**ZAŁĄCZNIK 2a**

# AUTOREFERAT

dr KATARZYNA MIĘKUS

Zakład Biochemii Ogólnej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 2017

1. **Imię i nazwisko:** Katarzyna Miękus

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

- **2006 doktor nauk biologicznych**

**Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii w Krakowie**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Komunikacja międzykomórkowa i stymulowana przez kontakt migracja komórek szczurzego raka prostaty o różnej aktywności metastatycznej"

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Madeja

Recenzenci: prof. dr hab. Jan Doroszewski

prof. dr hab. Andrzej Klein

- **1999 magister biologii ze specjalnością biologia molekularna**

**Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej**

Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ homo- i heterotypowych oddziaływań komórka – komórka na aktywność ruchową komórek raka prostaty szczura"

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Madeja

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

**2013 – do chwili obecnej:** Adiunkt, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Ogólnej

**2010 – 2013:** Adiunkt, Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Lekarski; Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii; Zakład Transplantologii

**2007 – 2010:** Asystent, Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Lekarski; Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii; Zakład Transplantologii

**2000 – 2006:** Uczestnik Studiów Doktoranckich, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biologii Komórki

**1999 – 2000:** Asystent, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biologii Komórki

**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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

Oświadczenia współautorów dotyczące ich indywidualnego wkładu w przygotowanie publikacji wspólnych zamieszczono w Załączniku 5.

**4 a) tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Regulacja procesów wzrostu, progresji i przerzutowania nowotworów przez receptor MET oraz receptory chemokinowe CXCR4 i CXCR7**

**4 b) (autor/autorzy, rok wydania, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa); impact factor (IF) roku wydania i 5-letni wg bazy Journal Citation Reports, punkty wg MNiSW):**

1. **Miekus K**, Lukasiewicz E, Jarocha D, Sekula M, Drabik G, Majka M (2013) Decreased metastatic potential of rhabdomyosarcoma cells obtained through MET receptor downregulation and induction of differentiation. **Cell Death Dis**. 2013 Jan 17; **$IF_{(2013)}$: 5,177; $IF_{(5\text{-letni})}$: 6,147; MNiSW: 35**

2. **Miekus K***, Pawlowska M, Sekuła M, Drabik G, Madeja Z, Adamek D, Majka M (2015) MET receptor is a potential therapeutic target in high grade cervical cancer. **Oncotarget** 6(12):10086-101; **IF $_{(2015)}$: 5,008; $IF_{(5\text{-letni})}$: 5,312; MNiSW: 40**

* autor korespondujący

3. Sekuła M, **Miekus K**, Majka M (2014) Downregulation of the CXCR4 receptor inhibits cervical carcinoma metastatic behavior in vitro and in vivo. **Int J Oncol**. 44(6):1853-60. **$IF_{(2014)}$: 3,025; $IF_{(5\text{-letni})}$: 3,094; MNiSW: 25**

4. **Miekus K***, Jarocha D, Trzyna E, Majka M* (2010) Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in biology of various tumor cell lines. **Folia Histochem Cytobiol**. 1;48(1):104-11. **IF $_{(2010)}$: 0,902; $IF_{(5\text{-letni})}$: 1,300; MNiSW: 13**

* autor korespondujący

5. **Miekus K***, Kijowski J, Sekuła M, Majka M* (2012) 17AEP-GA, an HSP90 antagonist, is a potent inhibitor of glioblastoma cell proliferation, survival, migration and invasion. **Oncol Rep**. 28(5):1903-9. **$IF_{(2012)}$: 2.297; $IF_{(5\text{-letni})}$: 2,606; MNiSW: 20**

* autor korespondujący

6. **Miekus K*** (2017) The Met tyrosine kinase receptor as a therapeutic target and a potential cancer stem cell factor responsible for therapy resistance. **Oncol Rep** 37(2):647-656. **$IF_{(2016)}$: 2.662 $IF_{(5\text{-letni})}$: 2,606; MNiSW: 20**

* autor korespondujący

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

W niniejszej części przedstawione zostały główne tezy oraz wyniki osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, zatytułowanego **„Regulacja procesów wzrostu, progresji i przerzutowania nowotworów przez receptor MET oraz receptory chemokinowe CXCR4 i CXCR7"**

Pełna lista opublikowanych prac, osiągnięć naukowych oraz dane bibliometryczne zawarte zostały w Załączniku nr 3 *(Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki; załącznik 3a - wersja w języku polskim, załącznik 3b - wersja w języku angielskim).*

Pozycje bibliograficzne stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego zaznaczono wytłuszczonym drukiem.

## Wprowadzenie

Powstanie nowotworu złośliwego jest procesem niezwykle złożonym i wieloetapowym. Proces ten warunkowany jest nabyciem przez komórki nowotworowe szeregu właściwości umożliwiających im opuszczenie guza pierwotnego a następnie osiedlenie się w miejscu tworzenia przerzutu. Regulacja tego procesu odbywa się na wielu etapach i zależy między innymi od obecności i aktywności receptorów powierzchniowych. Receptorami szczególnie istotnymi w procesach wzrostu, inwazji i przerzutowania są receptory chemokinowe oraz receptory o właściwościach kinaz tyrozynowych [1]. Jednym z receptorów należących do grupy receptorów o właściwościach kinazy tyrozynowej jest receptor MET, produkt protoonkogenu *C-MET*. Aktywacja receptora MET przez jego ligand czynnik wzrostu hepatocytów, HGF (ang. Hepatocyte Growth Factor), znany także jako czynnik rozproszenia (ang. SF- Scatter Factor), prowadzi do wywołania różnych efektów biologicznych. Receptor ten bierze udział w procesach embriogenezy, rozwoju narządów, różnicowania m.in. kom. mięśniowych i nerwowych, a także regeneracji m.in. wątroby [2-4]. W komórkach nowotworowych nadmierna ekspresja lub niewłaściwa aktywacja tego receptora prowadzi do stymulacji proliferacji, przeżywalności, wzrostu aktywności ruchowej. Receptor ten jest również opisywany jako marker komórek inicjujących powstanie nowotworu, a ostatnie badania wskazują, że ma on swój udział w wykształcaniu oporności na stosowane leczenie celowane w chorobie nowotworowej [4,5]. Drugą grupą receptorów zaangażowanych w procesy rozwoju, progresji i przerzutowania nowotworów sa receptory chemokinowe. Receptory te należą do jednej z najliczniejszych rodzin receptorów komórkowych, receptorów sprzężonych z białkiem G, GPCR (ang. ***G protein coupled receptors***). Posiadają charakterystyczną budowę, z fragmentem aminowym znajdującym się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, fragmentem karboksylowym w przedziale wewnątrzkomórkowym i hydrofobową domeną w części środkowej tworzącą siedem pętli przechodzących przez błonę komórkową. Jednym z przedstawicieli rodziny GPCR jest receptor CXCR4 [6]. Receptor ten odpowiada przede wszystkim za prawidłowy rozwój narządów, organizację układu odpornościowego, właściwą hematopoezę i rozwój unaczynienia [7-9]. Wysoki poziom receptora CXCR4 obserwowany jest m.in na progenitorowych komórkach hematopetycznych,

nieukierunkowanych tkankowo komórkach macierzystych oraz na powierzchni dojrzałych komórek krwi: limfocytów, monocytów, płytek krwi [10]. Wysoką ekspresję receptora CXCR4 wykazano również dla wielu typów nowotworów [11]. Komórki nowotworowe posiadające receptor CXCR4 wykazują skłonność do samoodnowy populacji, inicjacji guzów nowotworowych oraz charakteryzują się wysoką odpornością na chemioterapię i radioterapię [12]. Receptor CXCR4 jest jednym z nielicznych receptorów chemokinowych, który oddziałuje tylko z jednym charakterystycznym dla siebie ligandem: czynnikiem pochodzenia zrębowego-1, SDF-1 (ang. stromal derived factor-1, CXCL12). Przez długi czas receptor CXCR4 i jego ligand SDF-1 były uważane za wyjątkowe wśród chemokin i ich receptorów, ponieważ oddziaływały one tylko pomiędzy sobą. W 2005 roku odkryto drugi receptor dla SDF-1 i nazwano go RDC1 lub CXCR7 [13]. Receptor CXCR7 jest receptorem dla chemokin CXCL11 i CXCL12 i jest obecny m.in. na komórkach epitelialnych, śródbłonkowych i komórkach neuronalnych [13]. Wysoki poziom tego receptora jest obserwowany również na limfocytach T, a jego ekspresja w czasie rozwoju i różnicowania limfocytów typu B, podlega ścisłej kontroli [14]. W komórkach nowotworowych receptor CXCR7 pełni istotną rolę w procesie angiogenezy, czyli formowania naczyń krwionośnych w powstającym guzie [13,15]. Jego wysoka ekspresja może stymulować również wzrost komórek nowotworowych i hamować proces apoptozy, co wykazano dla niekórych nowotworów [16,17]. Innym sposobem działania CXCR7, obserwowanym w komórkach raka piersi, jest wychwyt z mikrośrodowiska chemokiny SDF-1 i tworzenie gradientu gęstości, w kierunku którego migrują komórki wykazujące ekspresję receptora CXCR4. Może to stanowić bezpośrednią przyczynę utworzenia ogniska przerzutowego z komórek o fenotypie CXCR4+ [17]. Wykazano również, że komórki śródbłonka, znajdujące się w bliskim sąsiedztwie komórek guza, charakteryzuje podwyższony poziom receptora CXCR7 [16].

**Dlatego, głównym celem badań stanowiących przedmiot Osiągnięcia Naukowego było określenie roli receptorów chemokinowych, CXCR4 i CXCR7, oraz receptora MET posiadającego aktywność kinazy tyrozynowej, w procesach wzrostu, progresji i tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe.**

**Szczegółowe cele naukowe prac składajacych się na Osiągnięcie Naukowe obejmowały:**

1. Badanie roli receptora MET w procesie różnicowania i utrzymania fenotypu komórek nowotworowych (**Miekus i in., 2013, pozycja 1; Miekus i in., 2015, pozycja 2**)
2. Analizę poziomu ekspresji, aktywacji i funkcji receptorów chemokinowych, CXCR7 i CXCR4 w procesach nowotworzenia i przerzutowania w badaniach *in vitro* i *in vivo* (**Sekuła i in., 2014, pozycja 3; Miekus i in., 2010, pozycja 4**)
3. Określenie wpływu poziomu receptora MET na ekspresję i aktywację receptora CXCR4 (**Miekus i in., 2013, pozycja 1; Miekus i in., 2015, pozycja 2**)
4. Ocenę wpływu receptora MET na procesy wzrostu, przeżywalności i migracji komórek nowotworowych (**Miekus i in., 2013, pozycja 1; Miekus i in., 2015, pozycja 2; Miekus i in., 2012 pozycja 5**)

Badania prowadzone były w układach *in vitro* na wielu liniach komórek nowotworowych, *in vivo* z wykorzystaniem modelu myszy z upośledzonym układem immunologicznym szczepu NOD-SCID oraz z wykorzystaniem materiału od pacjentów z chorobą nowotworową.

*Badanie znaczenia receptora MET w procesie różnicowania i utrzymania fenotypu komórek nowotworowych*

Wyniki uzyskane przez nasz zespół i inne grupy badawcze wykazały, że wyciszenie ekspresji receptora MET przy użyciu systemu lentiwirusowego i shRNA w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego (ang. rhabdomyosarcoma – RMS) hamowało wzrost guzów w badaniach *in vivo*. Wykazano także, że brak receptora MET koreluje ze spadkiem inwazyjności badanych komórek [18,19]. Mięsak prążkowanokomórkowy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów tkanek miękkich u dzieci. Na podstawie cech klinicznych, patologicznych i molekularnych opisano dwa główne podtypy mięsaka: zarodkowy (ang. embryonal rhabdomyosarcoma, ERMS) dotykający głównie młodsze dzieci, poniżej 10 roku życia, z łagodniejszym przebiegiem i podtyp pęcherzykowy (ang. alveolar rhabdomyosarcoma, ARMS), z agresywniejszym przebiegiem i gorszym rokowaniem. Zaobserwowano, że większość nowotworów typu alveolarnego posiada translokację t(2;13)(q35;q14) lub t(1;13)(p36;q14), w wyniku których powstają białka fuzyjne PAX3-FKHR i PAX7-FKHR [20]. Geny *PAX3* i *PAX7* odpowiedzialne są za proces rozwoju mięśni szkieletowych, regulując m.in. miogenezę i różnicowanie komórek satelitarnych [21]. Translokacja chromosomowa z domeną FKHR (ang. Forkhead family member) aktywuje czynniki transkrypcyjne PAX3 i PAX7 i takie białka fuzyjne w komórkach RMS wpływają na ich wzrost, różnicowanie i ruchliwość, a także mogą stymulować m.in. ekspresję genu *C-MET* [22]. Chociaż pochodzenie mięsaka prążkowanokomórkowego jest dyskusyjne, i uważa się, że może on wywozić się z komórek satelitarnych mięśni, bądź tkanki mezenchymalnej [23, 24], wykazuje on pewne cechy różnicowania komórek mięśniowych. Różnicowanie komórek mięśniowych zależy od kolejnej ekspresji czynników transkrypcyjnych, m.in. MyoD, Myf5, miogeniny, Myf6 a w rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego obserwuje się ich niewłaściwą regulację i ekspresję genów charakterystycznych dla mięśni szkieletowych, takich jak desmina, aktyna sarkomeryczna, miozyna, mioglobina czy specyficzny dla wczesnych komórek mięśniowych czynnik transkrypcyjny MyoD [24]. Co więcej, w biologii tego nowotworu receptor MET jest niezmiernie istotny dla procesów proliferacji, przeżywalności i oporności na chemioterapię [19, 25-27]. Wiadomo, że w trakcie procesu różnicowania prawidłowych komórek mięśniowych poziom receptora MET gwałtownie spada [28], między innymi na skutek potranskrypcyjnego działania microRNA-206 (miR-206) [29]. Ponadto, aktywacja ekspresji miR-206 w komórkach RMS aktywuje proces różnicowania i hamuje wzrost guzów [29, 30].

Przeprowadzona przez nas analiza guzów powstałych po podskórnym podaniu do myszy typu NOD-SCID komórek mięsaka prążkowanokomórkowego kontrolnych i pozbawionych ekspresji receptora MET wskazała, że brak receptora MET znacząco zmieniał morfologię guzów, na bardziej zróżnicowaną (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Dlatego, postanowiliśmy ocenić wpływ wyciszenia receptora MET w kontekście utrzymania fenotypu komórek nowotworowych i ich potencjalnego różnicowania. Nasze badania dowiodły, że

komórki RMS pozbawione receptora MET były bardziej zróżnicowane i miały silnie obniżony poziom czynnika transkrypcyjnego MyoD, markera niezróżnicowanych komórek (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Wykazaliśmy również, że w komórkach RMS, poddanym procesowi różnicowania drastycznie spadał poziom czynników MyoD i miogeniny, charakterystycznych dla mięsaka prążkowanokomórkowego. Obserwowaliśmy również znaczący spadek poziomu receptora MET. Co więcej, komórki te zmieniały morfologię, na bardziej wydłużoną i traciły zdolność do aktywnej migracji. **Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały na niezmiernie istotną rolę receptora MET w utrzymaniu fenotypu komórek RMS. Nasze badania dowiodły, że receptor MET jest istotnym czynnikiem utrzymującym komórki mięsaka prążkowanokomórkowego w stanie niezróżnicowanym.**

Kolejne badania dotyczyły określenia, czy wyciszenie receptora MET powoduje zmiany fenotypowe w innych typach komórek nowotworowych. W swoich badaniach skupiliśmy się na nowotworze pochodzenia epitelialnego, raku szyjki macicy. Rak szyjki macicy jest jedną z głównych przyczyn śmierci kobiet z chorobą nowotworową na świecie. W Polsce co roku na tę chorobę zapada 4 000 kobiet a 5-letni okres przeżycia jest jednym z najniższych w Europie [31]. Jego wykrycie następuje często w późnych stadiach choroby, kiedy nowotwór silnie nacieka sąsiednie tkanki lub tworzy odległe przerzuty. W ostatnich latach dokonał się znaczny postęp we wczesnym wykrywaniu raka szyjki macicy, dzięki lepszemu dostępowi do badań cytologicznych a także wprowadzeniu szczepionek przeciw wirusom brodawczaka HPV16 i HPV18. Jednak w dalszym ciągu zdiagnozowany rak szyjki macicy stanowi poważny problem leczniczy. W próbkach izolowanych od pacjentek z różnym stadium rozwoju raka szyjki macicy wykazaliśmy, że wraz z rozwojem choroby rośnie poziom receptora MET i utrzymuje się on na wysokim poziomie w stadiach zaawansowanego nowotworu (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). Wykorzystując system lentiwirusowy i shRNA wyciszyliśmy receptor MET w komórkach raka szyjki macicy i zaobserwowaliśmy, że komórki po wyciszeniu receptra MET drastycznie zmieniają swoją wielkość, co potwierdziliśmy w szczegółowych analizach morfologicznych (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). Komórki z wyciszoną ekspresją receptora MET były mniejsze i charakteryzowały je niższe wartości parametrów opisujących morfologię. Nieopublikowane wyniki, uzyskane z analiz na mikroskopie konfokalnym, podczas pobytu na stażu w Instytucie Nauk Biomedycznych w Hiszpanii (IDIBELL, Bellvitge Biomedical Research Institute) wskazywały, że komórki te są słabiej rozpłaszczone i podobne do klasycznych komórek nabłonkowych. Analiza cytoszkieletu aktynowego wykazała także różnice w organizacji F-aktyny. W komórkach pozbawionych ekspresji receptora MET włókna F-aktyny rozmieszczone były najczęściej pod błoną komórkową w postaci cienkich wiązek i rzadko tworzyły włókna naprężeniowe, tak jak w komórkach nabłonkowych [32]. W komórkach kontrolnych, które charakteryzował wysoki poziom receptora MET, F-aktyna organizowała się w włókna naprężeniowe charakterystyczne dla komórek o fenotypie mezenchymalnym.

Zmiana morfologii jest jedną z charakterystycznych cech procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. epithelial to mesenchymal transition, EMT). Proces ten powoduje, że komórki epitelialne wyraźnie spolaryzowane, z połączeniami komórkowymi, wysoką ekspresją E-kadheryny i innych białek charakterystycznych dla komórek epitelialnych pod wpływem działania czynników wzrostu, cytokin czy innych czynników środowiskowych zmieniają morfologię na wydłużoną, stają się komórkami migrującymi z

ekspresją m.in. winkuliny, fibronektyny, N-kadheryny i zanikiem E-kadheryny. W czasie procesu EMT komórki nabywają cech mezenchymalnych ułatwiających im migrację, inwazję okolicznych tkanek i przerzutowanie. Nasze badania wskazały, że wyciszenie receptora MET indukowało wzrost poziomu E-kadheryny (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). E-kadheryna to transbłonowe białko zlokalizowane w połączeniach przylegających i odgrywające znaczącą rolę w utrzymaniu morfologii epitelialnej i hamowaniu inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych. Utrata ekspresji, bądź funkcji E-kadheryny jest uznanym markerem przejścia epitelialno-mezenchymalnego które może powodować zmianę niezłośliwego nowotworu w lokalnie agresywną i inwazyjną formę [33]. Wykazano, że kompleks HGF/MET odpowiedzialny jest za rozwój i progresję wielu typów nowotworów, a także za proces EMT [5]. Zaobserwowany przez nas wzrost poziomu E-kadheryny w guzach u myszy NOD-SCID dotyczył jednej z trzech badanych linii raka szyjki macicy z obniżonym poziomem MET, linii HTB-35. Obserwacje te potwierdziliśmy na poziomie białka metodą immunofuorescencyjną i metodą western blot. Komórki z wyciszoną ekspresją receptora MET wykazywały obecność E-kadheryny, która lokalizowała się pod błoną komórkową a nawet na granicach przylegających do siebie komórek, tak jak w komórkach epitelialnych. Komórki kontrolne miały bardzo niską ekspresję E-kadheryny, która była niezorganizowana w cytoplazmie komórek (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). Wykazano, że w czasie rozwoju raka szyjki macicy poziom E-kadheryny znacząco spada i jest w zasadzie niewykrywalny dla nowotworów przerzutujących [33]. Potwierdziła to wykonana przez nas analiza materialu pochodzącego od pacjentek z rakiem szyjki macicy, gdzie poziom E-kadheryny znacząco spadał wraz ze stopniem rozwoju nowotworu (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). **Nasze badania wykazały, że zahamowanie ekspresji receptora MET może przywrócić ekspresję E-kadheryny i wpłynąć na fenotyp komórek nowotworowych.** Poziom E-kadheryny w komórce regulują m.in. Snail, Slug, E47, ZEB-1 (δEF-1) i SIP-1 (ZEB-2), działając jako represory transkrypcji przyłączające się do promotora E-kadheryny [34-36]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że wyciszenie ekspresji receptora MET w komórkach raka szyjki macicy powodowało znaczący spadek ekspresji Slug tak na poziomie transkryptu, jak i na poziomie białka, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. W komórkach z wyciszonym poziomem receptora MET nie obserwowaliśmy ekspresji czynnika transkrypcyjnego Slug ani we frakcji cytoplazmatycznej ani jądrowej. Obserwacje te potwierdziły badania prowadzone *in vivo,* gdzie guzy powstałe z komórek kontrolnych charakteryzowała obecność czynnika transkrypcyjnego Slug, a w guzach z wyciszeniem receptora MET nie obserwowaliśmy obecności tego czynnika. Czynnik transkrypcyjny Slug lokalizował się głównie w jądrze w komórkach kontrolnych a w komórkach pozbawionych receptora MET jedynie w niewielkiej ilości występował w cytoplazmie komórek. Co więcej, analiza materiału od pacjentek z rakiem szyjki macicy wskazała, że tkankę nowotworową charakteryzuje wysoki poziom Slug korelujący ze spadkiem E-kadheryny (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). Nasze wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami nad procesem EMT w raku piersi, gdzie Slug hamował ekspresję E-kadheryny a nadekspresja czynnika transkrypcyjnego Slug w komórkach prawidłowych MDCK, powodowała spadek ekspresji E-kadheryny i stymulowała proces EMT [36]. Ciekawe wyniki przyniosły również badania nad rakiem płuc, gdzie przywrócenie ekspresji E-kadheryny zwiększało wrażliwość komórek nowotworowych na lek

cytostatyczny, gefitinib [37]. **Podsumowując, nasze badania wskazały, że receptor MET odpowiada za utrzymanie mezenchymalnego fenotypu w komórkach raka szyjki macicy.**

*Analiza poziomu ekspresji, aktywacji i funkcji receptorów chemokinowych, CXCR7 i CXCR4 w procesach nowotworzenia i przerzutowania w badaniach in vitro i in vivo*

Najczęstszą przyczyną zgonu pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową są powstające przerzuty i wzrost odporności na dostępne terapie. Receptorami pełniącymi istotną rolę w procesach naciekania sąsiadujących z guzem tkanek i przerzutowania do odległych narządów są receptory chemokinowe. Jednym z receptorów chemokinowych szczególnie istotnym w procesie progresji nowotworu jest receptor CXCR4 [38]. Komórki nowotworowe z wysokim poziomem receptora CXCR4 migrują do miejsc wydzielających ligand dla receptora CXCR4, chemokinę CXCL12/SDF-1. Wysoki poziom tej chemokiny wykazano w potencjalnych miejscach przerzutów komórek nowotworowych t.j. węzły chłonne, płuca, wątroba, a także kości i szpik kostny [39]. Komórki nowotworowe guza pierwotnego wykorzystują oś CXCL12/CXCR4 do efektywnej migracji i adhezji, a w miejscu powstania przerzutu do tworzenia naczyń krwionośnych w procesie angiogenezy i przeżycia komórek, przyczyniając się tym samym do utworzenia ognisk wtórnych. Zjawisko to opisano m.in. dla raka piersi, prostaty, jajnika, trzustki, niedrobnokomorkowego raka płuc, gliomy, glioblastomy oraz ostrej białaczki limfoblastycznej [39]. Wysoką ekspresję receptora CXCR4 wykazano również dla komórek mięsaka prąkowanokomórkowego [40,41] i raka szyjki macicy [42]. Uzyskane przez nas wyniki, dzięki analizie materiału od pacjentek z różnym stadium rozwoju raka szyjki macicy, wykazały, że poziom receptora CXCR4 jest bardzo wysoki na każdym stopniu rozwoju nowotworu. **Wysoki poziom receptora CXCR4 w początkowym stadium rozwoju nowotworu wskazuje, że może on wpływać na przerzutowanie komórek już na bardzo wczesnym etapie (Miękus i in., 2015, pozycja 2)**. Dlatego, w kolejnych doświadczeniach sprawdziliśmy znaczenie tego receptora dla procesów wzrostu, progresji i przerzutowania raka szyjki macicy (**Sekula i in. 2014, pozycja 3**). W swoich badaniach wykorzystaliśmy technikę wyciszenia ekspresji genów przy użyciu shRNA i systemu lentiwirusowego. Metoda ta pozwoliła otrzymać komórki ze stabilnie wyciszonym receptorem CXCR4 zarówno na poziomie RNA jak i na poziomie białka. Tak zmodyfikowane komórki wykorzystaliśmy do określenia wpływu wyciszenia receptora CXCR4 na wzrost, zdolność klonogenną komórek oraz ekspresję genów związanych z procesami angiogenezy oraz przerzutowania. Pomimo, że nie zauważyliśmy wpływu wyciszenia receptora CXCR4 na proliferację komórek, ani w klasycznej pożywce z 10% surowicą ani w warunkach głodzenia, zaobserwowaliśmy zmianę stosunku tworzonych klonów przez pojedyncze komórki nowotworowe (**Sekula i in. 2014, pozycja 3**). Spadek poziomu CXCR4 korelował ze wzrostem ilości tworzonych paraklonów i spadkiem holoklonów, które są tworzone z komórek podobnych do komórek macierzystych, lub komórek inicjujących powstawanie nowotworu [43]. Receptor CXCR4 jest m.in. istotny dla utrzymania fenotypu macierzystego komórek nowotworowych [44]. Nasze wyniki wskazały na potencjalny udział tego receptora również w utrzymaniu potencjału macierzystego w komórkach raka szyjki macicy. Kolejne badania wykazały, że pomimo braku wpływu wyciszenia receptora CXCR4 na proliferację komórek w warunkach *in vitro*, spadek poziomu receptora znacząco redukował wzrost guza *in vivo*, po podskórnym podaniu

komórek do myszy NOD-SCID. Nie obserwowaliśmy jednak znaczących róznic w ilości komórek nowotworowych przerzutujących do płuc i zasiedlających płuca w modelu krótko- i długoterminowym, oraz zasiedlających śledzionę, po 30 dniach od podania komórek (**Sekula i in. 2014, pozycja 3**).

Drugim receptorem dla chemokiny SDF-1 jest receptor CXCR7, którego wysoki poziom utrzymywał się w komórkach raka szyjki macicy (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**). Wykazano, że chemokina SDF-1 wiąże się z receptorem CXCR7 znacznie wydajniej niż z CXCR4 [45]. Jednak w przeciwieństwie do CXCR4, aktywacja receptora CXCR7 nie stymuluje migracji ani wzrostu wewnątrzkomórkowego $Ca^{2+}$ natomiast wpływa na proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych a także działała proangiogennie [13]. W prowadzonych w naszym zespole badaniach wykazaliśmy, że komórki raka szyjki macicy posiadają wysoki poziom receptora CXCR7 (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**). Analizując wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazu sygnału po stymulacji ligandem receptora CXCR7, chemokiną CXCL11, inaczej zwaną I-TAC (ang. interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant), wykazaliśmy, dla dwóch linii raka szyjki macicy, HTB-35 i HeLa, aktywację szlaku kinaz aktywowanych mitogenem (ang. MAPK mitogen activated protein kinases). Kinazy te zaangażowane są m.in. w procesy proliferacji [46]. Linia HeLa, odpowiedziała również dodatkowo aktywacją kinazy białkowej AKT. Serynowo-treoninowa kinaza białkowa Akt, będąca głównym przekaźnikiem sygnału w szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K), odgrywa istotną rolę w regulacji procesów związanych ze wzrostem, metabolizmem, przeżyciem i proliferacją komórek. W komórkach nowotworowych jej aktywacja może przyczyniać się do hamowania apoptozy, promowania proliferacji komórek oraz regulowania ich zdolności do migracji i inwazji [47]. Pomimo obserwowanego przez nas wpływu I-TAC na aktywację kinaz MAPK i AKT nie skutkowało to wzrostem przeżywalności oraz migracji komórek nowotworowych. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy, że zastosowanie niskiej dawki I-TAC razem z chemokiną SDF-1 wzmacniało aktywację szlaku kinaz MAPK oraz migrację w kierunku SDF-1 wskazując, że I-TAC może uwrażliwić komórki nowotworowe na działanie SDF-1 (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**). **Otrzymane wyniki wskazywały, że receptory CXCR7 i CXCR4 mogą współdziałać ze sobą w przekazie sygnału od SDF-1**. Receptor CXCR7 jest uznawany za tzw. receptor „pułapka" (ang. *decoy receptor*), który pomimo wiązania z ligandem nie wykazuje zdolności do indukowania typowych dla białek G ścieżek przekazywania sygnału. Jednak wykazano, że może tworzyć heterodimery z receptorem CXCR4 a przez to wzmacniać działanie SDF-1 [45]. Możliwe, że jest to związane ze zdolnością do działania za pośrednictwem β-arrestyny, co prowadzi do aktywacji ERK1/2, p38MAPK, SAPK [48].

W swoich badaniach wykazaliśmy również, że receptor CXCR7 występuje również w innych nowotworach (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**). Przeprowadzone doświadczenia dowodły, że linie komórkowe glejaka wielopostaciowego i mięsaka prążkowanokomórkowego posiadają receptor CXCR7 zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Jednak poziom mRNA jak i białka badanego receptora różnił się w zależności od badanej linii komórkowej. Zaobserwowaliśmy, że linie komórkowe o fenotypie łagodniejszym posiadały niższy poziom ekspresji CXCR7. Były to linie mięsaka prążkowanokomórkowego typu embrionalnego (SMS-CTR i RD) oraz linia raka szyjki macicy, HTB-34. Najwyższy poziom ekspresji prezentowały linie mięsaka

prążkowanokomórkowego podtypu alveoarnego, bardziej agresywnego (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**). Co potwierdziły badania na innych nowotworach wskazując, że poziom ekspresji receptora CXCR7 jest znacznie podwyższony i często związany z wysokim stopniem agresywności nowotworu [16]. Komórki raka szyjki macicy i mięsaka prążkowanokomórkowego mające wysoki poziom receptora CXCR7 (**Miekus i in. 2010, pozycja 4**) posiadały również wysoki poziom receptora CXCR4 [25, **Miekus i in., 2013, pozycja 1, Miekus i in. 2015, pozycja 2**]. Zaobserwowano, że wysoka ekspresja receptora CXCR7 może stymulować wzrost komórek niektórych nowotworów oraz hamować proces apoptozy. Wysoki poziom receptora CXCR7 w komórkach raka szyjki macicy może częściowo tłumaczyć obserwowany przez nas brak różnic w proliferacji komórek oraz krótko- i długoterminowym zasiedlaniu komórek w płucach w modelu *in vivo,* po wyciszeniu receptora CXCR4 (**Sekula i in. 2014, pozycja 3**). Prowadzone przez nas badania wskazały, że **ligand receptora CXCR7 współdziałając z chemokiną SDF-1 wzmacniał aktywację kinaz zależnych od mitogenów mogąc w ten sposób wpływać na procesy proliferacji i przeżywalność komórek nowotworowych.**

*Określenie wpływu poziomu receptora MET na ekspresję i aktywację receptora CXCR4*

Wyciszenie receptora MET powodowało nie tylko zmiany dotyczące poziomu zróżnicowania komórek, ale również przełożyło się na znaczące obniżenie ilości komórek nowotworowych w szpiku kostnym w badaniach *in vivo* (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). W naszych badaniach określaliśmy zdolność komórek do przerzutowania oraz krótkoterminowego zasiedlania szpiku kostnego po wyciszeniu receptora MET w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego. W obydwu przypadkach zahamowanie ekspresji receptora MET w komórkach RMS skutkowało znaczącym obniżeniem przerzutujących komórek do szpiku (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Ludzkie komórki RMS podane do myszy NOD-SCID poddawane były działaniu mysich czynników, które mogłyby wpływać na ich funkcje. Jednym z chemoatraktantów dla komórek RMS jest ligand receptora MET, HGF [25]. Jednak w naszych badaniach wykazaliśmy, że ludzkie komórki RMS nie odpowiadały na działanie mysiego liganda dla receptora MET kierunkową migracją i inwazją, pomimo początkowej aktywacji szlaku przekazu sygnału kinaz AKT i MAPK (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Wykazano, że komórki RMS posiadają na swojej powierzchni aktywny receptor CXCR4 i odpowiadają na chemokinę SDF-1, migracją, adhezją i w konsekwencji przerzutowaniem m.in. do szpiku kostnego [25, 39, 40]. Prowadzone przez nas badania wykazały, że komórki RMS z wyciszonym poziomem receptora MET charakteryzuje drastyczny spadek receptora CXCR4 co może tłumaczyć obserwowany spadek ilości komórek przerzutujących do szpiku kostnego. Spadek ilości receptora CXCR4 wpływał również na obniżoną fosforylację kinaz AKT i MAPK po działaniu chemokiny SDF-1 (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**).

Nasze wyniki wskazały, że różnicowanie komórek mięsaka prążkowanokomórkowego powoduje znaczny spadek poziomu receptora MET, dlatego w kolejnych badaniach sprawdziliśmy, czy sam proces różnicowania wpływa na zmiany poziomu receptora CXCR4 (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Wykazaliśmy, że poddanie komórek RMS procesowi różnicowania powoduje wyraźny spadek receptora CXCR4 na poziomie transkryptu i białka, i zupełnie hamuje aktywność migracyjną komórek (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). Podobne

zjawisko zaobserwowaliśmy w kolejnym badaniu, w którym analizie poddaliśmy komórki raka szyjki macicy (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). Wyciszenie receptora MET powodowało drastyczny spadek transkryptu i białka CXCR4 i w konsekwencji brak aktywacji szlaku przekazu sygnału kinaz AKT i MAPK po działaniu SDF-1. Obserwacja ta jest niezmiernie istotna w świetle dotychczasowych badań wskazujących na rolę osi SDF-1-CXCR4 w procesie przerzutowania komórek raka szyjki macicy i innych komórek nowotworowych (**Sekuła i in., 2014, pozycja 3**).

Nasze kolejne badania dotyczyły sprawdzenia czy zablokowanie aktywności receptora MET wpłynie również na poziom i aktywność receptora CXCR4 (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). W tym celu użyliśmy specyficznego inhibitora aktywności kinazowej receptora MET, SU11274. Zaobserwowaliśmy nie tylko zahamowanie przekazu sygnału po działaniu liganda receptora MET, HGF, ale również zmiany w morfologii komórek. Komórki po działaniu inhibitora stawały się bardziej wydłużone, podobnie jak po wyciszeniu receptora MET przy użyciu wektorów lentiwirusowych i shRNA [18]. Najistotniejszą obserwacją był spadek poziomu i aktywacji receptora CXCR4 i związany z tym spadek aktywności migracyjnej (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). **Nasze badania wykazały bezpośrednią zależność pomiędzy receptorami CXCR4 i MET związaną z poziomem aktywacji receptora MET i wskazały po raz pierwszy, że funkcjonalny receptor MET jest niezbędny dla prawidłowej ekspresji i aktywacji receptora CXCR4 w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego.** Nasze badania mogą być wyjaśnieniem obserwowanego już wcześniej wysokiego poziomu receptorów MET i CXCR4 w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego [25]. Podobne wyniki otrzymano dla komórek raka piersi, gdzie aktywacja ścieżki sygnałowej od receptora MET prowadziła do aktywacji kinazy Src i w konsekwencji przez czynniki transkrypcyjne, NF-kß i Ets1, wzrostu bądź spadku ekspresji receptora CXCR4 [49]. Obserwowana przez nas zależność pomiędzy MET i CXCR4 w komórkach RMS może być również związana z aktywacją tych ścieżek sygnałowych. Zaobserwowaliśmy, że zarówno wyciszenie ekspresji receptora MET jak i proces różnicowania powodują spadek poziomu kinazy Src (**Miekus i in., 2013, pozycja 1**). **Podsumowując, nasze badania wskazały, że receptor MET reguluje poziom i aktywność receptora CXCR4 w komórkach raka szyjki macicy i mięsaka prążkownokomórkowego.**

*Ocena wpływu receptora MET na procesy wzrostu, przeżywalności i migracji komórek nowotworowych*

Jedną z najbardziej podstawowych cech komórek nowotworowych jest ich zdolność do ciągłego podtrzymywania proliferacji [1]. Proces ten, podlega ścisłej kontroli, zarówno ze strony samej komórki jak i całej prawidłowej tkanki. Czynniki promujące podział komórek to w głównej mierze czynniki wzrostowe wiążące się z receptorami zawierającymi wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej. Receptor MET jest jednym z receptorów należących do grupy receptorów o właściwościach kinazy tyrozynowej, który stymuluje proliferację, hamuje apoptozę i wpływa na ruchliwość wielu typów komórek, w tym komórek nowotworowych [5]. Badania nad znaczeniem receptora MET w procesach wzrostu i przeżywalności komórek prowadzone na komórkach raka szyjki macicy (**Miekus i in., 2015, pozycja 2**). wykazały, że stabilne wyciszenie ekspresji receptora MET powodowało

obniżenie aktywności proliferacyjnej linii komórkowej HTB-35 w warunkach normoksji, głodzenia (0,5% BSA) i hipoksji (2% tlenu). W naszych badaniach wykazaliśmy także, że obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek po wyciszeniu receptora MET nie wynikało ze zwiększonej aktywności apoptotycznej tych komórek, ale było efektem zmian w cyklu komórkowym a także obniżonej ekspresji cykliny D1 i czynnika transkrypcyjnego c-myc. Kolejnym krokiem badawczym było sprawdzenie czy obecność receptora MET wpływa na wzrost komórek raka szyjki macicy w warunkach *in vivo*, po podskórnym podaniu komórek do myszy NOD-SCID, z upośledzonym układem odporności. Otrzymane wyniki wskazały, że receptor MET ma istotne znaczenie dla wzrostu jednej z trzech badanych linii komórkowych. Komórki linii HTB-35 pozbawione receptora MET tworzyły bardzo małe guzy o średniej masie (0,08 g) w porównaniu do guzów, które powstały po podaniu komórek kontrolnych z wysokim poziomem receptora MET (średnia masa 1,7 g). Co więcej, u 6 z 15 zwierząt, którym podano komórki HTB-35 z wyciszonym receptorem MET guzy nie wyrosły. **Nasze wyniki wskazały, że obecność receptora MET jest kluczowa dla utrzymania wysokiego stopnia proliferacji a także, dla inicjacji i wzrostu guza *in vivo*.** Co więcej, tak spektakularne wyniki otrzymane dla badanej linii komórkowej, HTB-35, świadczyły o jej zależności od receptora MET. Zjawisko uzależnienia od onkogenów procesów przeżycia czy proliferacji zostało wykazane dla niektórych nowotworów [50], a uzależnienie od receptora MET wskazała po raz pierwszy grupa Comoglio [51].

Badania prowadzone przez nasz zespół nad mięsakiem prążkowanokomórkowym charakteryzującym się wysokim poziomem receptora MET wskazały, że zastosowanie geldanamycyny i jej pochodnych powoduje znaczące obniżenie poziomu receptora MET oraz zahamowanie zależnej od osi HGF-MET migracji i inwazji komórek [52,53]. Geldanamycyna to benzochinonowy antybiotyk ansamycynowy hamujący działanie białka szoku cieplnego Hsp90 [54]. Z uwagi na wcześniejsze obserwacje [52,53] i fakt, że receptor MET jest jednym z białek docelowych dla Hsp90 w naszych kolejnych badaniach sprawdzaliśmy jak geldanamycyna i jej pochodne wpływają na proliferację i aktywność migracyjną komórek. Wykazaliśmy, że geldanamycyny hamują proliferację i indukują apoptozę w komórkach glejaka wielopostaciowego z wysokim poziom ekspresji tego receptora (**Miekus i in., 2012, pozycja 5**). Najciekawszą obserwacją było wskazanie, że poziom receptora MET na powierzchni komórek spadał po działaniu geldanamycyn. Co więcej, obecność geldanamycyn hamowała zależną od HGF chemotaksję i inwazję komórek glejaka. Najbardziej znaczące efekty uzyskaliśmy po wcześniejszej, 6–godzinnej inkubacji komórek glejaka w obecności geldanamycyn (**Miekus i in., 2012 pozycja 5**). Geldanamycyna i jej analogi zostały opisane z uwagi na ich zdolność do hamowania wzrostu nowotworów i obniżania ekspresji receptorów tyrozynowych [52,53,55]. Jednak geldanamycyna charakteryzuje się dużą toksycznością, a jej analog, 17-AAG, jest nierozpuszczalny w wodzie [52]. W świetle tych informacji wydaje się, że badana przez nas pochodna gedanamycyny, 17-AEP-GA, może stwarzać potencjalnie większe możliwości zastosowań (**Miekus i in., 2012, pozycja 5**). Jest ona rozpuszczalna w wodzie i wykazuje się wydajnym blokowaniem wzrostu i migracji komórek nowotworowych z mniejszym toksycznym efektem ubocznym [53]. Otrzymane przez nas wyniki wskazały, że receptor MET jest istotny w procesie proliferacji, kierunkowej migracji oraz inwazji komórek glejaka oraz, że wykorzystując geldanamycyny możliwe jest obniżenie poziomu tego receptora (**Miekus i in., 2012, pozycja 5**). Obserwacje te potwierdziły badania na komórkach

mięsaka prążkowanokomórkowego wskazujące, że zahamowanie ekspresji receptora MET przy użyciu shRNA powoduje istotne obniżenie aktywności migracyjnej i inwazyjności komórek w warunkach *in vitro* oraz hamuje wzrost guzów i zasiedlanie szpiku kostnego u myszy NOD-SCID [18, **Miekus i in., 2013, pozycja 1**]. **Nasze badania wskazały, że receptor MET jest istotnym czynnikiem regulującym aktywność proliferacyjną *in vitro*, inicjację wzrostu guza *in vivo* oraz migrację komórek nowotworowych.**

**Podsumowanie**

Prace badawcze przedstawione jako Osiągnięcie Naukowe wskazały na istotną rolę dwóch receptorów chemokinowych, CXCR4 i CXCR7 oraz receptora MET o właściwościach kinazy tyrozynowej w procesach wzrostu, progresji i tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe, zarówno w układach *in vitro* jak i *in vivo*. W pracy przeglądowej (**Miękus, 2017, pozycja 6)** zebrano najnowsze dane dotyczące roli receptora MET w procesie rozwoju choroby nowotworowej, jego znaczenia w procesie przerzutowania, utrzymania fenotypu komórek macierzystych oraz oporności na stosowane leczenie.

Najważniejszymi osiągnięciami mojej pracy badawczej jest wskazanie, że receptory MET i CXCR4 wydają się mieć zasadnicze znaczenie w utrzymaniu fenotypu nowotworowego badanych komórek a obecność receptora MET reguluje ekspresję receptora CXCR4, odpowiedzialnego w głównej mierze za przerzutowanie komórek nowotworowych.

Nasze badania wykazały, że:

- receptor MET jest istotnym czynnikiem utrzymującym niezróżnicowany/ mezenchymalny fenotyp komórek nowotworowych;
- obecność receptora MET jest istotna dla aktywności proliferacyjnej komórek w warunkach *in vitro* oraz inicjacji i wzrostu guza w warunkach *in vivo;*
- poziom receptora CXCR4 jest bardzo wysoki na każdym stopniu rozwoju raka szyjki macicy i może wpływać na przerzutowanie komórek już na bardzo wczesnym etapie;
- receptor CXCR4 reguluje potencjał klonogenny w układzie *in vitro* i potencjał proliferacyjny komórek raka szyjki macicy w warunkach *in vivo* w mysim modelu doświadczalnym;
- receptor CXCR7 współdziała z receptorem CXCR4 w przekazie sygnału od SDF-1;
- receptor MET reguluje poziom i aktywność receptora CXCR4 wpływając na proces przerzutowania;

Leczenie zaawansowanego stadium choroby nowotorowej jest często nieskuteczne, dlatego każdy postęp w lepszym zrozumieniu jej mechanizmów daje nadzieję na udoskonalenie standardów leczenia. Prowadzone przeze mnie badania z wykorzystaniem technik interferencji RNA, inhibitorów farmakologicznych oraz różnych warunków hodowli indukujących proces różnicowania, wskazały, że hamowanie ekspresji i aktywności badanych receptorów może mieć potencjalne znaczenie w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych lub być potencjalnym uzupełnienieniem terapii stosowanych w leczeniu mięsaka prążkowanokomórkowego i raka szyjki macicy. Nasze badania przyczyniły się do

lepszego zrozumienia roli receptorów MET, CXCR4 i CXCR7 w procesie rozwoju choroby nowotworowej.

**Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Moje zainteresowania biologią komórek nowotworowych zaczęły się już w szkole średniej i rozwinęły w czasie studiów biologicznych na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, kiedy dołączyłam do zespołu Profesora Włodzimierza Korohody, kierownika Zakładu Biologii Komórki na Uniwersytecie Jagiellońskim. Moje badania do pracy magisterskiej dotyczyły znaczenia zjawisk kontaktowych w aktywności ruchowej komórek nowotworowych. Dyplom magistra uzyskałam w 1999 roku broniąc pracę: „Wpływ homo- i heterotypowych oddziaływań komórka – komórka na aktywność ruchową komórek raka prostaty szczura". Kolejne lata spędzone na studiach doktoranckich w Zakładzie Biologii Komórki pozwoliły mi kontynuować i rozwinąć rozpoczęte badania. Skupiłam się na wpływie zjawisk kontaktowych oraz komunikacji międzykomórkowej przez złącza szczelinowe na aktywność ruchową komórek nowotworowych o różnym potencjale metastatycznym. Pracę doktorską „Komunikacja międzykomórkowa i stymulowana przez kontakt migracja komórek szczurzego raka prostaty o różnej aktywności metastatycznej" obroniłam z wyróżnieniem w 2006 roku. Z tego okresu pochodzą prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych:

Madeja Z, **Miękus K**, Sroka J, Djamgoz MB, Korohoda W. (2001) Homotypic cell-cell contacts stimulate the motile activity of rat prostate cancer cells. BJU Int. 88(7):776-86.

Madeja Z, Szymkiewicz I, Zaczek A, Sroka J, **Miękus K**, Korohoda W. (2001) Contact-activated migration of melanoma B16 and sarcoma XC cells. Biochem Cell Biol. 79(4):425-40.

**Miękus K**, Czernik M, Sroka J, Czyz J, Madeja Z (2005) Contact stimulation of prostate cancer cell migration: the role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts in determination of the metastatic phenotype of Dunning rat prostate cancer cells. Biol Cell. 97(12):893-903.

**Miękus K**, Madeja Z (2007) Genistein inhibits contact-stimulated migration of prostate cancer cells. Cell Mol Biol Lett. 12(3):348-61.

Kontynuowanie moich zainteresowań obejmujących procesy nowotworzenia i tworzenia przerzutów umożliwił mi pobyt w laboratorium Profesora Mariusza Ratajczaka na Uniwersytecie w Louisville (USA). Byłam zaangażowana w liczne projekty naukowe finansowane przez NIH NCI (*CXCR4-SDF-1 Axis in metastatic rhabdomyosarcoma)* i Kentucky Lung Cancer Research Fund *(The role of microparticles in lung cancer progression, angiogenesis and metastasis).*

W czasie pobytu na stażu uczestniczyłam w badaniach dotyczących znaczenia mikrofragmentów w procesie komunikacji pomiędzy komórkami, które zostały opublikowane w czasopiśmie Leukemia:

Ratajczak J, **Miękus K**, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. Leukemia. 20(5):847-56.

W czasie odbywania stażu zainteresowałam się również znaczeniem receptorów powierzchniowych w rozwoju i progresji choroby nowotworowej i brałam udział w badaniach

obejmujących określenie roli osi CXCR4-SDF-1, MET-HGF i LIFR-LIF w rozwoju i przerzutowaniu mięsaka prążkowanokomórkowego i poszukiwaniach korelacji między ekspresją genów a rozwojem i przerzutowaniem komórek nowotworowych. Zajmowałam się również procesami izolacji, hodowli i różnicowania komórek macierzystych oraz ocenie roli osi CXCR4 SDF-1 w procesie migracji macierzystych komórek do wątroby i szpiku kostnego podczas rozwoju embrionalnego. Badania te zostały opublikowane:

Kucia M, Reca R, **Miękus K**, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. Stem Cells. Aug;23(7):879-94

Wysoczynski M, **Miekus K**, Jankowski K, Wanzeck J, Bertolone S, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2007) Leukemia Inhibitory Factor: A newly identified metastatic factor in Rhabdomysarcoma. Cancer Res. 67(5):2131-40.

Po powrocie do kraju podjęłam pracę w Zakładzie Transplantologii, Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJCM), gdzie kontynuowałam rozpoczęte w Stanach Zjednoczonych badania. Włączyłam się aktywnie do prac prowadzonych przez zespół Zakładu Transplantologii i w pierwszym okresie zajęłam się znaczeniem receptora o aktywności kinazy tyrozynowej, MET, w procesach rozwoju i przerzutowania mięsaka prążkowanokomórkowego oraz wpływu receptora CXCR4 na funkcje mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej. Efektem tych prac były publikacje:

Lukasiewicz E*, **Miekus K***, Kijowski J, Gozdzik J, Wilusz M, Bobis-Wozowicz O, Wiecha O, Majka M (2009) High anti tumor activity against rhabdomyosarcoma cells and low normal cells cytotoxicity of heat shock protein 90 inhibitors, with special emphasis on 17-[2-(pyrrolidin-1-YL)ethyl] – amino-17-demethoxygeldanamycin. J Physiol Pharmacol 60(3):161-6. (* autorstwo równoważne)

Lukasiewicz E, **Miekus K**, Kijowski J, Drabik G, Wilusz M, Bobis-Wozowicz S, Majka M (2009) Inhibition of Rhabdomyosarcoma's metastatic behavior through blocking of MET receptor signaling. Folia Histochem Cytobiol. Jan;47(3):485-9.

Püsküllüoglu M, Lukasiewicz E, **Miekus K**, Jarocha D, Majka M (2010) Differential expression of Snail1 transcription factor and Snail1-related genes in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma subtypes. Folia Histochem Cytobiol. 48(4):671-7.

Bobis-Wozowicz S, **Miekus K**, Wybieralska E, Jarocha D, Zawisz A, Madeja Z, Majka M (2011) Genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 display increased motility, invasiveness, and homing to bone marrow of NOD/SCID mice. Exp Hematol. 39(6):686-696

Równolegle współpracowałam z Zakładem Biologii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ biorąc udział w badaniach dotyczących regulacji aktywności migracyjnej komórek nowotworowych i komunikacji przez złącza szczelinowe. Z tego okresu pochodzą prace:

Daniel-Wójcik A, Misztal K, Bechyne I, Sroka J, **Miekus K**, Madeja Z, Czyz J. (2008) Cell motility affects the intensity of gap junctional coupling in prostate carcinoma and melanoma cell populations. Int J Oncol. 33(2):309-15

Sarna M, Wybieralska E, **Miekus K**, Drukala J, Madeja Z (2009) Topographical control of prostate cancer cell migration. Mol Med Rep. 2;5

Wybieralska E, Szpak K, Górecki A, Bonarek P, **Miękus K**, Drukała J, Majka M, Reiss K, Madeja Z, Czyż J. (2011) Fenofibrate attenuates contact-stimulated cell motility and gap junctional coupling in DU-145 human prostate cancer cell populations. Oncol Rep. 26(2):447-53.

Moje kolejne badania prowadzone w Zakładzie Transplantologii UJ CM dotyczyły poznania roli receptorów chemokinowych CXCR4 i CXCR7 w mięsaku prążkowanokomórkowym, glejaku wielopostaciowym i raku szyjki macicy. Zainteresowały mnie głównie możliwości wyciszenia ekspresji genów, użycie specyficznych inhibitorów, ich wpływ na przekaz sygnału wewnątrzkomórkowego i w konsekwencji zachowanie komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Prowadzone przez mnie w tym okresie badania zaowocowały powstaniem publikacji wchodzących w skład Osiągnięcia Naukowego.

W celu poznania badania interakcji receptorów MET i CXCR4 uzyskałam finansowanie European Molecular Biology Organization i w 2011 roku, wyjechałam na staż do grupy Profesor Isabel Fabregat do Instytutu Nauk Biomedycznych w Hiszpanii (Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły określenia lokalizacji i ścieżek internalizacji receptorów MET i CXCR4 oraz losów receptora CXCR4 po wyciszeniu ekspresji receptora MET. Nawiązana współpraca zaowocowała wizytą prof. Isabel Fabregat w Zakładzie Transplantologii i udziale w II Ogólnopolskim Kongresie Biochemii i Biologii Komórki w Krakowie w 2011 roku oraz wspólnymi doniesieniami konferencyjnymi.

Równolegle, w ramach współpracy z prof. Martą Miauczyńską z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie badaliśmy znaczenie białka APPL2 w procesie rozwoju glejaka wielopostaciowego w modelu *in vivo*. Praca ta zaowocowała wspólnym projektem badawczym z Narodowego Centrum Nauki oraz publikacją:

Pyrzynska B, Banach-Orlowska M, Teperek-Tkacz M, **Miekus K**, Drabik G, Majka M, Miaczynska M. (2013) Multifunctional protein APPL2 contributes to survival of human glioma cells. Mol Oncol. 7(1):67-84.

W 2013 roku dołączyłam do zespołu profesor Jolanty Jury, kierownika Zakładu Biochemii Ogólnej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ i rozpoczęłam badania dotyczące roli receptora MET i białka MCPIP1 w procesie progresji jasnokomórkowego raka nerki. Na prowadzenie badań uzyskałam finansowanie w konkursie „Sonata" Narodowego Centrum Nauki 2013/09/D/NZ5/00249 „Analiza molekularna progresji jasnokomórkowego raka nerki w aspekcie poszukiwania czynników predykcyjnych przed planowanym leczeniem" (projekt w trakcie realizacji w latach 2014-2017). Prowadzone w ramach tego projektu badania dotyczyły poznania molekularnych mechanizmów regulujących powstawanie, wzrost i przerzutowanie raka nerki. Obejmowały analizę różnego stopnia rozwoju raka nerki, korelację z aktywnością receptorów MET i CXCR4 oraz ich regulację przez białko MCPIP1. MCPIP1 jest nowo odkrytym białkiem zaangażowanym w negatywną regulację stanu zapalnego, które degraduje m. in. mRNA cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 czy IL-1β [56], a jego rola w procesie rozwoju choroby nowotworowej jest słabo poznana.

Nasze badania prowadzone były w układzie *in vitro* na liniach komórkowych, *in vivo* na mysim modelu doświadczalnym oraz na materiale od pacjentów z różnym stopniem rozwoju choroby nowotworowej. Analizy te były możliwe dzięki nawiązanej współpracy z Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddziału w Krakowie. Otrzymane wyniki wskazujące na kluczową rolę białka MCPIP1 w regulacji poziomu receptorów MET i CXCR4 oraz procesie ukrwienia raka jasnokomórkowego nerki zaowocowały publikacją:

Marona P, Górka J., Mazurek Z, Wilk W, Rys J, Majka M, Jura J, **Miekus K** (2017) MCPIP1 downregulation in clear cell renal cell carcinoma promotes vascularization and metastatic progression. Cancer Res. July 17, 2017 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3190

**Obecnie prowadzone badania i przyszłe plany badawcze**

Kontynuując badania dotyczące jasnokomórkowego raka nerki i współpracę z krakowskim Centrum Onkologii uzyskałam finansowanie w ramach projektu OPUS 2015/19/B/NZ5/01405 Projekt ten obejmuje dokładne poznanie funkcji białka MCPIP1 w procesie wzrostu i ukrwienia jasnokomórkowego raka nerki. Otrzymane wyniki będą stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej pani mgr Pauliny Marony, w przewodzie której, pełnię rolę promotora pomocniczego.

Rozwój choroby nowotworowej jest procesem złożonym i związanym m.in. ze związkiem pomiędzy zapaleniem i procesem przejścia epitelialno-mezenchymalnego co skłania do poszukiwania celów terapeutycznych będących łącznikami obydwu zjawisk i pozwalających kompleksowo potraktować chorobę. Obecnie uważa się, że stan zapalny jest czynnikiem indukującym proces EMT a czynnik transkrypcyjny NF-κß, główny regulator odpowiedzi zapalnej, może bezpośrednio wpływać na ekspresję potencjalnych aktywatorów EMT. Badania naszego zespołu i innych grup wykazały, że transkrypcyjna aktywność NF-κß jest hamowana przez białko MCPIP1 [57]. Ostatnie badania pokazały również, że MCPIP1 degraduje transkrypt C/EBPβ i tym samym hamuje różnicowanie preadipocytów [58]. Badania prowadzone na komórkach raka piersi wykazały zaś, że ekspresja C/EBPβ była hamowana podczas procesu EMT, a utrata C/EBPβ zwiększała właściwości inwazyjne komórek nowotworowych i ich przerzutowanie do płuc [59]. Dlatego kolejne moje badania dotyczą oceny wpływu białka MCPIP1, hamującego aktywność NF-κß i regulującego poziom C/EBPβ, na proces EMT, na które uzyskałam finanowanie w ramach projektu WBBiB KNOW 35p/3/2015 „Analiza molekularna udziału białka MCPIP1 w hamowaniu przejścia epitelialno - mezenchymalnego". Wyniki tych badań będą stanowić część rozprawy doktorskiej pani Judyty Górki, której jestem opiekunem naukowym.

Jestem również zaangażowana w prace badawcze Zakładu Biochemii Ogólnej, czego efektem jest publikacja dotycząca białka MCPIP1 w rozwoju raka jasnokomórkowego nerki:

Ligeza J, Marona P, Gach N, Lipert B, **Miekus K**, Wilk W, Jaszczynski J, Stelmach A, Loboda A, Dulak J, Branicki W, Rys J, Jura J. (2017) MCPIP1 contributes to clear cell renal cell carcinomas development. Angiogenesis. Feb 14

Powyżej zebrałam najważniejsze osiągnięcia mojej pracy naukowej, stanowiącej podstawę rozprawy habilitacyjnej oraz innych prowadzonych badań. Moja dotychczasowa praca naukowa została doceniona dwukrotnie przez towarzystwo American Association for Cancer

Research (Scholar-in-Training Award by American Association for Cancer Research - Arlington, VA, USA w 2010 r i Orlando, FL, USA w 2011). Moje stypendia wyjazdowe finansowane były przez European Molecular Biology Organization i Human Frontier Science Program. Otrzymałam także stypendium konferencyjne Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Uzyskane wyniki moich badań zostały prezentowane w postaci 57 doniesień konferencyjnych zarówno w kraju jak i za granicą. Na swoje badania wielokrotnie uzyskiwałam finansowanie w ramach projektów wewnętrznych Collegium Medicum, z Ministerstwa Nauki Szkolnistwa Wyższego i Narodowego Centrum Nauki. Do tej pory byłam kierownikiem 7 projektów badawczych.

Sumaryczny współczynnik wpływu Impact Factor moich publikacji wg bazy JCR (zgodnie z rokiem ukazania się publikacji) wynosi 82,96; łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW wynosi 577 pkt; sumaryczna liczba cytowań wg Web of ScienceTM (bez autocytowań) wynosi 1216; a Indeks Hirscha równy jest 11 (dane z 17.07.2017).

Ważnym aspektem mojej aktywności naukowej jest również praca dydaktyczna. Jestem promotorem pomocniczym doktoranta z otwartym przewodem doktorskim i opiekunem naukowym doktoranta, który nie ma jeszcze otwartego przewodu doktorskiego. Byłam również promotorem 6 prac magisterskich i 4 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 nr 3.

## Literatura


**1.** Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5):646-74.

**2.** Uehara Y, et al. (1995) Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. Nature. 373(6516):702-5.

**3.** Bladt F, et al. (1995) Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature. 376(6543):768-71.

**4.** Huh CG, et al. (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(13):4477-82.

**5.** Trusolino L, et al. (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 11(12):834-48.

**6.** Stevens RC, et al. (2013) The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. Nat Rev Drug Discov. 12(1):25-34.

**7.** Zou YR, et al. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature. 393(6685):595-9.

**8.** Tachibana K, et al. (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature.393(6685):591-4.

**9.** Doitsidou M, et al. (2002) Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. Cell. 111(5):647-59.

**10.** Rossi D, Zlotnik A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol.18:217-42.

**11.** Chatterjee S, et al. (2014) The intricate role of CXCR4 in cancer. Adv Cancer Res. 124:31-82.

**12.** Hartmann TN, et al. (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. Oncogene. 24(27):4462-71.

**13.** Burns JM, et al. (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 203:2201–2213.

**14.** Infantino, S, et al. (2006) Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. The Journal of Immunology 15, 2197-207.

**15.** Yamada K, et al. (2015) CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. Int J Cancer 137(12):2825-36.

**16.** Miao Z, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. Proc Natl Acad Sci USA2007; **104**:15735–40.

**17.** Luker KE, et al. (2012) Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. Oncogene. 31(45):4750-8.

**18.** Lukasiewicz E, et al. (2009) Inhibition of rhabdomyosarcoma's metastatic behavior through downregulation of MET receptor signaling. Folia Histochem Cytobiol. 47(3):485-9.

**19.** Taulli R, et al. (2006) Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Res. 66(9):4742-9.

**20.** Davis RJ, Barr FG. (1997) Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. Proc Natl Acad Sci USA. 94(15):8047-51.

**21.** Buckingham M, et al. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J Anat. 202(1):59-68.

**22.** Keller C, et al. (2004) Pax3: Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. Genes Dev. 18(21):2608-13.

**23.** Charytonowicz E, et al. (2009) Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell? Cancer Lett 279: 126–136.

**24.** Hettmer S, Wagers AJ. (2010) Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. Nat Med. 16(2):171-3.

**25.** Jankowski K, et al. (2003) Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. Cancer Res. 63(22):7926-35.

**26.** Corso S, et al. (2008) Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. Oncogene. 27(5):684-93.

**27.** Skrzypek K, et al. (2015) Constitutive activation of MET signaling impairs myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma and promotes its development and progression. Oncotarget. 6(31):31378-98.

**28.** Anastasi S, et al. (1997) A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. J Cell Biol. 137(5):1057-68.

**29.** Taulli R, et al. (2009) The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. J Clin Invest.119(8):2366-78.

**30.** Ciesla M, et al. (2016) Heme Oxygenase-1 Controls an HDAC4-miR-206 Pathway of Oxidative Stress in Rhabdomyosarcoma. Cancer Res. 76(19):5707-5718.

**31.** Bielska-Lasota M, et al. (2004) Survival of cervical cancer patients in selected regions of Poland in 1990-1996, in relation to some prognostic factors. Przegl Epidemiol. 58(3):523-36.

**32.** Haynes J, et al. (2011) Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. Mol Biol Cell. 22:4750–4764.

**33.** Lee M, et al. (2008) Epithelial mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. Clin Cancer Res. 14:4743–4750.

**34.** Cano A, et al. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol. 2(2):76-83.

**35.** Perez-Moreno MA, et al. (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. J Biol Chem. 276(29):27424-31.

**36.** Bolós V, et al. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. J Cell Sci.116:499-511.

**37.** Witta SE, et al. (2006) Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epi- dermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. Cancer Res. 66:944–950.

**38.** Muller A, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 2001; 410: 50–6.

**39.** Kucia M, et al. (2004) CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. J Mol Histol. 35(3):233-45.

**40.** Libura J, et al. (2002) CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. Blood. 100(7):2597-606.

**41.** Diomedi-Camassei F, et al. (2008) Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma. Clin Cancer Res. 14(13):4119-27.

**42.** Majka M, et al. (2006) SDF-1 alone and in co-operation with HGF regulates biology of human cervical carcinoma cells. Folia Histochem Cytobiol. 44(3):155-64.

**43.** Beaver CM, Ahmed A, Masters JR. (2014) Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. PLoS One. 9(2):e89834.

**44.** Miki J, et al. (2007) Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. Cancer Res. 67(7):3153-61.

**45.** Sierro F, et al. (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci USA. 104(37):14759-14764.

**46.** Zhang W, Liu HT. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 12(1):9-18.

**47.** Song G, et al. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 9(1):59-71.

**48.** Rajagopal S, et al. (2010) Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(2):628-32.

**49.** Matteucci E, et al. (2007) c-Src/histone deacetylase 3 interaction is crucial for hepatocyte growth factor dependent decrease of CXCR4 expression in highly invasive breast tumor cells. Mol Cancer Res. 5: 833–845.

**50.** Weinstein IB, Joe AK. (2006) Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. Nat Clin Pract Oncol. 3(8):448-57.

**51.** Comoglio PM, et al. (2008) Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. Nat Rev Drug Discov. 7(6):504-16.

**52.** Lesko E, et al. (2007) HSP90 antagonist, geldanamycin, inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro and seeding into bone marrow in vivo. Anticancer Drugs. 18(10):1173-81.

**53.** Lukasiewicz E, et al. (2009) High anti tumor activity against rhabdomyosarcoma cells and low normal cells cytotoxicity of heat shock protein 90 inhibitors, with special emphasis on 17-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-aminno-17-demethoxygeldanamycin. J Physiol Pharmacol. 60(3):161-6.

**54.** Miyata Y. (2005) Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. Curr Pharm Des. 11(9):1131-8.

**55.** Goetz MP, et al. (2003) The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. Ann Oncol. 14(8):1169-76.

**56.** Mizgalska D, et al. (2009) Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1beta mRNA. FEBS J. 276 (24):7386-99.

**57.** Skalniak L, et al. (2009) Regulatory feedback loop between NF-kappaB and MCP-1-induced protein 1 RNase. FEBS J. 276(20):5892-905.

**58.** Lipert B, et al. (2014) Monocyte chemoattractant protein-induced protein 1 impairs adipogenesis in 3T3-L1 cells. Biochim Biophys Acta. 1843 (4): 780-8.

**59.** Johansson J, et al. (2013) MiR-155-mediated loss of C/EBPβ shifts the TGF-β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. Oncogene. 12; 32 (50): 5614-24.

Kraków, 20.07.2017

dr Katarzyna Miękus