminy na hamowanie melanogenezy w komórkach melanomy, której dodatkowe wykorzystanie w terapiach czerniaka mogłaby podnosić ich skuteczność (Arch Dermatol Res, praca w druku).

Ponadto zaangażowana byłam w badania nad fototoksycznością tlenku tytanu, czego zwieńczeniem są dwie publikacje (Janczyk i wsp. J Photochem Photobiol 2008, i Free Rad Biol 2008).

W 2012r. nawiązałam współpracę z grupą Prof. dr hab. Jolanty Jury, która prowadzi badania nad białkiem MCPIP1. Białko to jest nowo zidentyfikowanym regulatorem stanu zapalnego. Ponieważ jego funkcja w skórze jest nieznana, rozpoczęłam badania nad jego rolą w procesach fototoksycznych indukowanych promieniowaniem UVA i UVB, na które otrzymałam finansowanie z NCN w ramach projektu OPUS w 2012r. Wykazaliśmy, że zarówno promieniowanie UVA jaki i UVB zwiększają ekspresję białka MCPIP1 w komórkach naskórka. Wyniki badań prezentowałam w 2014 r. na dwóch międzynarodowych konferencjach: Amerykańskiego Towarzystwa Fotobiologicznego (ASP, Kalifornia, USA) w czerwcu oraz Międzynarodowej Konferencji Fotobiologicznej (ICP, Argentyna) we wrześniu. Moje najbliższe plany naukowe związane są z realizacją grantu. Planuje też rozszerzyć warsztat badawczy o zwierzęta.

Powyżej zebrałam najważniejsze osiągnięcia mojej pracy naukowej, stanowiącej podstawę rozprawy habilitacyjnej oraz innych prowadzonych badań. Uczestniczyłam w wielu międzynarodowych i krajowych zjazdach i konferencjach naukowych, podczas których wygłosiłam 5 prezentacji ustnych. Aktywny udział w konferencjach zaowocował również prezentacjami około 22 plakatów.
Jestem/byłam wykonawcą w 5 projektach badawczych, z czego w 2 pełniłam/pełnie rolę kierownika projektu.

Ważnym aspektem mojej aktywności naukowej jest również praca dydaktyczna. Jestem opiekunem doktoranta, który nie ma jeszcze otwartego przewodu doktorskiego, byłam promotorem 7 prac magisterskich oraz 3 licencyjnych. Recenzuję prace magisterskie na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, jak również publikacje w czasopismach międzynarodowych i krajowych. Szczegółowo, te i inne formy mojej aktywności zawodowej przedstawiłam w Załączniku 5.

Literatura

1. Abdel-Malek Z, Scott M C, Suzuki I, et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. Pigment Cell Res 2000, 8: 156-62.
2. Adkins B. Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nat. Rev. Immunol. 2004, 4: 553-564.
3. Adkins B. Neonatal T cell function. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2005, 40:S5-S7.
4. Auriemma M, Brzoska T, Klenner L, Kupas V, Goerge T, Voskort M, Zhao Z, Sparwasser T, Luger TA, Loser K. α-MSH-Stimulated Tolerogenic Dendritic Cells Induce Functional Regulatory T Cells and Ameliorate Ongoing Skin Inflammation. J Invest Dermatol. 2012, 132: 1814- 1824.
5. Bohm M, Wolff I, Scholzen T E, et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. J Biol Chem 2005, 18: 5795-5802.
6. Bohm M, Luger TA, Steingraber AK, T Goerge. Is MC_1 dispensable for regulation of cutaneous inflammatory and immune responses? Commentary from Editorial Board. Exp Dermatol. 2013. 22:792- 794.
7. Brose MS, Volpe P, Feldman M et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res 2002; 62: 6997-7000.
8. Cachia AR, Indsto JO, McLaren KM, Mann GJ, Arends MJ.CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. Clin Cancer Res. 2000, 6: 3511-3515.
9. Cao J, Wan L, Hacker E, et al. MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. Mol Cell 2013, 51:409–422.
10. Ceriani G, Diaz J, Murphree S, Catania A, Lipton J M. The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits experimental arthritis in rats. Neuroimmunomodulation 1994, 1: 28- 32.
11. Davies H, Bignell GR, Cox C et.al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 2002; 417: 949-954.
12. Duffy DL, Zhao ZZ, Sturm RA, et al. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. J Invest Dermatol 2010;130: 520–528.
13. García-Borrón J C, Sánchez-Laorden B L, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and funtional regulation. Pigment Cell Res 2005, 18: 393-410.
14. Grabbe S, Bhardwaj R S, Mahnke K, Simon M M, Schwarz T, Luger T A. alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. J Immunol 1996, 156: 473-478.
15. Getting S J, Christian H C, Lam C W, et al. Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. J Immunol 2003, 170: 3323-3330.
16. Chou WC, Takeo M, Rabbani P, et al. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. Nat Med 2013, 19:924–9.
17. Ermak G, Slominski A.Production of POMC, CRH-R1, MC1, and MC2 receptor mRNA and expression of tyrosinase gene in relation to hair cycle and dexamethasone treatment in the C57BL/6 mouse skin. J Invest Dermatol. 1997, 108:160-165.
18. Flanagan N, Ray AJ, Todd C, Birch-Machin M A, Rees J L. The relation between melanocortin 1 receptor genotype and experimentally assessed ultraviolet radiation sensitivity. J Invest Dermatol 2001, 117: 1314-1317
19. Hart PH, Townley LS, Grimbaldeston MA, Khalil Z, Finlay-Jones JJ. Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression, Methods, 2002, 28: 79-89.
20. Hauser JE, Kadekaro AL, Kavanagh RJ, et al. Melanin content and MC1R function independently affect UVR-induced DNA damage in cultured human melanocytes. Pigment Cell Res 2006;19:303–14.
21. Hiltz M E, Lipton J M. Antiinflammatory activity of a COOH-terminal fragment of the neuropeptide alpha-MSH. FASEB J. 1989: 3: 2282-2284.
22. Hoffman JS. An assessment of the risk of stratospheric modification. Eds. US, Environmental Protection Agency, 1987.
23. Ichiyama T, Sakai T, Catania A, Barsh G S, Furukawa S, Lipton J M. Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone. J Neuroimmunol 1999, 99: 211-217.

24. Imura Y, Yasui H, Outani H, Wakamatsu T, Hamada K, Nakai T, Yamada S, Myoui A, Araki N, Ueda T, Itoh K, Yoshikawa H, Naka N. Combined targeting of mTOR and c-MET signaling pathways for effective management of epithelioid sarcoma.Mol Cancer. 2014;13:185.
25. Kalden D H, Scholzen T, Brzoska T, Luger T A. Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression. Ann N Y Acad Sci 1999, 885: 254-261.
26. Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. J Biol Chem 1994: 269: 13162-13166.
27. Komada M, Kitamura N. The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-Met receptor. Oncogene 1993, 8: 2381-2390.
28. Kycler W, Teresiak M. Czerniak skóry: aktualne możliwości leczenia w Polsce na podstawie analizy leczonych pacjentów i przeglądu literatury. Współcz Onkol. 2006, 10: 437-48.
29. Lamoureux ML, Delmas V, Larue L, et al. The colors of mice: a model genetic network. Oxford UK: Wiley-Blackwell, 2010, 312 p.
30. Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Handjiski B, Roloff B and Paus R . Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. FASEB J 2000, 14: 319- 332.
31. Lipton J M, Catania A. Mechanisms of antiinflammatory action of the neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH. Ann N Y Acad Sci 1998, 840: 373-380.
32. Manna S K, Aggarwal B B. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. J Immunol 1998, 161: 2873-2880.
33. Mason MJ, Van Epps D. Modulation of IL-1, tumor necrosis factor, and C5a-mediated murine neutrophil migration by alpha-melanocyte-stimulating hormone. J Immunol 1989, 142: 1646-1651.
34. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. Pigment Cell Res. 2006, 6: 572-94. Review.
35. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. Nature. 2012,491: 449-53.
36. Natarajan K, Berk BC. Crosstalk coregulation mechanisms of G protein-coupled receptors andreceptor tyrosine kinases. Methods Mol Biol 2006,332: 51–77.
37. Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino G, Neonatal sunburn and melanoma in mice, Nature, 2001, 413: 271-272.
38. Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, et al.. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. Nat Commun 2012, 6: 3-884.
39. Otsuka T, Takayama H, Sharp R, Celli G, et.al. c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. Cancer Res. 1998, 58: 5157-67.
40. Plonka. Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. Exp Dermatol. 2009, 5: 472-84.
41. Richard D B, Lipton J M. Effect of alpha-MSH11-13 on fever in the rabbit. Peptides 1984, 5: 815-817.
42. Reeve V E, Ultraviolet radiation and the contact hypersensitivity reaction in mice. Methods, 2002, 28: 20-24.
43. Riley PA. Melanin. Int J Biochem Cell Biol. 1997, 29:1235- 1239. Review.
44. Rosengren Pielberg G, Golovko A, Sundstrom E, et al. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. Nat Genet 2008, 40:104–9.
45. Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD.Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. Exp Dermatol. 2008, 17:395-404.
46. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. Oncogene 2003, 22: 3092-3098. Review.

47. Scott M C, Suzuki I, Abdel-Malek Z A. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. Pigment Cell Res 2002, 15: 433-439.
48. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation.Physiol Rev. 2004, 84:1155-228. Review.
49. Smith G, Wilkie MJ, Deeni YY, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) genotype influences erythemal sensitivity to psoralen-ultraviolet A photochemotherapy. Br J Dermatol 2007, 157: 1230-1234.
50. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. Nature. 2012, 487:500-504.
51. Takeuchi S, Zhang W, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ, Kraemer KH, Brash DE. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:15076-81.
52. Venepalli NK, Goff L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. Int J Hepatol. 2013, 2013: 341636.
53. Whiteman DC, Whiteman AC and Green AC, Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies, Cancer Causes Control., 2001, 12: 69–82. Review.
54. Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, et al. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma:a meta-analysis and estimates of population burden. Int J Cancer 2011, 129:1730-40.
55. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li,Jet al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. Nature. 2012, 487:505- 509.
56. Wolnicka-Glubisz A, King W, Noonan F P. SCA-1+ cells with an adipocyte phenotype in neonatal mouse skin. J Invest Dermatol. 2005, 125: 383-385.
57. Zmijewski M i Slominski A. Is Mc1r an important regulator of non-pigmentary response to UV radiation? Exp. Dermatol. 2013, 22: 790- 791.

Agnieszka Wolnicka-Głubisz

Kraków, 2.01.2015 r.