Radosław Januchowski
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: Radosław Januchowski

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

- **Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu**
  - ✓ *Studia doktoranckie z zakresu biologii medycznej*
  - ✓ *Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ekspresja genów wybranych białek uczestniczących w przenoszeniu sygnału wewnątrzkomórkowego w limfocytach T CD4+ w przebiegu tocznia rumieniowatego układowego".*
  - ✓ *Stopień doktora nauk biologicznych, specjalność biologia medyczna nadany 23 listopada 2006 roku*

- **Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**
  - ✓ *Studia magisterskie z Biotechnologii*
  - ✓ *Tytuł pracy magisterskiej: „Porównanie indorubiny i betanaftoflawonu jako induktorów zależnych od receptora Ah aktywności enzymatycznych"*
  - ✓ *Tytuł magistra uzyskany 12 lipca 2002 roku*

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

- 2009 – obecnie. Katedra i Zakład Histologii i Embriologii; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na stanowisku: asystent
- 2007 – 2008. Uniwersytet Harvarda w Bostonie. Staż podoktorski, w zakresie biologii molekularnej, biologii komórki i immunologii.
- 2002-2006. Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (obecna nazwa uczelni: Uniwersytet Medyczny). Studium doktoranckie.

4. Osiągnięcie naukowe i jego omówienie

a. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Określenie roli nowotworowych komórek macierzystych oraz ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika

Na podstawie cyklu pięciu prac:

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

Publikacja nr 1
Radosław Januchowski, Karolina Wojtowicz, Maciej Zabel (2013). *The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance*. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 67(7):669-680.
Wskaźnik Impact Factor ISI: 2,108
Punktacja MNiSW: 25

Publikacja nr 2
Radosław Januchowski, Karolina Wojtowicz, Karolina Sterzyńska, Patrycja Sosińska, Małgorzata Andrzejewska, Piotr Zawierucha, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2016). *Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 78:248-259.
Wskaźnik Impact Factor ISI: 3,905
Punktacja MNiSW: 35

Publikacja nr 3
Radosław Januchowski, Piotr Zawierucha, Marcin Ruciński, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2014). *Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line*. **BioMed Research International** art. ID 365867:1-9.
Wskaźnik Impact Factor ISI: 1,579
Punktacja MNiSW: 15

Publikacja nr 4
Radosław Januchowski, Piotr Zawierucha, Marcin Ruciński, Maciej Zabel (2014). *Microarray-based detection and expression analysis of extracellular matrix proteins in drug-resistant ovarian cancer cell lines*. **Oncology Reports** 32(5):1981-1990.
Wskaźnik Impact Factor ISI: 2,301
Punktacja MNiSW: 20

Publikacja nr 5
Radosław Januchowski, Monika Świerczewska, Karolina Sterzyńska, Karolina Wojtowicz, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2016). *Increased expression of several collagen genes is associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines*. **Journal of Cancer** 7(10):1295-1310.
Wskaźnik Impact Factor ISI: 3,609
Punktacja MNiSW: 30

Sumaryczny Impact Factor według Journal Citation Reports: 13,502

Sumaryczna punktacja MNiSW: 125

Liczba cytowań: 61

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

1. Wprowadzenie

Po rozpoczęciu pracy w Katedrze Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w roku 2009 po raz pierwszy zetknąłem się szerzej z problemem oporności na chemioterapię. Temat ten, bardzo mnie zainspirował i postanowiłem rozpocząć nad nim badania. Jako model do badań wybrałem rak jajnika, nowotwór w którym do rozwoju oporności na chemioterapię dochodzi najczęściej w trakcie leczenia.

Rak jajnika jest najbardziej śmiertelnym nowotworem ginekologicznym i zajmuje piąte miejsce pod względem zgonów z powodu nowotworów wśród kobiet [1]. W roku 2010 w Polsce odnotowano 3587 nowych przypadków raka jajnika, a 2547 kobiet zmarło z powodu tego nowotworu. Najwięcej przypadków raka jajnika diagnozowanych jest u pacjentek w wieku 65-75 lat. Wysoka śmiertelność z powodu tego nowotworu związana jest późnym rozpoznaniem oraz rozwojem oporności na chemioterapię w trakcie leczenia. Większość pacjentek diagnozowana jest w zaawansowanym stadium klinicznym – III lub IV stopniu zaawansowania klinicznego według klasyfikacji FIGO.W raku jajnika możemy wyróżnić różne typy histologiczne. Wśród nich najczęściej występujące to: surowiczy, śluzowy i endometrialny.

Niezależnie od stopnia zaawansowania klinicznego zabieg chirurgiczny oraz chemioterapia są podstawowym standardem leczenia w raku jajnika [2]. Jedynie dla pacjentek z dobrze zróżnicowanym guzem (G1) w stadium choroby IA i IB chemioterapia nie jest zalecana. U pozostałych pacjentek w pierwszej linii chemioterapii stosuje się 6 cykli **cisplatyny (Cis)** lub karboplatyny w połączeniu z **paklitakselem (Pac)**. Niestety u około 80% pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika pomimo początkowo dobrej odpowiedzi na leczenie następuje nawrót choroby i wymagają one dalszego leczenia. Zależnie od czasu w jakim następuje nawrót choroby pacjentki dzielone są na następujące grupy: wrażliwe na platynę – nawrót choroby po więcej niż 12 miesiącach (54,9%), częściowo wrażliwe na platynę – nawrót choroby 6-12 miesięcy po zakończeniu leczenia (22,7%), oporne na platynę – nawrót choroby w ciągu 6

miesięcy po leczeniu (17,2%) oraz nie wrażliwe na platynę –brak remisji lub progresja w trakcie leczenia (5,3%). Grupa wrażliwa dzielona jest dalej na pacjentki prawdopodobnie wyleczone (120 miesięcy bez wznowy – 17,7%), wrażliwe z progresją 60-120 miesięcy po leczeniu (3,7%) oraz wrażliwe z progresją 12-60 miesięcy po leczeniu – 33,5%.

W zależności od grupy, w drugiej linii chemioterapii najczęściej stosuje się taksany, **Cis, topotekan (Top)** lub **doksorubicynę (Dox)** liposomalną. Dla większości leków odpowiedź na drugą linie chemioterapii wynosi od 15 do 35 %.

Oporność na chemioterapię jest zjawiskiem, o którym z jednej strony wiemy bardzo dużo, bo znamy wiele białek i mechanizmów w nim uczestniczących. Z drugiej strony, gdy patrzymy na skuteczność wykorzystania tej wiedzy w praktyce nasza wiedza wydaje się być bardzo ograniczona, bo nadal większość pacjentów z nowotworami po dłuższym lub krótszym czasie leczenia umiera. Czasem nawet w badaniach na liniach komórkowych, w których znamy profil ekspresji genów oporności, odpowiedź na podany lek bywa inna od oczekiwanej. Oznacza to, że wciąż jeszcze nie poznaliśmy wszystkich genów i wszystkich mechanizmów odpowiedzialnych za oporność na leki cytotoksyczne.

Mechanizmy oporności na leki cytotoksyczne możemy podzielić na dwie główne grupy: komórkowe – specyficzne dla komórek nowotworowych, oraz **tkankowe** – związane z tkanką nowotworową. Komórkowe mechanizmy oporności na cytostatyki związane są głównie ze zwiększoną ekspresją transporterów błonowych z rodziny ABC, które dzięki energii uzyskanej z hydrolizy ATP, aktywnie usuwają leki z komórek [3]. Do najważniejszych z nich należą glikoproteina P (P-gp) kodowana przez gen *MDR1* (*ABCB1*) [4] oraz BCRP (ang. breast cancer resistant protein) kodowany przez gen *ABCG2* [5]. Białka ABC charakteryzują się niską specyficznością substratową i odpowiedzialne są za oporność wielolekową komórek nowotworowych (ang. multi drug resistance – MDR). Białko P-gp potrafi usunąć z komórek nowotworowych około 20 leków cytotoksycznych [6]. Wśród innych mechanizmów komórkowych należy wymienić mechanizmy związane z aktywacją systemów naprawy DNA uszkodzonego przez cytostatyki, wiązaniem cytostatyków z glutationem lub metalotioneinami, zwiększeniem aktywności enzymów detoksyfikacyjnych, czy też zmiany sekwencji aminokwasów w białkach docelowych. Wszystkie te mechanizmy są dobrze zbadane, szczególnie in vitro w klasycznym modelu linia wrażliwa-linia oporna. Znacznie mniej wiadomo na temat tkankowych mechanizmów oporności na chemioterapię. Mechanizmy te są bardzo istotne w warunkach in vivo [7, 8]. Są one związane z budową anatomiczną i histologiczną guza. Nie poprawnie rozwinięte ukrwienie jest znacznie mniej wydajne i ogranicza dostarczenie leków do komórek guza [9, 10]. Przerost masy guza prowadzi do

zasklepienia naczyń krwionośnych oraz dużej gęstości komórek, w wyniku czego dostarczenie leków, szczególnie do komórek znajdujących się daleko od naczyń jest znacznie ograniczone [11]. Do mechanizmów tkankowych zalicza się również zmiany w ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki raka pomimo, że są komórkami pochodzenia nabłonkowego produkują znaczne ilości białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Extracleullar Matrix – ECM), w tym kolagenów [12]. Rola składników macierzy zewnątrzkomórkowej w oporności na chemioterapię może polegać na: 1. blokowaniu dostępu leków cytotoksycznych do komórek nowotworowych poprzez ograniczenie ich dyfuzji – bariera fizyczna[13]; 2. oddziaływaniu z receptorami komórkowymi (najczęściej integrynami) i aktywowaniu ścieżek sygnalizacyjnych prowadzących do zwiększenia oporności na apoptozę indukowaną przez cytostatyki. Mechanizm ten określany jest jako oporność na leki indukowana adhezją komórek (ang. cell adhesion mediated drug resistance – CAM-DR) [7].

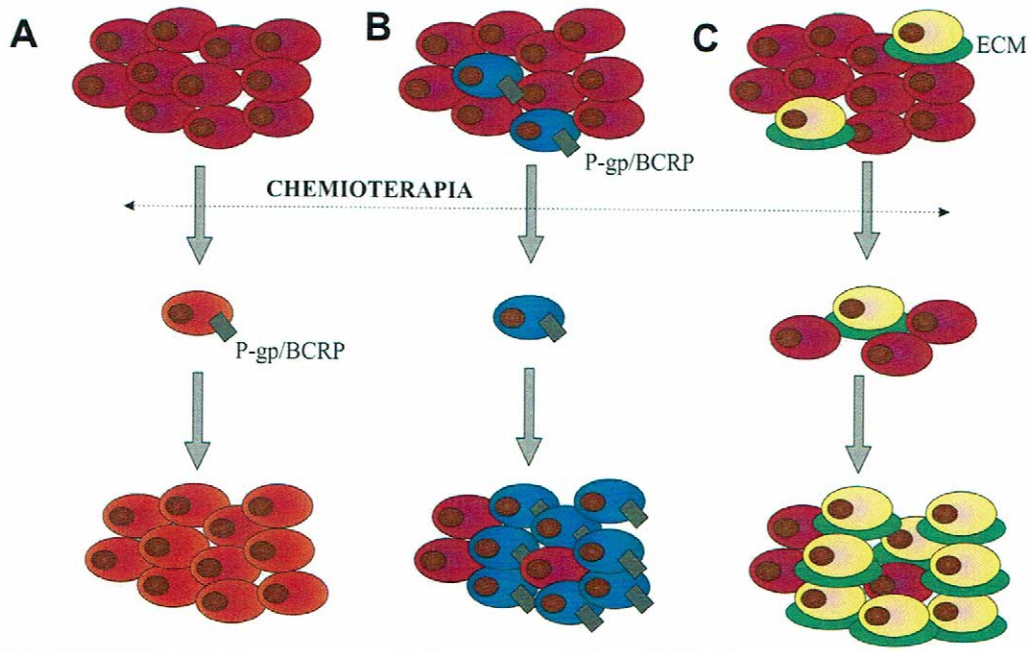
Modele rozwoju oporności na chemioterapię w nowotworach

Klasyczny model ewolucji klonalnej zakłada, że wszystkie komórki w guzie mają jednakową szansę uodpornienia się na chemioterapię w wyniku mutacji. Po ekspozycji na leki cytotoksyczne przeżywają tylko komórki oporne i to one proliferujące i odtwarzają masę guza (Ryc.1A) [14].

Model nowotworowych komórek macierzystych (ang. Cancer stem cells –CSCs), zakłada, że tylko niewielka populacja komórek w guzie jest w stanie napędzać wzrost i przerzutowanie guza. Natomiast większość komórek obecnych w guzie ma ograniczony potencjał proliferacyjny [15]. Charakterystyczną cechą CSCs jest wrodzona oporność na chemioterapię z powodu wysokiej ekspresji białek P-gp i BCRP oraz obecności innych mechanizmów oporności[16, 17]. Po ekspozycji na leki cytotoksyczne, tylko te komórki przeżywają. Odbudowują one następnie masę guza jednocześnie ulegając zróżnicowaniu. Zawartość CSCs w guzie po chemioterapii wzrasta. Wiąże się to ze zwiększoną opornością wznów i przerzutów na chemioterapię (Ryc. 1B) [15].

Istnieje jednak jeszcze jeden mało znany model rozwoju oporności na chemioterapię. Podobnie jak model CSCs zakłada on, że na początku leczenia tylko nieliczny procent komórek w guzie jest odporny na chemioterapię. W modelu tym komórkami odpornymi na leczenie są komórki z wysoką ekspresją składników ECM. Składniki ECM poprzez kontakt z receptorami powierzchniowymi indukują w komórkach aktywację ścieżek sygnalizacyjnych prowadzących do oporności na apoptozę (CAM-DR). Komórki z wysoką ekspresją ECM przeżywają chemioterapię i następnie odtwarzają masę guza. Po ustaniu chemioterapii zawartość takich

komórek w guzie wzrasta. Dzięki wysokiej ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej mogą one jednocześnie indukować oporność w komórkach sąsiednich. Dodatkowo wysoka zawartość składników macierzy stanowi barierę dla dyfuzji leków cytotoksycznych (Ryc. 1C) [8].



Ryc. 1. Modele rozwoju oporności na chemioterapię. **A**. W klasycznym modelu ewolucji klonalnej po ekspozycji na chemioterapię większość komórek guza ginie. Jednak część komórek w wyniku mutacji uodparnia się. Komórki te odbudowują następnie masę guza, który staje się oporny na dalsze leczenie **B**. W modelu nowotworowych komórek macierzystych, pierwotnie oporna na chemioterapię jest mała populacja CSCs. Komórki te charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji transporterów ABC i obecnością innych mechanizmów obronnych. Tylko te komórki przeżywają chemioterapię. Następnie odbudowują one masę guza, a cześć z nich ulega różnicowaniu do innych komórek. **C**. Model oporności oparty o ekspresję białek ECM zakłada, że komórkami pierwotnie opornymi na chemioterapię są komórki z wysokim poziomem ekspresji składników ECM. Po ekspozycji na chemioterapię przeżywają komórki z ekspresję ECM, oraz komórki sąsiednie w których oporność może być indukowana przez składniki ECM w wyniku CAM-DR. Po chemioterapii zawartość komórek z ekspresją ECM w guzie wzrasta.

Model zastosowany w badaniach.

Po rozpoczęciu pracy nad problemem oporności postanowiłem stworzyć własne modele rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika. Wybrałem trzy linie raka jajnika wrażliwe na cytostatyki stosowane w tym nowotworze: W1, A2780 oraz SKOV-3. Następnie linie te hodowałem przy wzrastających stężeniach leków cytotoksycznych. Z linii W1 wyprowadziłem sześć linii komórkowych opornych na cytostatyki stosowane w leczeniu tego nowotworu: cytostatyki z pierwszej linii chemioterapii – cisplatynę (Cis) (W1CR) oraz paklitaksel (Pac) (W1PR1, W1PR2); cytostatyki stosowane w drugiej linii chemioterapii – topotekan (Top) (W1TR) oraz doksorubicynę (Dox) (W1DR). Dodatkowo wyprowadziłem linie oporne na vinkrystynę (Vin) (W1VR) i metotreksat (Mtx) (W1MR). Z linii A2780 wyprowadziłem po dwie bliźniacze linie oporne na Cis (A2780CR1, A2780CR2), Pac (A2780PR1, A2780PR2), Top (A2780TR1, A2780TR2) oraz Dox (A2780DR1, A2780DR2). Z linii SKOV-3

wyprowadziłem po dwie linie oporne na Cis (SKOV-3CR1, SKOV-3CR2) oraz Top (SKOV-3TR1, SKOV-3TR2). Pomimo kilku prób nie udało się uodpornić linii SKOV-3 na Pac i Dox.

Zapoznając się z problemem oporności na cytostatyki w raku jajnika początkowo skupiłem się na klasycznych mechanizmach oporności opartych na białkach ABC i krzyżowej oporności na cytostatyki stosowane w leczeniu tego nowotworu. Wynikiem tych prac jest pięć publikacji niewchodzących do cyklu. Następnie z wykorzystaniem mikromacierzy RNA (Affimetrix) zbadaliśmy ekspresję całego transkryptomu w liniach opornych na cytostatyki, pochodnych linii A2780 i W1. Moją uwagę zwróciły wysoki poziom ekspresja dehydrogenazy aldehydowej 1A1 (ALDH1A1) – najbardziej uniwersalnego markera CSCs w kilku liniach opornych. Ponadto we wszystkich liniach opornych zaobserwowaliśmy zmiany w poziomie ekspresji bardzo wielu genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej (szczególnie kolageny). Od tej pory badania były prowadzone dwukierunkowo. Jednym kierunkiem była rola nowotworowych komórek macierzystych w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika oraz ich zastosowanie jako potencjalnego celu terapeutycznego. Temat ten jest nadal kontynuowany. Drugim kierunkiem badań była ekspresja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a w szczególności kolagenów w liniach opornych na leki cytotoksyczne. Temat ten jest również kontynuowany. Końcowym efektem jest połączenie obu kierunków badań w jednym modelu.

Nowotworowe komórki macierzyste, a oporność na chemioterapię w raku jajnika.

Przed omówieniem wyników badań należy zapoznać czytelnika z głównymi metodami badania i identyfikacji CSCs.

Zgodnie z modelem rozwoju oporności na chemioterapię opartym o teorię CSCs uważa się, że CSCs to komórki, które początkowo stanowią niewielki procent masy guza. Napędzają one jego wzrost i przerzutowanie [15]. Wykazują nieograniczony potencjał proliferacyjny, ulegają asymetrycznym podziałom, tworząc identyczną komórkę potomną oraz bardziej zróżnicowane komórki, które w wyniku podziałów tworzą większość masy guza [18]. CSCs cechują się również wysokim poziomem ekspresji białek ABC (P-gp i/lub BCRP), wysoką aktywnością mechanizmów naprawy DNA oraz innych mechanizmów obronnych i są odpowiedzialne za oporność na chemioterapię [16, 17]. Po chemioterapii ich zawartość w guzie wzrasta[15]. W warunkach in vitro wykazują one zdolność do tworzenia sferoidów w medium bez surowicy w warunkach nieadherentnych[19]. Po iniekcji do myszy z wyłączoną odpowiedzią immunologiczną znacznie wydajniej tworzą guzy niż inne komórki nowotworowe[20].

Jednym z głównych problemów w identyfikacji CSCs jest różnorodność stosowanych markerów w zależności od nowotworu. Badacze używają różnych markerów powierzchniowych by identyfikować CSCs w różnych nowotworach. Obecnie przyjętym i najbardziej uniwersalnym markerem CSCs pochodzących z różnych nowotworów jest wysoki poziom ekspresji dehydrogenazy aldehydowej ALDH1A1 (najczęściej) i/lub ALDH3A1 [21]. W tym miejscu należy wyjaśnić, że w zależności od stosowanej metody komórki z ekspresją ALDH1A1 są różnie oznaczane w literaturze. Przy badaniach na poziomie transkryptu i stosowaniu przeciwciał o wysokiej specyficzności rozpoznawana jest tylko izoformą ALDH1A1 [22]. Jeśli badacze stosują przeciwciała o niższej specyficzności (w starszych pracach) pojawia się oznaczenie ALDH1. Natomiast przy badaniu z zastosowaniem cytometrii przepływowej i barwnika fluorescencyjnego BODIPY aminoacetaldehyde (BAAA), znanego jako ALDEOFLUOR stosuje się oznaczenie komórki ALDH+ i ALDH- ponieważ BAAA jest substratem dla różnych izoform ALDH. Fluorescencyjny substrat jest wychwytywany przez żywe komórki w drodze dyfuzji. Następnie w cytoplazmie ulega konwersji przez ALDH do negatywnie naładowanego BODIPY aminoacetate (BAA-). Komórki z wysoką zawartością BAA- w cytoplazmie cechują się wysoką fluorescencją i mogą być badane i izolowana z zastosowaniem cytometru przepływowego lub sortera komórek [22].

Uważa się, że w warunkach in vitro CSCs powinny mieć następujące cechy. Wysoki poziom ekspresji dehydrogenazy aldehydowej ALDH1A1, wysoki poziom ekspresji P-gp i/lub BCRP, oraz zdolność do tworzenia sferoidów w medium bez surowicy w warunkach nieadherentnych [19].

Poza opisanymi wyżej istniej jeszcze kilka innych metod identyfikacji CSCs [19] jednak nie miały one zastosowania w moich badaniach.

2. Osiągnięcie naukowe

I. Rola CSCs w oporności raka jajnika na chemioterapię.

Publikacja nr 1

Radosław Januchowski, Karolina Wojtowicz, Maciej Zabel (2013). *The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance*. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 67(7):669-680.

W publikacji tej przeprowadzono bardzo głęboką analizę obecnego stanu wiedzy na temat roli CSCs w rozwoju oporności na chemioterapię. Szczególny nacisk położono na rolę dehydrogenazy aldehydowej ALDH, a zwłaszcza izoformy 1A1 (ALDH1A1) w biologii CSCs i roli komórek $ALDH^+$ w rozwoju oporności na chemioterapię w różnych nowotworach. Wskazano, że główną rolę we wrodzonej oporności CSCs na chemioterapię odgrywa ekspresja białek ABC. Zwrócono uwagę, że obecne podejścia terapeutyczne prowadzą do eliminacji większości komórek guza, jednak CSCs przeżywają chemioterapię. Dokonano więc przeglądu obecnych podejść terapeutycznych nakierowanych na CSCs, będących na różnych etapach rozwoju badań. Szczególną uwagę poświęcono roli kwasów retinowych w przełamywaniu oporności na leczenie chemiczne. Dokonano przeglądu prac zarówno najnowszych z okresu kiedy obecność CSCs jest powszechnie uznana, jak i tych starszych, w których stosowano kwasy retinowe do przełamywania oporności na chemioterapię, nie znając jeszcze teorii nowotworowych komórek macierzystych. Wspólnym mianownikiem wszystkich przeanalizowanych wyników było to, że zastosowanie kwasów retinowych, by było skuteczne, musi poprzedzić stosowanie leków cytotoksycznych. Omówiono również terapie nakierowane na metylotransferazy DNA i deacetylazy histonów jako wspomagające w leczeniu kwasami retinowymi. Następnie omówiono terapie nakierowane na ścieżki sygnalizacyjne nowotworowych komórek macierzystych, wskazując na zastosowanie wielu naturalnych związków i ich pochodnych. Taka kompleksowa analiza dała całościowe spojrzenie na rolę CSCs w nowotworach i ich potencjalnego zastosowania jako celu terapeutycznego. Jak się okazało publikacja taka była niezmiernie potrzebna bo praca ma 38 cytowań, ze średnią dziewięciu cytowań w ciągu roku.

Publikacja nr 2

Radosław Januchowski, Karolina Wojtowicz, Karolina Sterzyńska, Patrycja Sosińska, Małgorzata Andrzejewska, Piotr Zawierucha, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2016). *Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 78:248-259.

Po zapoznaniu się problemem CSCs w nowotworach swoje badania skupiłem na roli ekspresji ALDH1A1 w liniach komórkowych raka jajnika opornych na leki cytotoksyczne. Moją uwagę zwróciła rola komórek z wysokim poziomem ekspresji ALDH1A1, ponieważ komórki takie były identyfikowane w wielu nowotworach i ich obecność towarzyszyła wzrostowi oporności na chemioterapię. W roku 2009 Tanei i wsp. porównując ekspresję ALDH1 w tkankach raka piersi uzyskanych przed i po neoadiuwantowej chemioterapii składającej się epirubicyny i Pac,

zaobserwowali, że pacjentki ze słabą odpowiedzią na chemioterapię miały podwyższy poziom ekspresji ALDH1 w porównaniu do pacjentek, które odpowiedziały na leczenie. Co więcej, u pacjentek, które nie odpowiedziały na leczenie poziom ekspresji ALDH1 w guzie po leczeniu wzrastał [23]. Wskazywało to, że komórkami odpowiedzialnymi za oporność na chemioterapię mogą być komórki z wysokim poziomem ALDH1 i potwierdzało teorie CSCs w rozwoju oporności na leczenie chemiczne. W 2012 roku Croker i wsp. z linii komórkowych raka piersi MDA-MD-231 i MDA-MD-468 z zastosowaniem sortera komórkowego uzyskali populacje komórek ALDH+ i ALDH-. Komórki ALDH+ wykazywały znaczący wzrost oporności na Pac i Dox w stosunku do komórek ALDH- [24]. Obecność komórek ALDH+ była również obserwowana w raku jajnika, zarówno w tkankach jak i w liniach komórkowych [25, 26]. Wang i wsp. (2012) zaobserwowali, że pacjenci z zwiększoną zawartością komórek ALDH1 pozytywnych, cechowali się niższym całkowitym przeżyciem [25]. Zaobserwowano również, że ilość komórek ALDH1A1 pozytywnych izolowanych z tkanek raka jajnika korelowała negatywnie z okresem wolnym od wznowy [26]. Co więcej w liniach opornych na Cis i Pac zawartość komórek ALDH+ była wyższa w porównaniu z liniami wrażliwymi [25]. Wyniki tych badań wskazują, że zarówno w raku jajnika jak i innych nowotworach komórki ALDH+ mogą być odpowiedzialne z oporność na chemioterapie i progresję nowotworu. Jednak żadna z powyższych publikacji nie próbowała wyjaśnić mechanizmu jaki było podstawą oporności na leczenie.

Celem moich badań było określenie roli ekspresji ALDH1A1 w rozwoju oporności na chemioterapię w liniach komórkowych raka jajnika oraz określenie mechanizmów molekularnych jakie są odpowiedzialne za to zjawisko. Badania z zastosowaniem mikromacierzy RNA wskazywały, że w liniach komórkowych raka jajnika pochodnych linii W1 dochodzi do wzrostu ekspresji dehydrogenazy aldehydowej izoformy 1A1 (*ALDH1A1*). Jednocześnie wyniki wykluczyły zmiany w ekspresji innych lizoform tego enzymu. Wyniki te zostały zweryfikowane techniką Q-PCR. Najwyższy wzrost poziomu ekspresji zaobserwowaliśmy w liniach opornych na Pac i Top. W obu liniach ekspresja na poziomie białka została wykazana techniką western blot. **Wzrost ekspresji ALDH1A1 w linii opornej na Top jest pierwszą tego typu obserwacja na świecie.** W dalszej części badań skupiliśmy się więc na liniach opornych na Pac i Top. Wyniki z mikromacierzy wskazywały również na podwyższony poziom transkryptów dla genów *ABCB1* (*MDR1*) w linii opornej na Pac oraz *ABCG2* w linii opornej na Top, kodujących odpowiednio białka P-gp i BCRP. Wyniki te były zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami na poziomie białka [27]. Tak więc badane komórki posiadały kolejną cechę CSCs – wysoki poziom ekspresji białka P-gp i/lub BCRP [21].

Ekspresja białka P-gp w linii opornej na Pac oraz białka BCRP w linii opornej na Top nie była wielkim zaskoczeniem, ponieważ z literatury wiadomo, że są one związane z opornością na te cytostatyki [4, 5]. Zastosowanie techniki western blot pozwala na porównanie poziomu ekspresji białek pomiędzy liniami komórkowymi. Nie daje jednak informacji o różnicach wewnątrz populacji komórek. Dlatego następnym krokiem było zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej dla określenia ekspresji białek P-gp, BCRP oraz ALDH1A1 w badanych liniach komórkowych. Analiza fluorescencyjna wykazała jednorodną ekspresję białka P-gp w linii opornej na Pac oraz białka BCRP w linii opornej na Top. W linii opornej na Pac zaobserwowano również jednorodną ekspresję białka ALDH1A1. Natomiast w linii opornej na Top ekspresję ALDH1A1 zaobserwowano tylko w małej populacji (około 10%) komórek. Wyniki te zostały następnie potwierdzone z zastosowaniem cytometrii przepływowej i barwnika ALDEOFLUOR. Wskazują one, że komórkami odpowiedzialnymi za rozwój oporności na chemioterapię są komórki z wysokim poziomem ekspresji ALDH1A1. Pozostaje jednak pytanie dlaczego w przypadku linii opornej na Pac prawie wszystkie komórki wykazują ekspresje ALDH1A1, a w przypadku linii opornej na Top tylko nieliczne, chociaż w obu przypadkach wszystkie komórki wykazują wysoką ekspresję białek ABC. Podobne wyniki uzyskał Laden [26] badając linie komórkowe raka jajnika oporne na Cis i Pac. Tylko niewielki procent komórek opornych na Cis wykazywał ekspresję ALDH1A1 w porównaniu do ponad 50% komórek w linii opornej na Pac. Zależności pomiędzy opornością na różne leki cytotoksyczne, a ilością komórek z ekspresją ALDH1A1 jest zagadnieniem, który wymaga dalszych badań.

Jedną z charakterystycznych cech CSCs jest zdolność do tworzenia sferoidów w medium bez surowicy w warunkach nieadherentnych [19]. Przeprowadzone testy wykazały, że linie z ekspresją ALDH1A1, zarówno linia oporna na Pac jak i Top były zdolne do tworzenia sferoidów w takich warunkach. Dla porównania wyjściowa linii W1 wrażliwa na leki cytotoksyczne takich właściwości nie posiadała. Wyniki takie są zgodne z wynikami uzyskiwanymi w innych nowotworach w tym w raku jajnika. Wang i wsp. zaobserwowali, że linie raka jajnika z obecnością populacji ALDH+ znacznie wydajniej tworzą sferoidy, niż linie posiadające tylko populację ALDH- [25]. Również izolowane z tkanki raka jajnika komórki ALDH+ wykazują znacznie wyższy potencjał do tworzenia sferoidów, niż komórki ALDH- [28].

Podsumowując zarówno linia oporna na Pac jak i Top posiadały cechy CSCs. Dlatego też celem drugiej części pracy było zastosowanie terapii nakierowanej na CSCs w celu przełamania oporności na chemioterapię.

Zakładając, że to właśnie CSCs odgrywają główną rolę w oporności na chemioterapię w nowotworach, kluczowe dla zwiększenia skuteczności chemioterapii jest przełamanie oporności w tych komórkach. Istnieje wiele strategii przełamywania oporności na chemioterapię w komórkach o cechach CSCs. Do najważniejszych należą blokowanie ścieżek sygnalizacyjnych CSCs z zastosowaniem naturalnych inhibitorów lub ich półsyntetycznych pochodnych. Druga strategia polega na blokowaniu ekspresji lub aktywności ALDH1A1, najbardziej uniwersalnego markera CSCs. Ponieważ w badanych liniach opornych obserwowaliśmy wysoką nadekspresję ALDH1A1, w naszych badaniach zastosowaliśmy właśnie to podejście.

Fizjologiczna rola ALDH1A1 polega na udziale w metabolizmie retinolu (witaminy A). Po dotarciu do komórki retinol ulega oksydacji do retinaldehydu przez dehydrogenazę alkoholową (ADH). Następnie retinaldehyd ulega metabolizmowi do kwasu retinowego (RA) przez ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2 i ALDH1A3). RA jest rozkładany przez CYP26A1 [29]. Retinol i jego pochodne: kwas całkowicie trans retinowy (ang. all-trans retinoid acid (ATRA)), kwas 9-cisRA i kwas 13-cisRA ogrywają istotną rolę w różnicowaniu, wzroście i apoptozie komórek [30].

Skoro komórki z podwyższoną ekspresją ALDH1A1 wykazują zwiększoną oporność na chemioterapię badacze postanowili sprawdzić, czy wyłączenie ekspresji ALDH1A1 zwiększy ich wrażliwość na działanie leków cytotoksycznych. Pierwsze badania przeprowadził Moreb i wsp. w roku 2000 [31]. Z zastosowaniem siRNA wyciszył ekspresje ALDH1A1 w liniach komórkowych raka płuc i białaczki uzyskując wzrost wrażliwości na aktywny metabolit cyklofosfimidu – 4-hydroperoksycyklofosfimid. Podobne wyniku uzyskał Laden i wsp. w roku 2010. Wyciszenie ekspresji ALDH1A1 z zastosowaniem siRNA w liniach raka jajnika opornych na Cis i Pac uwrażliwiło te komórki na chemioterapię [26]. O ile wzrost wrażliwości na cyklofosfamid nie był zaskoczeniem, bo ALDH1A1 bierze udział w jego metabolizmie, o tyle wzrost wrażliwości na Cis i Pac tak, ponieważ ALDH1A1 nie bierze udziału w metabolizmie tych leków.

Wyniki tych badań dowiodły, że ALDH1A1 może być celem terapeutycznym w terapii nowotworów opornych na chemioterapię. Jak dotychczas siRNA nie jest jednak stosowany w leczeniu pacjentów, dlatego też w naszej pracy postanowiliśmy zastosować podejście, które może mieć w przyszłości zastosowanie terapeutyczne w leczeniu raka jajnika. Od wielu lat wiadomo, że ATRA jest skutecznie stosowany w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej. ATRA powoduje różnicowanie promielocytów do dojrzałych neutrofili wrażliwych na chemioterapię, a podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATRA w wyniku jego

dostarczenia z zewnątrz prowadzi do obniżenie ekspresji ALDH1A1 [32]. Dlatego też w naszym podejściu postanowiliśmy zastosowywać związki, które obniżają ekspresję lub aktywność ALDH1A1: ATRA oraz DEAB (dimetyloaminobenzaldehyd).

Wyniki naszych badań wykazały, że zarówno ATRA jak i DEAB prowadzą do uwrażliwienia komórek raka jajnika na chemioterapię opartą na Pac lub Top. Wyniki te były zgodne z wynikami Moreb i wsp., którzy wykazali, że obniżenie ekspresji ALDH1A1 z zastosowaniem ATRA prowadzi do ich uwrażliwienia na CP [33]. Podobne wyniki uzyskali Croker i wsp. w liniach komórkowych raka piersi, wykazując, że zastosowanie ATRA lub DEAB prowadzi do uwrażliwienia na Pac lub epirubicynę komórek linii raka piersi z wysokim poziomem ekspresji ALDH [24]. Nasze wyniki wskazywały więc, że oba związki mają potencjalne zastosowanie w przełamywaniu oporności na chemoterapię w raku jajnika. Kolejną kwestią do rozwiązania było to jaki jest mechanizm ich działania. Z literatury wiadomo, że ATRA obniża poziom transkryptu dla ALDH1A1 [34]. Nasze badania nie wykazały jednak zmian w poziomie transkryptu ALDH1A1 po inkubacji z ATRA. Zaobserwowaliśmy natomiast znaczne zależne od czasu inkubacji obniżenie ilości białka ALDH1A1. Uzyskany wynik był zgodny z wynikami innych badaczy, którzy w linii raka płuc A549 również zaobserwowali zależne od czasu obniżenie ilości białka, ale nie transkryptu ALDH1A1[33]. Obniżenie ilości ALDH1A1 nie wyjaśnia wzrostu wrażliwości na Pac lub Top ponieważ oba leki nie są substratami dla tego enzymu. Ponieważ oporność na Pac i Top jest związana z ekspresją białek P-gp i BCRP sprawdziliśmy wpływ ATRA na ich ekspresję. Nie zaobserwowaliśmy zmiany w poziomie transkryptu dla genów kodujących te białka. Natomiast podobnie jak dla ALDH1A1 zaobserwowaliśmy zależne od czasu obniżenie poziomu ekspresji białek P-gp i BCRP. **Według mojej wiedzy, regulacja ekspresji P-gp i BCRP przez ATRA na poziomie białka jest pierwszą tego typu obserwacją na świecie.**

Drugim z zastosowanych związków był DEAB inhibitor aktywności enzymatycznej ALDH1A1 (ALDH). Nasze badania wykazały, że zablokowanie aktywności ALDH1A1 prowadzi do wzrostu wrażliwości linii opornych na stosowane cytostatyki. Wynik taki jest zgodny z podobnymi badaniami przeprowadzonymi na liniach komórkowych raka piersi [24]. Jednak w tamtych badaniach nie udało się wyjaśnić mechanizmu odpowiedzialnego za wzrost wrażliwości na chemioterapię. My poszliśmy o krok dalej. Wykazaliśmy, że za wzrost oporności na Pac i Top odpowiada znaczące obniżenie ekspresji białek, odpowiednio P-gp i BCRP. O ile ekspresja BCRP była regulowana przez obniżenie transkrypcji, o tyle ekspresja P-gp była regulowana na poziomie białka, a poziom transkryptu pozostawał niezmienny w czasie. **Taki sposób regulacji ekspresji P-gp i BCRP nie był dotąd obserwowany.**

Podsumowując nasze badania po raz pierwszy wykazały, że zastosowanie inhibitorów ekspresji lub aktywności białka ALDH1A1 prowadzi do wzrostu wrażliwości na chemioterapię komórek raka jajnika o fenotypie CSCs i ma potencjalne zastosowanie terapeutyczne w leczeniu tego nowotworu.

II. Znaczenie ekspresji składników macierzy zewnątrzkomórkowej w oporności raka jajnika na leki cytotoksyczne.

Drugim kierunkiem prowadzanych badań była rola ekspresji białek ECM w oporności komórek nowotworowych na chemioterapię. Jak wspomniano wyżej komórki nowotworowe, pomimo, że są komórkami pochodzenia nabłonkowego produkują znaczne ilości substancji zewnątrzkomórkowej. Uważa się, że ekspresja białek ECM odgrywa znaczącą rolę w oporności komórek nowotworowych na chemioterapie zarówno in vivo jak i in vitro. W licznych badaniach zaobserwowano, że komórki nowotworowe rosnące jako trójwymiarowe sferoidy są najczęściej bardziej oporne na chemioterapię niż te same komórki rosnące jako pojedyncza warstwa komórek. Po raz pierwszy zjawisko to zostało zaobserwowane przez Sutherland i wsp. w 1979 roku w liniach raka piersi EMT-6 [35]. W latach 90 XX wieku zaobserwowano, że komórki nowotworowe mogą być odporne na chemioterapię in vivo, ale nie in vitro. Po wszczepieniu myszom komórek raka piersi EMT-6, powstałe guzy uodparniano na chemioterapie podając myszom cytostatyki przez okres sześciu miesięcy. Pomimo, że guzy uodporniły się na działanie chemioterapii in vivo, po izolacji z guza komórki wykazywały taką samą wrażliwość na podawane cytostatyki jak komórki z guzów kontrolnych [36]. Wskazywało to na istnienie mechanizmów oporności specyficznych dla tkanek nowotworowych.

Jak wspomniano wyżej do mechanizmów oporności specyficznych dla tkanek nowotworowych zalicza się ekspresję białek ECM. Macierz zewnątrzkomórkowa składa się z substancji podstawowej i włókien. Substancja podstawowa składa się z proteglikanów takich jak syndekan czy lumikan, wieloadhezyjnych glikoprotein jak fibronektyna i laminina oraz glikozoaminoglikanów. Do włókien zalicza się włókna elastylowe i kolagenowe. Uważa się, że składniki ECM mogą zwiększać odporność nowotworów na leczenie chemiczne przynajmniej dwiema drogami.

1. Gęsta macierz zewnątrzkomórkowa może stanowić bardzo istotna barierę dla dostarczania leków do komórek nowotworowych [10-12]. Istotne jest również przestrzenne ułożenie włókien kolagenowych w tkance nowotworowej. Zaobserwowano, że guzy, w których trudniej dyfundują leki mają bardziej rozbudowana sieć włókien kolagenowych [37]. Zwiększoną ekspresję kolagenów zaobserwowano w tkance raka jajnika [38]. W przeciwieństwie do

zdrowej tkanki, w której kolagen jest zorganizowany w cienkie długie włókna równoległe do granicy nabłonka, włókna kolagenowe w tkance raka jajnika są krótsze i znacznie grubsze oraz prostopadłe do granicy nabłonka. W badaniach in vitro wykazano ograniczoną dyfuzję leków przez żele składające się z lamin i kolagenów [13, 39, 40]. Wyniki te wskazują, że ekspresja składników macierzy, a zwłaszcza kolagenów może stanowić istotny mechanizm oporności nowotworów na leczenie chemiczne.

2. Inna, może nawet bardziej istotna rola ECM w oporności nowotworów na cytostatyki polega na oddziaływaniu komórek nowotworowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (CAM-DR) [7, 8]. Jako przykład, można podać oporność komórek drobnokomórkowego raka płuc na Dox i melfalan, u której podstawy leży oddziaływanie integryny β1 obecnej na powierzchni komórek nowotworowych ze składnikami ECM [41]. Podobne zjawisko zaobserwowano również in vitro. Komórki ustalonej linii raka jajnika A2780 hodowane w naczyniach hodowlanych pokrytych kolagenem typu VI były znacznie bardziej odporne na Cis w porównaniu z kontrolą [42]. Oporność ta wynikała najprawdopodobniej z oddziaływania receptorów powierzchniowych z kolagenem i prowadziła do ekspresji genów zaangażowanych w oporność na apoptozę.

O ile rola ECM w oporności nowotworów na chemioterapię in vivo wydaje się być dobrze opisana, o tyle na temat ekspresji białek ECM w warunkach in vitro wiadomo bardzo niewiele. W bazie PubMed można znaleźć tylko kilka prac na ten temat w tym trzy będące przedmiotem przedstawianego osiągnięcia naukowego. Iseri i wsp. analizując ekspresje genów z zastosowaniem mikromacierzy w pochodnych linii raka piersi MCF-7 opornych na Dox, Pac, docetaksel (Doc) i Vin zaobserwowali zmiany w ekspresji genów kodujących kolageny, fibronektynę, syndekan i integryny oraz metaloproteinazy [43]. W linii raka jajnika A2780 obserwowano znaczący wzrost ekspresji COL6A3 w linii opornej na Cis [42]. Jednak analiza ta dotyczyła ekspresji jedynie około 60 genów w jednej linii opornej.

Zastosowane w moich badaniach modele są dużo bardziej rozbudowane. Sześć linii opornych na cytostatyki pochodnych linii W1 oraz osiem linii opornych na cytostatyki pochodnych linii A2780. W obu modelach dokonano kompleksowej analizy całego transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy RNA (Affimetrix). Następnie wyselekcjonowano geny kodujące składnymi ECM, których ekspresja była zmieniona w stosunku do linii wrażliwych. Efektem tych prac są dwie publikacje.

Publikacja nr 3.

Radosław Januchowski, Piotr Zawierucha, Marcin Ruciński, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2014). *Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line.* **BioMed Research International** art. ID 365867:1-9.

W pracy tej przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących składniki macierzy zewnątrzkomórkowej w liniach raka jajnika opornych na cytostatyki stosowane w pierwszej (Cis i Pac) oraz drugiej (Top i Dox) linii chemioterapii tego nowotworu. Analiza mikromacierzy RNA wykazała wzrost ekspresji 28 genów oraz spadek ekspresji 10 genów. Ekspresja dwóch genów była podwyższona lub obniżona w zależności od linii komórkowej. Z pośród genów z podwyższoną ekspresją 12 genów wykazywało znaczący wzrost ekspresji (ponad 20 razy w stosunku do kontroli): *COL1A2*, *COL12A1*, *COL21A1*, *LOX*, *TGFBI*, *LAMB1*, *EFEMP1*, *PPC3*, *SDC2*, *MGP*, *MMP3* oraz *TIMP3*. Ekspresja czterech genów ulegała znacznemu obniżeniu: *COL11A1*, *LAMA2*, *GPC6* oraz *LUM*. Największą zmiennością w stosunku do kontroli cechowały się obie linie oporne na Top oraz jedna z linii opornych na Pac. Najmniej zmian odnotowano w linii opornej na Dox. Zmiany w ekspresji tak wielu genów sugerują, że ich ekspresja może mieć związek z opornością na chemioterapię. Na uwagę zasługuje zmiana ekspresji sześciu genów kodujących kolageny w linii opornej na Pac oraz zmiana ekspresji genów *ITGB8*, *COL1A2*, *TGFBI*, *LAMA4*, *HAPLN1* i *MGP* w obu liniach opornych na Top, co sugeruje związek z opornością na ten lek. **Jest to pierwszy tego typu wynik na świecie.**
W sześciu z ośmiu linii opornych odnotowano zwiększoną ekspresję przynajmniej jednego genu kodującego kolageny. Wynik taki jest zgodny z wynikami uzyskanymi na liniach raka piersi MCF-7 opornych na cytostatyki [43] i potwierdza rolę ekspresji kolagenów w oporności na chemioterapię [12, 13, 39, 40]. Na uwagę zasługuje również zmiana ekspresji *TGFBI* (ang. TGF beta induced protein) w obu liniach opornych na Top i potwierdza to rolę tego genu w rozwoju oporności nowotworów [44]. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo wysoki poziom ekspresji genu *MGP* (ang. Matrix Gla Protein) kodującego białko będące składnikiem kości i chrząstki w obu liniach opornych na Top. Według mojej wiedzy ekspresja tego genu nie była nigdy wcześniej notowana w nowotworach lub w związku z lekoopornością.
Podsumowując zmiany ekspresji badanych genów sugerują ich związek z opornością na chemioterapię, jednak ich dokładna rola w tym procesie wymaga dalszych badań, które są obecnie prowadzone.
Druga analiza mikromacierzy dotyczyła zmiany ekspresji genów kodujących białka ECM w liniach opornych na cytostatyki pochodnych linii W1.

Publikacja 4.

Radosław Januchowski, Piotr Zawierucha, Marcin Ruciński, Maciej Zabel (2014). *Microarray-based detection and expression analysis of extracellular matrix proteins in drug-resistant ovarian cancer cell lines.* **Oncology Reports** 32(5):1981-1990.

Podobnie jak w poprzedniej pracy, przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących składniki ECM w liniach raka jajnika opornych na leki cytotoksyczne stosowane w pierwszej i drugiej linii chemioterapii raka jajnika oraz dodatkowo na Mtx i Vin. W badanych liniach odnotowaliśmy wzrost ekspresji 24 genów oraz spadek ekspresji 14 genów. Ekspresja trzech genów była podwyższona lub obniżona w zależności od linii komórkowej. Ekspresja 10 genów była znacząco podwyższona (ponad 10 razy): *ITGB1BP3*, *COL3A1*, *COL5A2*, *COL15A1*, *TGFBI*, *DCN*, *LUM*, *MATN2*, *POSTN* oraz *EGFL6*. Podobnie ekspresja siedmiu genów była znacząco obniżona: *ITGA1*, *COL1A2*, *MAMA2*, *GPC3*, *KRT23*, *VIT* oraz *HMCN1*. Liniami w których odnotowano najwięcej zmian w ekspresji genów były linie oporne na Top i Pac, podobnie jak w przypadku pochodnych linii A2780. Sugeruje to, że ekspresja składników ECM może mieć związek z opornością na oba cytostatyki. Z kolei najmniej zmian odnotowano w liniach opornych na Cis i Mtx. Duże podobieństwo zaobserwowano pomiędzy liniami opornymi na Pac i Top. W obu liniach odnotowano podwyższoną ekspresję sześciu identycznych genów, a wzrost ekspresji trzech z nich był bardzo znaczący (*COL3A1*, *DCN* oraz *MATN2*). Na szczególną uwagę zasługuje *COL3A1*, którego ekspresja w linii opornej na Top była ponad 500 razy wyższa niż w kontroli. Co więcej analiza mikromacierzy wykazała, że z pośród całego badanego transkryptomu, poziom ekspresji tego genu był najwyższy we wszystkich badanych liniach komórkowych. Sugeruje to, że może on odgrywać bardzo istotną rolę w oporności na Top. Na uwagę zasługuje również wzrost ekspresji lumikanu (*LUM*) w liniach opornych na Dox, Vin i Top, co potwierdza jego rolę w oporności na cytostatyki. Ekspresję LUM notowano w płaskonabłonkowym raku głowy i szyi opornym na Cis [45]. Uważa się również, że LUM jest markerem złej prognozy w raku okrężnicy [46]. Ekspresja proteoglikanu dekortyny (*DCN*) w liniach opornych na Pac i Top wydaje się mieć związek z wysokim poziomem ekspresji *COL3A1* w obu liniach ponieważ DCN oddziałuje z kolagenami typu I, II, III i IV [47]. Uważa się, że DCN odgrywa istotna role w progresji i przerzutowaniu raka i może być potencjalnym celem terapeutycznym [47]. W liniach opornych na Dox i Mtx obserwowano znaczący wzrost ekspresji *POSTN*, genu którego ekspresji jest związana z nabłonkowym rakiem jajnika [38]. Uważa się również, że wzrost ekspresji tego genu ma związek z opornością linii raka jelita na oksyplatyne i 5-fluorouracyl [48]. Podobnie jak w

liniach opornych na Top pochodnych linii A2780 również w linii opornej na Top pochodnej linii W1 zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji *TGFBI*. Sugeruje to, że ekspresja tego genu jest specyficzna dla oporności na Top. **Wynik taki nie był do tej pory notowany**.

Podsumowując obie analizy mikromacierzowe zaobserwowaliśmy zmiany w ekspresji ponad 70 genów kodujących składnik ECM. Ekspresja większości z nich nie była dotąd notowana w związku z opornością na cytostatyki lub nawet w badaniach dotyczących nowotworów. Nasze wyniki wskazują, że zmiana ich ekspresji może być związana z opornością na chemioterapię stosowaną w raku jajnika. Być może w przyszłości będą one stanowić cele molekularne w leczeniu tego nowotworu. Wskazuje to nowe kierunki badań nad opornością w tym nowotworze. Obecnie prowadzimy bardziej wnikliwą analizę wielu z wymienionych genów z zastosowaniem technik biologii molekularnej i komórkowej. Prowadzimy również badania IHC na tkankach raka jajnika.

Na szczególną uwagę zasługuje zmiana ekspresji wielu genów kodujących kolageny, dlatego też w pierwszej kolejności badania skupiliśmy na kolagenach. By badania były bardziej reprezentatywne dla raka jajnika oprócz wspomnianych wyżej linii opornych dodałem po dwie linie oporne na Cis i Top, pochodne linii SKOV-3. W sumie dokonaliśmy analizy ekspresji ośmiu genów kodujących kolageny w 18 liniach raka jajnika opornych na cytostatyki. Rezultatem prowadzonych badań jest publikacja:

Publikacja nr 5.

Radosław Januchowski, Monika Świerczewska, Karolina Sterzyńska, Karolina Wojtowicz, Michał Nowicki, Maciej Zabel (2016). *Increased expression of several collagen genes is associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines*. **Journal of Cancer** 7(10):1295-1310.

Przedmiotem badań była ekspresja genów kodujących kolageny w liniach komórkowych raka jajnika opornych na cytostatyki. **Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsza publikacja, która pokazuje ekspresję kolagenów w liniach komórkowych na poziomie białka.**

Na podstawie wzrostu ekspresji na poziomie transkryptu badane geny podzielano na trzy grupy: 1. geny, których poziom ekspresji wzrastał mniej niż 50 razy w stosunku do kontroli: *COL1A1*, *COL5A2*, *COL12A1* oraz *COL17A1*, 2. geny, których poziom ekspresji wzrastał ponad 50 razy w stosunku do kontroli: *COL1A2*, *COL15A1* oraz *COL21A1*, 3. geny z bardzo wysokim wzrostem ekspresji: *COL3A1*.

Ekspresję COL1A2, COL3A1, COL15A1 oraz COL21A1 potwierdziliśmy na poziomie białka.

Z pośród badanych kolagenów typ I i V są heterotrimerami, co oznacza, że w skład dojrzałego kolagenu wchodzą trzy łańcuchy. Dojrzały kolagen typu I składa się z dwóch łańcuchów alfa I i jednego łańcucha alfa II [49, 50]. Dojrzały kolagen typu V składa się z dwóch łańcuchów alfa I i jednego łańcucha alfa II lub jednego łańcucha alfa I, alfa II i alfa III [50]. W dwóch liniach opornych na TOP (W1TR i SKOV-3TR2) zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji *COL1A1* przy braku ekspresji *COL1A2*. Odwrotną sytuację zaobserwowaliśmy w pochodnych linii A2780 opornych na Top. W obu liniach zaobserwowano wzrost ekspresji *COL1A2* przy braku zmian w ekspresji *COL1A1*. Podobnie w liniach opornych na Top (W1TR) i Pac (W1PR2) zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji *COL5A2* przy niezmienionej ekspresji *COL5A1* i *COL3A1*. Odkrycie to rodzi pytanie jakie jest znaczenie wzrostu ekspresji tylko jednego łańcucha, który jest nie wystarczający do uformowania dojrzałego kolagenu. Potrójna helisa kolagenu formowana jest w retikulum, powstaje więc pytanie, czy powstały w liniach opornych kolagen może być wydzielany na zewnątrz komórek [50]. Jest również możliwe, że komórki nowotworowe tworzą nowy rodzaj kolagenu typu I i V zbudowany tylko z jednego rodzaju łańcucha. Ekspresja COL1A1 i COL1A2 była obserwowana w raku trzustki i korelowała pozytywnie z inwazyjnością, przerzutowością i stadium zaawansowania [51]. Podobnie ekspresja COL5A2 korelowała z rozwojem i progresja raka endometrium [52]. Z pośród wszystkich badanych kolagenów największym wzrostem ekspresji cechował się COL3A1. W liniach opornych na Top i Pac pochodnych linii W1 zaobserwowaliśmy odpowiednio 5000x i 15000x wzrost jego ekspresji na poziomie transkryptu. Wzrost ekspresji na poziomie białka została potwierdzona technika western blot. Następnie za pomocą immunofluorescencji wykazaliśmy, że w linii W1TR COL3A1 jest wydzielany na zewnątrz komórek i tworzy strukturę podobna do sieci pająka. **Obecność zewnątrzkomórkowego kolagenu w linii komórek nowotworowych hodowanej in vitro jest pierwszą tego typu obserwacją na świecie.** W tym miejscu należy nadmienić, że z pośród wszystkich genów zbadanych metodą mikromacierzy, we wszystkich użytych liniach komórkowych *COL3A1* cechował się największym wzrostem ekspresji. Tak wysoki wzrost ekspresji wymaga ogromnego nakładu energii przez komórkę. Sugeruje to, że ekspresja COL3A1 odgrywa istotną rolę w oporności na Top i Pac. Ekspresja COL3A1 była również obserwowana w raku piersi, gdzie korelowała z progresją [53] oraz w raku jajnika gdzie korelowała z opornością na Cis [54].

Dwa kolejne kolageny COL12A1 oraz COL21A1 należą do rodziny FACIT (ang. fibril associated collagens with interrupted triple helices) [50]. Zwiększoną ekspresję *COL12A1*obserwowaliśmy w pochodnych linii A2780 opornych na Cis i Dox. Ekspresja *COL12A1* była również obserwowana w pochodnych linii raka piersi MCF-7 opornych na Pac

i Dox [43]. W guzach litych ekspresja COL12A1 była obserwowana w raku okrężnicy i wydaje się być markerem tego nowotworu. Z kolei w linii A2780 opornej na Pac zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji COL21A1. Jest to pierwsza tego typu obserwacja ponieważ do tej pory nie obserwowano ekspresji tego kolagenu w nowotworach, czy w liniach komórek nowotworowych.

Colagen typu XV należy do rodziny multiplexin (ang. multiple triple helix domains with interruptions) class [50, 55]. Z pośród badanych linii komórkowych jego ekspresję zaobserwowaliśmy we wszystkich pochodnych linii SKOV-3 opornych na leki cytotoksyczne. Sugeruje to, że jego ekspresja jest niespecyficzną odpowiedzią na leki cytotoksyczne w tej linii komórkowej. Dodatkowo ekspresję COL15A1 obserwowaliśmy w pochodnych linii W1 opornych na Vin i Top. Ekspresja w trzech z pięciu linii opornych na Top sugeruje jego związek z opornością na ten lek.

W przeciwieństwie do większości kolagenów, COL17A1 należący do rodziny MACIT (ang. membrane associated collagens with interrupted triple helices) [56] jest białkiem transbłonowym funkcjonującym jako receptor i odgrywa istotną rolę w łączeniu elementów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych [57]. Jego ekspresję obserwowano w guzach melanocytowych, gdzie też został użyty jako cel molekularny indukujący apoptozę. Ekspresja COL17A1 była również notowana w raku płasnonabłonkowym oraz pochodzących z niego liniach komórkowych [58]. Jak dotąd nie zaobserwowano jednak jego związku z opornością na cytostatyki. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji *COL17A1* w obu liniach pochodnych SKOV-3 opornych na Cis i Top oraz w pochodnej linii A2780 opornej na Pac. Skoro COL17A1 funkcjonuje jako receptor można przypuszczać, że przenosi on sygnały indukujące oporność na cytostatyki. Z drugiej strony skoro przeciwciała anty-COL17A1 indukują apoptozę w komórkach czerniaka, COL17A1 może być również potencjalnym celem molekularnym w naszych liniach komórkowych.

Z danych literaturowych wiadomo, że ECM zawierająca duże ilości kolagenu zwiększa inwazyjność i progresje guzów [59]. Ekspresja prawie wszystkich kolagenów obserwowanych w niniejszej pracy była również związana z progresją i przerzutowaniem nowotworów. Ponieważ nowotwory cechujące się większą inwazyjnością i przerzutowością są najczęściej bardziej oporne na chemioterapię sugeruje to, że ekspresja kolagenów może mieć związek z opornością nowotworów na chemioterapię również in vivo.

Należy zaznaczyć, że po raz pierwszy zaobserwowaliśmy ekspresję zewnątrzkomórkowego kolagenu w liniach komórkowych rosnących jako jedna warstwa komórek. Obserwowaliśmy tylko zewnątrzkomórkową obecność COL3A1, ponieważ jego ekspresja była najwyższa z

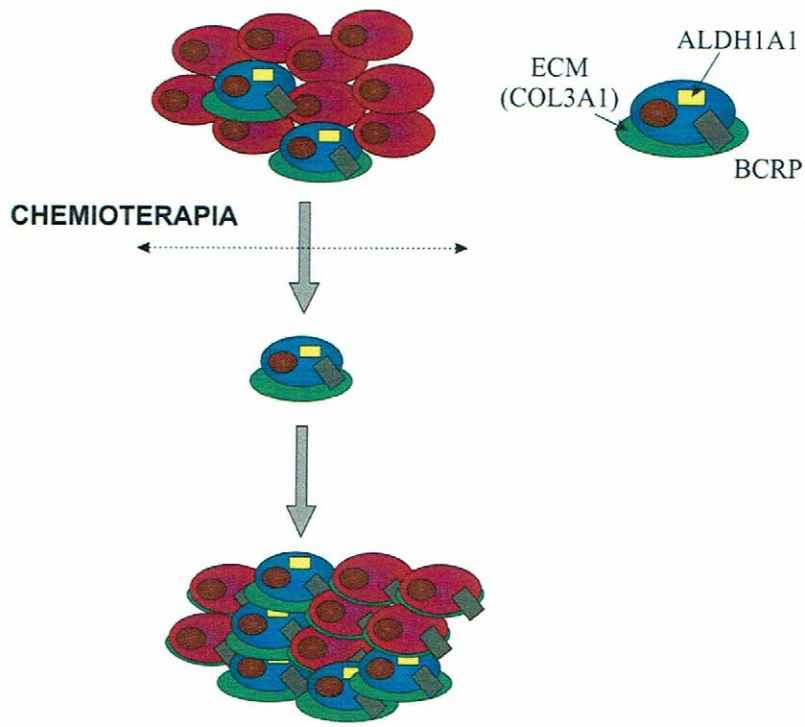
pośród wszystkich badanych kolagenów. Sugeruje to jednak, że inne kolageny w takich warunkach mogą być również wydzielane na zewnątrz komórek. Uważamy, że zewnątrzkomórkowy kolagen może chronić komórki przed cytostatykami trzema różnymi mechanizmami.

1. Zewnątrzkomórkowy, ale również wewnątrzkomórkowy kolagen może wiązać leki cytostatyczne i blokować ich dostęp do celów molekularnych. Wydaje się to prawdopodobne w przypadku Top i Pac. W naszych badaniach ekspresja wszystkich kolagenów fibrylarnych (COL1A1, 1A2, 3A1 i 5A2) były podwyższone tylko w liniach komórkowych opornych na te leki, co sugeruje, że struktura kolagenu fibrylarnego może wiązać oba leki ograniczając ich dostępność do komórek.
2. Jest również możliwe, że obecność dużej ilości kolagenu może ograniczać dyfuzję leków podobnie jak w tkankach nowotworowych.
3. Trzecia możliwość to oporność na leki indukowana adhezją komórek. Zjawisko takie jest opisane zarówno in vivo [41] jak i in vitro [42]. Komórki nowotworowe poprzez receptory powierzchniowe oddziałują ze składnikami ECM w tym kolagenami. Oddziaływania takie indukują w nich oporność na apoptozę [7].

Biorąc pod uwagę, że komórki wydzielają duże ilości COL3A1 in vitro jest bardzo prawdopodobne, że poprzez wiązanie z receptorami powierzchniowymi indukuje on w nich CAM-DR. Co więcej wydaje się, bardzo prawdopodobne, że zewnątrzkomórkowy kolagen może indukować oporność również w komórkach sąsiednich, które go nie produkują. Jest to zgodne z modelem rozwoju oporności na chemioterapię Morin i wsp., którzy uważają, że komórkami pierwotnie opornymi na chemioterapię w guzie są komórki produkujące duże ilości ECM [8]. Komórki te indukują również oporność w komórkach sąsiednich w wyniku CAM-DR, a po zastosowanej chemioterapii zawartość takich komórek wzrasta. Z drugiej strony model CSCs, sugeruje, że komórkami pierwotnie opornymi na chemioterapię są komórki ALDH+ z wysokim poziomem ekspresji P-gp lub BCRP [16, 17]. Postanowiliśmy więc sprawdzić, jak wygląda ekspresja ALDH1A1 w komórkach produkujących zewnątrzkomórkowy kolagen. Okazało się, że komórkami, które produkują najwięcej COL3A1 są komórki ALDH1A1+. Z publikacji nr 2 wiemy, że cechują się one wysoką ekspresją BCRP i posiadają cechy CSCs. W obecnej pracy odkryliśmy, że ich kolejną cechą jest produkcja COL3A1. Tak więc uzyskany wynik łączy dwa modele rozwoju oporności na chemioterapię. Model CSCs z modelem opartym o ekspresje ECM przez komórki pierwotnie oporne na chemioterapię. Wedle naszej wiedzy podobny model nie był dotąd opisany (Ryc. 2).

Podsumowanie:

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje dwa bardzo istotne aspekty oporności komórek nowotworowych na leki cytotoksyczne. Badania dotyczą roli CSCs w rozwoju oporności na chemioterapię oraz roli ekspresji składników ECM w tym procesie. W badaniach wykazano, że komórki o cechach CSCs z wysokim poziomem ekspresji ALDH1A1 mogą odgrywać istotną rolę z rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika. Co więcej komórki te mogą być celem terapeutycznym, a zastosowanie inhibitorów ekspresji lub aktywności ALDH1A1 uwrażliwia je na leki cytotoksyczne. Wykazano również, że we wszystkich liniach komórkowych opornych na cytostatyki dochodzi do wzrostu ekspresji wielu genów kodujących składniki ECM, w tym kolageny. Komórkami, które produkują największe ilości COL3A1 są komórki z wysokim poziomem ekspresji ALDH1A1. Uzyskany model łączy dwa modele rozwoju oporności na chemioterapię model CSCs oraz model oparty o komórki z wysokim poziomem ekspresji ECM.



Ryc. 2. Model rozwoju oporności na chemioterapię w linii opornej na topotekan (Top). Początkowo niewielka liczba komórek wykazywała ekspresję ALDH1A1, BCRP (cechy CSCs) oraz składników macierzy ECM. Po ekspozycji na Top przeżyły komórki o cechach CSCs i ekspresji ECM (COL3A1). Komórkami produkującymi największe ilości COL3A1 są komórki z ekspresją ALDH1A1. Komórki uodporniły się na Top dzięki ekspresji BCRP oraz COL3A1, który może również indukować oporność w komórkach sąsiednich w wyniku CAM-DR.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

W latach 1993-1997 uczęszczałem do Liceum Ogólnokształcącego im. Powstańców Wielkopolskich w Wągrowcu. W roku 1997 rozpocząłem studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu na kierunku biotechnologia. Studia ukończyłem w roku 2002 uzyskując tytuł magistra biotechnologii. W latach 1999-2002 wykonywałem prace magisterską w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem prof. Krzysztofa Szyftera. Temat pracy dotyczył porównania aktywności indorubiny i betanaftoflawonu (BNF) jako ligandów receptora Ah. Receptor Ah (ang. aryl hydrocarbon (AhR) reguluje odpowiedź komórek na liczne związki chemiczne pochodzące ze środowiska, takie jak policykliczne węglowodory aromatyczne (benzopiren) i ich pochodne (np. dioksyny). Po połączeniu z ligandem receptor indukuje ekspresję enzymów I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków. Enzymy fazy I aktywują węglowodory aromatyczne prowadząc do wzrostu ich kancerogenności, natomiast enzymy fazy II sprzęgają je ze związkami takimi jak glutation prowadząc do ich inaktywacji. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że BNF jest znacznie lepszym induktorem aktywności enzymów zależnych od receptora Ah niż indorubina.

Doktorat

Po ukończeniu studiów magisterskich i obronie pracy magisterskiej w roku 2002 rozpocząłem studia doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania prowadziłem w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej pod kierownictwem prof. Pawła Jagodzińskiego. Praca dotyczyła ekspresji wybranych białek biorących udział w przenoszeniu sygnału wewnątrzkomórkowego z receptora TCR w limfocytach T $CD4^+$ u pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym (ang. Systemic lupus erythematosus (SLE)). Toczeń rumieniowaty układowy jest złożona chorobą autoimmunologiczną obejmującą różne organy. Charakteryzuje się produkcją przeciwciał skierowanych przeciwko auto-antygenom [60]. Komórkami produkującymi przeciwciała są zróżnicowany limfocyty B (komórki plazmatyczne), jednak za aktywację limfocytów B odpowiedzialne są limfocyty T CD4+.

Do aktywacji limfocytów T dochodzi w wyniku kontaktu receptora TCR (ang. T cell receptor) z cząsteczkami MHC na komórkach prezentujących antygen np. limfocytach B. W błonie komórkowej receptor TCR tworzy kompleks z cząsteczką CD3 złożoną z łańcuchów ε, γ, δ i ζ (zeta). Po rozpoznaniu antygenu przez receptor TCR dochodzi do fosforylacji łańcuchów cząsteczki CD3 przez kinazy tyrozynowe Lck i Fyn. Następnie do ufosforylowanego łańcucha ζ przyłącza się kinaza ZAP-70, która jest fosforylowana przez kinazę Lck. Aktywowana kinaza

ZAP-70 fosforyzuje białka adapterowe takie jak LAT i SLP-76. Kolejnym etapem jest aktywacja szlaku kinaz MAP, białkowej kinazy C, fali wapniowej, a w konsekwencji aktywacja czynników transkrypcyjnych i ich translokacja do jądra komórkowego [61].

Limfocyty T CD4+ od pacjentów z SLE wykazują szereg zaburzeń, które prowadzą do wzmożonej transdukcji sygnału z receptora TCR i ich wzmożonej aktywacji. Konsekwencją tych zmian jest niewłaściwe pobudzenia limfocytów B i wzmożona odpowiedź humoralna przeciwko auto-antygenom obserwowana w tej jednostce chorobowej [62]. Limfocyty T od pacjentów z SLE charakteryzują się również obniżeniem poziomu metylacji DNA, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu ekspresji wielu genów, również tych odpowiedzialnych za transdukcję sygnału [63]. W naszych badaniach wykazaliśmy zwiększoną ekspresję białka LAT w limfocytach TCD4+ od pacjentów z SLE w porównaniu do kontroli. Wykazaliśmy również ujemną korelację pomiędzy poziomem ekspresji kinazy ZAP-70, a aktywnością choroby mierzoną w skali SLEDAI (ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) lub jako liczbę zajętych organów. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że w permanentnie pobudzonych limfocytach T, podobnie jak w limfocytach T we wtórnej odpowiedzi immunologicznej kinaza ZAP-70 jest zastępowana przez bardziej aktywną kinazę Syk [64]. U pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą obserwowaliśmy również obniżenie poziomu ekspresji metylotransferazy DNA 1 (DNMT1). DNMT1 jest enzymem, który podczas procesu replikacji DNA wprowadza grupę metylową do cytozyny w pozycji 5 w parach zasad CpG na nowo syntetyzowanej nici. Do metylacji cytozyny najczęściej dochodzi w sekwencjach promotorowych genów, w tak zwanych wyspach CpG [65, 66]. Obniżenie ilości tego enzymu prowadzi o zmniejszonej metylacji cytozyny w DNA, co z kolei prowadzi do wzrostu ekspresji genów regulowanych przez proces metylacji. Do genów takich należą również te odpowiedzialne za proces aktywacji limfocytów TCD4+. Uzyskane wyniki wskazują na możliwe przyczyny niewłaściwej aktywacji tych komórek u pacjentów z SLE. Poza opisanymi wyżej badaniami, które były tematem rozprawy doktorskiej w czasie studiów doktoranckich zajmowałem się głównie tematyką SLE oraz regulacją ekspresji genów w limfocytach T przez związki wpływające na metylację DNA i acetylację histonów – regulacja epigenetyczna. Efektem tych prac jest sześć publikacji.

Do zmian epigenetycznych zalicza się wspomnianą wyżej metylację DNA oraz acetylację histonów [65, 66]. Podczas procesu replikacji DNA pary zasad CpG na nowej nici ulegają metylacji przez DNMT1. Zwiększona metylacja blokuje dostęp czynników transkrypcyjnych. Enzym ten współdziała z deacetylazą histonów (HDAC), która poprzez zmniejszenie acetylacji histonów prowadzi do kondensacji i zmniejszenia dostępności chromatyny dla czynników

odpowiedzialnych za transkrypcję genów. Oba procesy prowadzą więc do obniżenie aktywności transkrypcyjnej. Oprócz tocznia idiopatycznego, który był tematem pracy doktorskiej można wyróżnić również tak zwany toczeń indukowany lekami - DIL (ang. drug-induced lupus). Jego najbardziej charakterystyczną cechą jest występowanie przeciwciał przeciwko histonom. Przebieg choroby jest łagodniejszy niż tocznia idiopatycznego. Nie występują objawy hamatologiczne i nerkowe, a stan pacjentów poprawia się po odstawieniu leków. Lekiem, który najczęściej wywołuje objawy tocznia jest prokainamid – lek stosowany w zaburzeniach rytmu serca. Wśród wielu innych można wyróżnić hydralazynę – lek obniżający ciśnienie tętnicze krwi.

Poza swoim działaniem leczniczym prokaninamid jest inhibitorem aktywności DNMT1. Podobnie jak najlepiej zbadany inhibitor DNMT1 - 5-azacytydyna (AZC) może indukować w limfocytach T CD4+ fenotyp podobny do tego, który obserwuje się u pacjentów z toczniem idiopatycznym [67]. U przyczyny tego zjawiska leży obniżenie metylacji DNA i wzrost aktywności genów kodujących m. in. biała sygnalizacyjne.

Trichostatyna A (TSA) -antybiotyk przeciwgrzybiczy jest inhibitorem HDAC, a jej działanie prowadzi do wzrostu ekspresji wielu genów. Jednak w niektórych przypadkach obserwuje się obniżenie ekspresji genów pod wpływem działania TSA.

Celem pierwszej pracy było określenie wpływu inhibitorów DNMT1 (prokainamid i AZC) oraz HDAC (TSA), na ekspresję łańcucha ζ w komórkach linii białaczkowej limfocytów T – Jurkat E6.1. Wyniki naszej pracy wykazały, że TSA obniża ekspresję łańcucha ζ na poziomie transkrypcji, co potwierdzały wyniki innych badaczy [68]. Wyniki naszych badań wykazały również, że zarówno prokainamid jak i AZC prowadzą do obniżenia zawartości łańcucha ζ w komórkach Jurkat. Jednak w tym przypadku regulacja ekspresji była inna od oczekiwanej. Nie zaobserwowaliśmy zmian w poziomie transkryptu, natomiast oba związki obniżały ilość białka łańcucha ζ. Uzyskane wyniki wskazują, że obniżenie metylacji DNA prowadzi prawdopodobnie do wzrostu ekspresji białek odpowiedzialnych za degradację łańcucha ζ. Podobnie działanie TSA obniżało stabilność transkryptu łańcucha ζ. Wynik takie są zgodne z wynikami od pacjentów z idiopatycznym SLE, u których również obserwuje się obniżenie ekspresji łańcucha ζ w limfocytach T [69]. Wiąże się to prawdopodobnie z zastąpieniem łańcucha ζ łańcuchem gamma i kinazy ZAP-70 kinazą SYK, co prowadzi do znacznie silniejszej transdukcji sygnału w limfocytach T od pacjentów z SLE [64].

W kolejnej pracy zbadaliśmy wpływ prokainamidu na poziom transkryptów kinaz ZAP-70 i SYK, oraz białek adapterowych LAT i SLP-76 w komórkach linii białaczkowej limfocytów T – Jurkat E6.1. We wszystkich przypadkach obserwowaliśmy obniżenie poziomu badanych

transkryptów w wyniku działania prokainamidu. Wynik ten wskazywał, że prawdopodobnie ekspresja badanych genów nie jest regulowana na poziomie metylacji DNA, a obniżenie metylacji DNA prowadzi do wzrostu ekspresji czynników, które regulują obniżenie ekspresji badanych genów lub obniżają stabilność badanych transkryptów.

W kolejnym etapie badań skupiliśmy się na znaczeniu HDAC w regulacji ekspresji genów w limfocytach T. Ponieważ ekspresja DNMT1 jest obniżona w limfocytach T od pacjentów z SLE w pierwszej kolejności postanowiliśmy sprawdzić, czy obniżenie ekspresji DNMT1 może mieć związek ze zmianami w aktywności HDAC, ponieważ oba enzymy są ze sobą funkcjonalnie powiązane. W tym celu w komórkach linii białaczkowej limfocytów T Jurkat E6.1. aktywność HDAC zablokowaliśmy z użyciem TSA. Zablokowanie aktywności HDAC prowadziło do zależnego od stężenia TSA i czasu działania obniżenia ilości zarówno transkryptu jak i białka DNMT1. Wykazaliśmy, że TSA zmniejsza okres półtrwania mRNA DNMT1 z 7 do 2 godzin. Sugerowało, to, że TSA indukuje ekspresje RNAz odpowiedzialnych za degradację tego transkryptu lub obniża ekspresję białek odpowiedzialnych za jego stabilność [70]. Następnie wykazaliśmy, że mechanizm działania TSA zależny jest od biosyntezy białka de novo. Nasze wyniki wskazują, że TSA może mieć dwojaki wpływ na regulację ekspresji genów. 1. bezpośrednio przez zwiększenie acetylacji histonów i dekondensację chromatyny; 2. pośrednio przez obniżenie ekspresji DNMT1, a w konsekwencji zmniejszenie metylacji DNA w sekwencjach regulatorowych genów, co wiąże się ze wzrostem ich ekspresji.

W następnym etapie badań sprawdziliśmy wpływ TSA na ekspresję cząsteczek biorących udział w transdukcji sygnału z receptora TCR do jądra komórkowego. Nasze badania wykazały, że zablokowanie HDAC prowadzi do obniżenia ekspresji genów kodujących cząsteczki ZAP-70, LAT oraz SLP-76 zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Co więcej podobnie jak w przypadku DNMT1 wykazaliśmy, że za obniżenie ekspresji odpowiada zmniejszenie okresu półtrwania mRNA ZAP-70, LAT i SLP-76. Jak wykazały eksperymenty z zastosowaniem cykloheksimidu mechanizm ten jest zależny od biosyntezy białka. Sugeruje to, że zablokowanie HDAC prowadzi do zwiększenia ekspresji RNAz lub obniżenia ekspresji białek odpowiedzialnych za stabilność badanych transkryptów. Obniżenie poziomu ekspresji cząsteczek sygnalizacyjnych przez TSA wskazuje na działanie immunosupresyjne. Sugeruje to potencjalne zastosowanie tego związku w leczeniu chorób autoimmunologicznych. Immunosupresyjne działanie TSA wykazano również w mysim modelu SLE [71] oraz w zdrowych limfocytach T [72].

Podsumowując w trakcie studiów doktoranckich opublikowałem 7 publikacji z zakresu tematyki tocznia i epigenetycznej regulacji ekspresji genów, a 6 z nich znajduje się w bazie PubMed.

Drugim tematem, który realizowałem w trakcie studiów doktoranckich był temat związany z obecnością mRNA w plemnikach. W szczególności skupiliśmy się na roli mRNA dla receptora hemokin - CCR5. Chemokiny są małymi białkami należącymi do grupy cytokin. Ich rola polega na przyciąganiu leukocytów do miejsc procesu zapalnego [73]. Uważa się również, że niektóre chemokiny odgrywają rolę w zapłodnieniu przyciągając plemniki do miejsca zapłodnienia w narządach rodnych. Szczególną uwagę badaczy zwracała chemokina RANTES (ang. Regulated upon Activation of Normal T-cells Expressed and Secreted) ponieważ jest ona obecna w płynach pochodzących z narządów rodnych [74]. Chemokina ta oddziaływuje na komórki poprzez wiązanie z receptorem CCR5 [75]. Celem pracy była identyfikacja mRNA dla receptora CCR5 w plemnikach pochodzących od płodnych mężczyzn. Nasze badania wykazały obecność mRNA dla receptora CCR5 we wszystkich badanych próbach - 13. W limfocytach obwodowych identyfikuje się, co potwierdziły nasze badania, izoformy mRNA CCR5 składające się z egzonów 1, 2, 3, 4 lub 1, 3, 4. Jednak w porównaniu do mRNA CCR5 podchodzącego z komórek krwi obwodowej zidentyfikowany w plemnikach traskrypt był krótszy. Składał się tylko z egzonów 3 i 4. Wyniki naszych badań wskazały na obecność w plemnikach nowej izoformy mRNA dla receptora CCR5.

W kolejnym etapie badań porównaliśmy poziom transkryptu CCR5 oraz aromatazy P450 w plemnikach pochodzących od mężczyzn płodnych i niepłodnych. Kompleks aromatazy składający się z aromatazy P450 oraz reduktazy NADPH- cytochrom P450, bierze udział w syntezie estrogenów z androgenów [76]. Brak aromatazy u myszy skutkuje niewłaściwą spermatogenezą, obniżeniem ruchliwości plemników oraz niezdolnością do zapłodnienia oocytów [77]. Uzyskane wyniki wskazały na statystycznie istotne obniżenie ilości mRNA dla CCR5 i aromatazy P450 w plemnikach pochodzących od niepłodnych mężczyzn. Obniżenie ilości mRNA CCR5 w plemnikach niepłodnych mężczyzn może odzwierciedlać poziom tego białka w plemnikach. Obniżenie ilości receptora CCR5 najprawdopodobniej wiąże się z obniżeniem ich ruchliwości w narządach rodnych i zmniejszoną zdolnością do zapłodnienia oocytu, co może być przyczyną niepłodności męskiej. Z kolei obniżenie ilości mRNA dla aromatazy P450 najprawdopodobniej odzwierciedla poziom ekspresji tego enzymu podczas spermatogenezy i jest związane z nieprawidłowym dojrzewaniem plemników u niepłodnych mężczyzn.

Podsumowując uzyskane wyniki wskazują, że zawartość mRNA CCR5 i aromatazy P450 w plemnikach może być markerem ich zdolności do zapłodnienia. Wyniki prac zostały opublikowane w dwóch publikacjach w bazie PubMed. W pierwszej z nich jestem pierwszym autorem.

Praca w Katedrze Histologii i Embriologii UM w Poznaniu.

W roku 2009 rozpocząłem pracę w Katedrze Histologii i Embriologii UM w Poznaniu. Prace prowadziłem pod kierownictwem prof. Macieja Zabla stopniowo się usamodzielniając. Wszystkie publikacje pochodzące z Katedry Histologii i Embriologii dotyczą szeroko pojętej oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. Moją pracę można podzielić na trzy części. Pierwsza z nich to realizacja własnych pomysłów badawczych, jej efektem jest pięć oryginalnych publikacji (nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) w bazie PubMed z łącznym IF 8,656 i liczbą cytowani 66. Druga część to współpraca z dr Witoldem Szaflarskim, która zaowocowała dwiema publikacjami. Obie z IF, jedna z bazie PubMed. Trzecia część dotyczy współpracy z mgr Karoliną Wojtowicz, a jej afektem są trzy publikacje również znajdujące się w bazie PubMed.

Jak pisałem we wstępie po rozpoczęciu pracy w Katedrze Histologii i Embriologii UM w Poznaniu skupiłem się na oporności komórek nowotworowych na leki cytotoksyczne. Jako model badań wybrałem rak jajnika. Zdecydowana większość badań nad opornością na leki cytotoksyczne była i jest prowadzona na parach linii komórkowych linia wrażliwa – linia oporna (najczęściej jedna lub dwie linie). Dlatego rozpoczynając badania nad opornością postanowiłem stworzyć własny model badań. Nie chciałem się jednak ograniczać tylko i wyłącznie do jednego, czy dwóch leków. Postanowiłem stworzyć modele bardziej rozbudowane, który mogą być bardziej informatywne. Modele stosowane w moich badaniach zostały opisane we wprowadzeniu.

A. Realizacja własnych pomysłów badawczych.

Jednym z problemów w skuteczności chemioterapii jest zjawisko oporności wielolekowej, czyli oporność na niespokrewnione pod względem budowy chemicznej leki. Dlatego też zapoznając się z problemem oporności na chemioterapię w pierwszej kolejności skupiłem się na zbadaniu oporności krzyżowej w na leki cytotoksyczne stosowane w leczeniu raka jajnika w wyprowadzonych liniach opornych w modelu W1 [27]. Badania wykazały oporność krzyżową pomiędzy liniami opornymi na Pac, Dox i Vin, a oporność na wskazane leki była związana z ekspresja transportera błonowego P-gp. Uzyskany wynik sugerował, że jeśli pacjent rozwinie

oporność na Pac stosowany w pierwszej linii chemioterapii wówczas stosowanie Dox w drugiej linii chemioterapii może być bezcelowe z powodu oporności krzyżowej. Badania wykazały również korelacje pomiędzy poziomem transkryptu *MDR1* i białka P-gp, a opornością na Pac. Dox i Vin. Wynik ten potwierdzał, że wskazane leki są substratami dla P-gp [3, 4, 6]. Zaobserwowaliśmy również dwa mechanizmy oporności na Top w badanych liniach komórkowych. W linii opornej na Top obserwowaliśmy klasyczny dobrze opisany mechanizm oparty o ekspresję biała BCRP [78]. Natomiast w linii opornej na Pac obserwowaliśmy krzyżową oporność na Top, która była związana z ekspresja białka P-gp. **Jest to pierwsza tego typu obserwacja, a uzyskany wynik wskazuje na istnienie nowego mechanizmu oporności na Top**. Linie oporne na cytostatyki stosowane w leczeniu raka jajnika wykazywały wrażliwość na Mtx. Wynik taki wskazuje na potencjalne zastosowanie tego leku w leczeniu raka jajnika, ale wymaga on potwierdzenia w innych modelach, a następnie w próbach klinicznych.

Zdobywając doświadczenie w badaniu oporności na leki cytostatyczne w raku jajnika stworzyłem kolejny model badań. Z ustalonej linii raka jajnika A2780 wyprowadziłem po dwie linie oporne na: Cis, Pac, Top i Dox. Poza badaniem oporności krzyżowej i ekspresji genów związanych z opornością model ten pozwala porównać różnorodność odpowiedzi na ten sam cytostatyk w bliźniaczych liniach opornych. W pierwszym etapie badań sprawdzono oporność krzyżową wyprowadzonych linii na leki cytotoksyczne stosowane w I i II linii chemioterapii raka jajnika. Badania wykazały oporność krzyżową pomiędzy liniami opornymi na Pac i Dox, a oporność ta wydaje się być związana z ekspresją i aktywnością białka P-gp w badanych liniach komórkowych. Wynik taki potwierdził nasze wcześniejsze wyniki [27] oraz wyniki innych badaczy [3, 4, 6]. Obie linie oporne na Pac wskazywały krzyżową oporność na Top. Podobnie jak w modelu W1 obserwowaliśmy dwa mechanizmy oporności na Top. „Klasyczny" oparty na aktywności białka BCRP w liniach opornych na Top oraz rzadziej spotykany, oparty o ekspresję białka P-gp w liniach opornych na Pac [27]. W jednej z linii opornych na Top zaobserwowaliśmy krzyżową oporność na Dox opartą o ekspresję białka BCRP. Mechanizm taki rzadko jest opisywany w literaturze [6]. Ciekawym zjawiskiem była oporność krzyżowa jednej z linii opornych na Pac na Cis. W liniach opornych na Cis, Pac i Top obserwowaliśmy wzrost ekspresji białka LRP/MVP (ang. major vault protein/lung resistance - related protein), które jest związane z opornością wielolekową jednak nie należy do rodziny transporterów błonowych ABC [79]. Ekspresja tego białka wydaje się pełnić uzupełniającą role w oporności na leki cytotoksyczne w badanych liniach komórkowych. Obserwowana oporność krzyżowa pomiędzy liniami opornymi na Pac, Dox i Top sugeruje, że Top i Dox nie są odpowiednimi lekami do stosowania w II linii chemioterapii jeśli u pacjentów po I linii chemioterapii

rozwinęła się oporność na Pac oparta o ekspresje P-gp. W liniach opornych na ten sam cytostatyk (linie bliźniacze) obserwowaliśmy podobną, ale nie identyczną ekspresję białek oporności, oraz oporność krzyżową na inne cytostatyki. Wskazuje to, że komórki broniąc się przed lekami cytotoksycznymi wykorzystują różne mechanizmy obronne z puli zapewnianej przez genom.

Po scharakteryzowaniu obu modeli pod kątem oporności krzyżowej i ekspresji najważniejszych genów związanych z oporności na chemioterapie, kolejnym krokiem była analiza mikromacierzowa stworzonych modeli. W pierwszej kolejności dokonano analizy ekspresji wszystkich transporterów błonowych z rodziny białek ABC w badanych modelach. Analizę tą uzupełniono o zbadanie ekspresji transporterów z rodziny SLC.

Nadrodzina transporterów ABC u ludzi składa się z 49 genów zgrupowanych w siedem rodzin od A do G. Najważniejszą rolę w oporności na cytostatyki odgrywają: MDR1 (ABCB1), BCRP (ABCG2), MRP1 (ABCB1) oraz MRP2 (ABCC2) [6]. Jednak wiele innych białek z tej rodziny jest również podejrzewana o udział w oporności na leki cytotoksyczne. Wszystkie te białka fizjologicznie biorą udział w transporcie ze środka komórki na zewnątrz.

Drugą grupę transporterów błonowych stanowią transportery SLC (ang. solute carrier). Do grupy tej należy ponad 300 transporterów podzielonych na 51 rodzin [80]. Ich fizjologiczna rola polega na kontrolowaniu przepływu różnych związków (aminokwasy, cukry, kationy, aniony, nukleotydy, metale, witaminy rozpuszczalne w wodzie...) do wnętrza komórki [80]. Biorą one również udział w transporcie hydrofilowych leków do komórek [81, 82]. W komórkach nowotworowych obserwuje się wzrost ekspresji transporterów związanych z dostarczaniem związków pokarmowych, natomiast spadek ekspresji transporterów przenoszących leki [81, 82].

W pierwszej pracy porównano ekspresje transporterów z rodziny ABC i SLC w liniach opornych na cytostatyki, pochodnych linii W1. Zaobserwowaliśmy zmiany w ekspresji 10 genów z rodziny ABC. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji *ABCG2* w linii opornej na Top, oraz wzrost ekspresji *ABCB1* w liniach opornych na Pac, Dox i Vin. Ciekawą obserwacją był bardzo wysoki poziom ekspresji genu *ABCB4* w liniach opornych na Dox i Vin. Z pośród innych genów na uwagę zasługuje *ABCA8*. Zaobserwowaliśmy spadek ekspresji tego genu w czterech z sześciu linii opornych. Związek tego genu z opornością nie został do chwili obecnej opisany. Zmiany w ekspresji pozostałych genów kodujących białka ABC była znacznie mniejsze. Zaobserwowaliśmy również zwiększoną ekspresje 18 i obniżoną ekspresje 16 genów z rodziny SLC w badanym modelu. Ekspresja czterech genów SLC była podwyższona lub obniżona w zależności od linii komórkowej. Ekspresja czterech genów

(*SLC6A1*, *SLC9A2*, *SLC12A1*, *SLC16A6*) była znacząco podwyższona (ponad 10 razy), a sześciu (*SLC2A14*, *SLC7A3*, *SLC7A8*, *SLC7A11*, *SLC16A14*, *SLC38A9*) znacząco obniżona. **Nasz wynik jest pierwszym, który wskazuje na rolę genów *SLC6A1*, *SLC9A2*, *SLC12A1*, *SLC16A6* w oporności na cytostatyki.** Z pośród genów o zmniejszonej ekspresji jedynie *SCL7A5* był opisany w związku z opornością na melfallan [83], a *SCL19A1* kodujący tranporter dla zredukowanego folianu w oporności na Mtx [84, 85]. Ponieważ w naszej linii komórkowej opornej na Mtx nie znaleźliśmy innej przyczyny oporności na Mtx wydaje się, że główną role pełni obniżenie ekspresji genu *SLC19A1*.

Identyczną analizę przeprowadzono do drugim modelu wyprowadzonym z linii A2780. Z pośród genów kodujących białka ABC obserwowaliśmy wzrost ekspresji siedmiu i spadek ekspresji trzech genów. Zgodnie z oczekiwaniami ekspresja genu *ABCB1* była znacząco podwyższona w liniach opornych na Pac i Dox, a ekspresja genu *ABCG2* w liniach opornych na Top. Podobnie jak w przypadku modelu W1 w obu liniach opornych na Dox obserwowaliśmy znaczący wzrost ekspresji genu *ABCB4*. Podobny wzrost obserwowaliśmy w jednej z linii opornych na Pac. Odporność na Cis miała związek z ekspresją genu *ABCC2* w obu liniach opornych. W linii opornej na Pac zaobserwowaliśmy znaczący wzrost ekspresji genu *ABCA8*. Wyniki taki był w sprzeczności z wynikiem uzyskanym w modelu W1. Tak więc rola *ABCA8* w oporności na cytostatyki wymaga dalszych badań.

Z pośród transporterów SLC odnotowaliśmy zwiększoną ekspresję 17 i obniżona ekspresje 15 genów. Ekspresja pięciu z nich była znacząco podwyższona (więcej niż 10x) (*SLC2A9*, *SLC16A3*, *SLC16A14*, *SLC38A4* oraz *SLC39A8*), a czterech (*SLC2A14*, *SLC6A15*, *SLC8A1*i*SLC27A2*) znacząco obniżona. **Związek ekspresji genów *SLC2A9*, *SLC16A3*, *SLC16A14*, *SLC38A4*, *SLC39A8*, *SLC6A15*, *SLC8A1* oraz *SLC27A2* z opornością na leki cytotoksyczne nie został dotąd opisany przez innych badaczy.** Obniżoną ekspresję *SCLA14* obserwowaliśmy w obu liniach opornych na Pac. W modelu W1 również obserwowaliśmy obniżenie ekspresji tego genu w linii opornej na Pac [86]. **Są to pierwsze wyniki, które sugerują związek ekspresji tego genu z opornością na cytostatyki.**

Podsumowując w obu pracach potwierdziliśmy rolę klasycznych transporterów ABC w oporności na cytostatyki. Nasze wyniki, wskazały również na około 50 nowych transporterów, których zmiana ekspresji może być związana z lekoopornością. Większość z nich nie była do tej pory opisana w literaturze.

Najbardziej interesującym z genów, których ekspresja uległa zmianie w badanych liniach komórkowych był gen *ABCB4* (*MDR3*). Gen ten koduje białko podobne do P-gp. Homologia na poziomie nukleotydów wynosi 80% [87]. Ponieważ wyniki z mikromacierzy sugerowały

jego związek z opornością na niektóre leki postanowiłem dokonać bardziej dokładnej analizy związku ekspresji tego genu z opornością na leki cytotoksyczne. Do momentu naszej pracy istniało tylko kilka prac sugerujących związek ekspresji tego genu z lekoopornością, głównie w białaczkach [88]. W naszej pracy wykazaliśmy ekspresję genu *ABCB4* w trzech liniach raka jajnika opornych na Dox, czterech opornych na Pac oraz jednej opornej na Vin. Wykazaliśmy również wzrost ekspresji w linii LoVo (rak jelita) opornej na Dox (LoVoDx). We wszystkich badanych liniach opornych wzrostowi ekspresji genu *ABCB4* towarzyszył wzrost ekspresji genu *ABCB1*. Zauważyliśmy jednak ciekawą zależność pomiędzy ekspresją obu genów. Mianowicie w liniach, w których wzrost poziomu ekspresji genu *ABCB1* był mniejszy notowaliśmy zwiększony poziom ekspresji genu *ABCB4* i na odwrót. Wynik taki sugeruje, że ABCB4 może odgrywać uzupełniającą rolę w stosunku do ABCB1 w oporności na leki cytotoksyczne i że białka kodowane przez oba geny współdziałają w usuwaniu leków cytotoksycznych z komórek nowotworowych.

B. Współpraca z dr Witoldem Szaflarskim.

Poza opisanym wyżej głównym nurtem badań prowadziłem również badania nad lekoopornością w nowotworach we współpracy z innymi osobami. Wraz z dr Witoldem Szaflarskim prowadziłem badania nad rolą krypt komórkowych w oporności raka jajnika na cytostatyki. Krypty zbudowane są z trzech białek: MVP (ang. major vault protein -100 kDa) [89], vPARP (ang. vaultpoly(ADP-ribose) polymerase – 193 kDa) [90] oraz TEP1 (ang. the 240 kDa telomerase-associated protein TEP1) [91]. Dodatkowo zawierają ona RNA nie ulegający translacji. W cytoplazmie białka te tworzą strukturę przypominającą w kształcie beczkę o wymiarach 40 x 67 nm [92]. Pojedyncza krypta zawiera 96 kopii białka MVP, 8 vPARP i 2 TEP1 oraz przynajmniej 6 kopii vRNA [92]. Ich fizjologiczna rola nie jest określona. Białko MVP okazało się identyczne z białkiem LRP (ang. lung resistant protein), które podejrzewa się o udział w oporności na cytostatyki [79]. Nasze badania przeprowadzone na tkankach raka jajnika wykazały obecność zarówno transkryptu jak i białka cząsteczek MVP, vPARP oraz TEP1. Nie zaobserwowaliśmy jednak korelacji z danymi histopatologicznymi i klinicznymi pacjentek.

Drugim z tematów realizowanych wspólnie z dr Szaflarskim była rola lokalizacji białka P-gp w otoczce jądrowej. W literaturze możemy znaleźć wiele doniesień dotyczących lokalizacji, głównie P-gp, ale również BCRP w otoczce jądrowej. Lokalizacja taka występuje zarówno w komórkach nowotworowych [93, 94] jak i zdrowych [95]. W niektórych liniach komórkowych opornych na cytostatyki lokalizacja w otoczce jądrowej jest jedyną formą obecności białek P-

gp lub BCRP w komórkach, co wskazuje na jej decydująca rolę w oporności na cytostatyki [96, 94]. Uważa się, że obecność białek ABC w otoczce jądrowej stanowi drugą linię obrony przed lekami cytotoksycznymi, których miejscem działania jest jądro komórkowe. W naszych badaniach wykazaliśmy obecność białka P-gp zarówno w błonie komórkowej jak i otoczce jądrowej linii raka jelita LoVo opornej na Dox (LoVoDx). Wykazaliśmy również, że P-gp obecna w otoczce jądrowej bierze aktywny udział w usuwaniu Dox z jądra komórkowego. O ile sama lokalizacja w otoczce jądrowej wydaje się pewna, o tyle na temat mechanizmu, który decyduje o różnej lokalizacji białka P-gp w komórce wiadomo bardzo niewiele. Nasze wyniki wskazują, że P-gp w otoczce jądrowej charakteryzuje się niższą masą cząsteczkową niż ta obecna w błonie komórkowej. Niższa masa cząsteczkowa formy jądrowej związana jest obecnością różnych łańcuchów cukrowych w obu formach. Wynik taki sugeruje, że różnice w dołączanych w procesie glikozylacji łańcuchach cukrowcowych mogą decydować o różnej lokalizacji białka w komórce.

C. Współpraca z mgr Karoliną Wojtowicz.

W kolejnej części badań prowadzonych przez mgr Karolinę Wojtowicz skupiliśmy się właśnie na roli glikozylacji w aktywności i lokalizacji komórkowej białek P-gp oraz BCRP. W badaniach tych, moja rola polegała głównie na pomocy w planowaniu eksperymentów oraz korekcie manuskryptów przed wysłaniem do publikacji.

Glikozylacja jest procesem posttranslacyjnej modyfikacji białek, w którym cząsteczki cukru są dołączane do białka. Zarówno P-gp jak i BCRP ulegają procesowi N-glikozylacji. Pierwszy etap glikozylacji zachodzi w retikulum endoplazmatycznym (ER). Rdzeń cukrowcowy jest dołączany do reszty asparaginy w białku docelowym. Następnie białko ulega translokacji do Aparatu Golgiego (GA), gdzie dochodzi do przyłączenia kolejnych reszt cukrowcowych [97]. Białko P-gp posiada trzy miejsca glikozylacji na pierwszej pętli zewnątrzkomórkowej [98], a glikozylacja zwiększa masę białka ze 140 kDa do 170 kDa [99]. Z kolei białko BCRP posiada jedno miejsce glikozylacji [100], a glikozylacja zwiększa masę białka z 60 do 70 kDa [101]. Celem badań było określenie wpływu zahamowania procesu glikozylacji białek P-gp i BCRP na oporność linii komórkowych na leki cytotoksyczne. Badania przeprowadziliśmy na liniach komórkowych opornych na Pac lub Dox z opornością opartą o ekspresję P-gp oraz na liniach komórkowych opornych na Top z opornością opartą o ekspresję BCRP. W pierwszym etapie badań zastosowaliśmy tunicamycynę – związek który blokuje pierwszy etap glikozylacji zachodzący w ER [102]. Zablokowanie glikozylacji na tym etapie zwiększało wrażliwość wszystkich badanych linii komórkowych na stosowane leki cytotoksyczne. W obu liniach

opornych zarówno na Pac jak i Dox zaobserwowaliśmy spadek masy cząsteczkowej białka P-gp z 170 kDa do około 70 kDa. Wynik ten wskazuje, że zahamowanie glikozylacji prowadzi najprawdopodobniej do degradacji białka P-gp. Zaobserwowaliśmy również znaczące zahamowanie translokacji białka P-gp do błony komórkowej, co wskazuje na znaczenie glikozylacji w procesie lokalizacji tego biała w komórce. W przypadku białka BCRP wpływ tunikamycyny, był zależny od zastosowanej linii komórkowej. W jednej z linii (A2780TR1) zaobserwowaliśmy całkowity brak białka BCRP, podczas gdy w drugiej linii (W1TR) Tun hamowała jedynie proces glikozylacji. Nie obserwowaliśmy natomiast zmiany w lokalizacji komórkowej białka BCRP w linii W1TR. Wynik ten wskazuje, że obecność lub brak reszty cukrowcowej w białku BCRP może mieć bardzo różny wpływ na jego stabilność. Brak reszty cukrowcowej wydaje się mieć mniejszy wpływ na lokalizację białka BCRP niż P-gp. Jednak zwiększona wrażliwość na cytostatyki wskazuje, że glikozylacja może mieć wpływ na aktywność transportową tego białka.

W drugim etapie badań postanowiliśmy zastosować dwa kolejne związki. Brefeldynę A (BFA) oraz castanospermine (CAS). BFA blokuje transport białek pomiędzy ER i GA [103], natomiast CAS jest inhibitorem gukozydazy I i II i blokuje glikozylację terminalną zachodzącą w GA [104]. Wyniki naszych badań wskazują, że BFA obniża masę cząsteczkową białka P-gp, co wiązało się ze zwiększoną wrażliwością komórek na cytostatyki. W przypadku białka BCRP po zastosowaniu BFA dochodziło do częściowej degradacji tego białka oraz lekkiego obniżenia wrażliwości na cytostatyki. Po zastosowaniu CAS obserwowaliśmy zahamowanie glikozylacji białka BCRP. Zarówno BFA jak i CAS miały wpływ na lokalizację P-gp w komórce. W szczególności CAS powodowało przesuniecie P-gp z błony komórkowej do cytoplazmy, co sugeruje, że nawet końcowa glikozylacja ma wpływ na lokalizacje tego białka w komórce. Analiza aktywności P-gp i BCRP wykazała, że wpływ BFA i CAS na aktywność P-gp jest zależny od użytej linii komórkowej. BFA nie wykazała wpływu na aktywność transportową białka BCRP. Natomiast CAS znacząco obniżało aktywność transportową tego białka.

Podsumowując zastosowanie inhibitorów glikozylacji białek może mieć potencjalne znaczenie w zwiększeniu skuteczności chemioterapii.

Podsumowanie - bibliometria (stan na 20 stycznia 2016)

- Jestem autorem 27 publikacji, w tym 19 jako pierwszy autor.
- Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: 43,999 (33,966: jako pierwszy autor)
- Liczba punktów MNiSW: 465 (356 jako pierwszy autor)

• Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): 318 (276 jako pierwszy autor)

• Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 11

Litelatura:

1. Garcia M, Jemal A, Ward EM, et al. *Global cancer facts & figures*. Atlanta, USA: American Cancer Society; 2007.
2. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. *Ovarian cancer*. Lancet 2009; 374:1371–82.
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer 2002;2:48–58.
4. Choi CH. *ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal*. Cancer Cell Int. 2005;5:30.
5. Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. *ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance*. Cancer Metastasis Rev. 2007;26:39-57.
6. Ozben T. *Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer*. FEBS Lett. 2006;580:2903–2909.
7. Correia AL, Bissell MJ. *The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance*. Drug Resist Updat. 2012;15:39-49.
8. Morin PJ. *Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture*. Drug Resist Updat. 2003;6:169-72.
9. Jain RK. *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res. 1988;48:2641–2658.
10. Chauhan VP, Stylianopoulos T, Boucher Y, et al. *Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies*. Annu Rev Chem Biomol Eng. 2011;2:281-298.
11. Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, et al. *Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy*. Clin Cancer Res. 2002;8:878-884.
12. Netti PA, Berk DA, Swartz MA, et al. Jain RK. *Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors*. Cancer Res. 2000;60:2497–2503.
13. Stylianopoulos T, Diop-Frimpong B, Munn LL, et al. *Diffusion anisotropy in collagen gels and tumors: the effect of fiber network orientation*. Biophys J. 2010;99:3119–3128.
14. Greaves M, Maley CC. *Clonal evolution in cancer*. Nature 2012;481:306–13.
15. Clevers H. *The cancer stem cell: premises, promises and challenges*. Nat Med 2011;17:313–9.
16. Moitra K, Lou H, Dean M. *Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development*. Clin Pharmacol Ther 2011;89:491–502.
17. Alison MR, Lin WR, Lim SML, Nicholson LJ. *Cancer stem cells: in the line of fire*. Cancer Treat Rev 2012;38:589–98.
18. Clevers H. *Stem cells, asymmetric division and cancer*. Nat Genet 2005;37:1027–8.
19. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. *Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization*. FASEB J 2012;12:218–22.
20. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, et al. *Efficient tumour formation by single human melanoma cells*. Nature 2008;456:593–8.
21. Malcolm R Alison, Naomi J Guppy, Susan ML Lim and Linda J Nicholson. *Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose?* J Pathol 2010;222:335–344.
22. Ma I, Allan AL. *The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells*. Stem Cell Rev 2011;7:292–306.

23. Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, J.S., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y.,Noguchi, S. *Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers*. Clin. Cancer Res. 2009;15:4234–4241.
24. Croker, A.K., Allan, A.L. *Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH)activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-likeALDHhiCD44+human breast cancer cells.* Breast Cancer Res. Treat. 2012;133:75–87.
25. Wang, Y.C., Yo, Y.T., Lee, H.Y., Liao, Y.P., Chao, T.K., Su, P.H., Lai, H.C. *ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44expression, drug resistance, and poor clinical outcome*. Am. J. Pathol. 2012;180:1159–1169.
26. Landen Jr., C.N., Goodman, B., Katre, A.A., Steg, A.D., Nick, A.M., Stone, R.L., Miller,L.D., Mejia, P.V., Jennings, N.B., Gershenson, D.M., Bast Jr., R.C., Coleman, R.L.,Lopez-Berestein, G., Sood, A.K. *Targeting aldehyde dehydrogenasecancer stem cells in ovarian cancer*. Mol. Cancer Ther. 2010;9:3186–3199.
27. Januchowski R, Wojtowicz K, Sujka-Kordowska P, Andrzejewska M, Zabel M. *MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines*. Biomed Res Int. 2013;2013:241763. doi: 10.1155/2013/241763.
28. Kryczek, I., Liu, S., Roh, M., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Banerjee, M., Mao, Y.,Kotarski, J., Wicha, M.S., Liu, R., Zou, W.. *Expression of aldehydedehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells*. Int. J. Cancer 2012;130:29–39.
29. Duester G, Mic FA, Molotkov A. *Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue specific metabolism to retinoic acid.* Chem Biol Interact 2003;143–4:201–10.
30. Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. *From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway*. Cell Mol Life Sci 2010;67:1423–45.
31. Moreb JS, Maccow C, Schweder M, Hecomovich J. *Expression of antisense RNA to aldehyde dehydrogenase class-1 sensitizes tumor cells to 4-hydroperoxycyclophosphamide in vitro.* J Pharmacol Exp Ther 2000;293:390–6.
32. Petrie, K., Zelent, A., Waxman, S. *Differentiation therapy of acute myeloidleukemia: past, present and future*. Curr. Opin. Hematol. 2009;16:84–91.
33. Moreb, J.S., Gabr, A., Vartikar, G.R., Gowda, S., Zucali, J.R., Mohuczy, D. *Retinoic acid downregulates aldehyde dehydrogenase and increasescytotoxicity of 4-hydroperoxycyclophosphamide and acetaldehyde*. J.Pharmacol. Exp. Ther. 2005;312:339–345.
34. Elizondo, G., Medina-Diaz, I.M., Cruz, R., Gonzalez, F.J., Vega, L., 2009. *Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBP beta interaction.* Biochem. Pharmacol. 2009;77:248–257.
35. Sutherland RM, Eddy HA, Bareham B, Reich K, Vanantwerp D. *Resistance to adriamycin in multicellular spheroids*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1979;5:1225–1230.
36. Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW, Frei E 3rd. *Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo*. Science 1990;247:1457-61.
37. Di Paolo A, Bocci G. *Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification*. Curr Oncol Rep. 2007;9:109-114.
38. Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan By, Gasson JC, Chang DD. *Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells*. Cancer Res 2000;60:6744-6749.
39. Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Y. Boucher Y, R. K. Jain RK. Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. Biophysical Journal 2002;83:1650–1660.

40. Brown E, McKee T, diTomaso E et al. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumorsin vivo using secondharmonic generation. Nature Medicine 2003;9:796–800.
41. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, et al. *Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo*. Nat Med 1999;5:662-668.
42. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T and Morin PJ. *Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells*. Cancer Cell 2003;3:377-386.
43. Işeri OD, Kars MD, Arpaci F and Gündüz U. *Gene expression analysis of drug-resistant MCF-7 cells: implications for relation to extracellular matrix proteins*. Cancer Chemother Pharmacol 2010;65:447-455.
44. C. Ma, Y. Rong, D. R. Radiloff et al., *Extracellular matrix protein βig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation.* Genes&Development, 2008;22:308–321.
45. Yamano Y, Uzawa K, Saito K, Nakashima D, Kasamatsu A, Koike H , et al: *Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Cancer 2010:126:437-449.
46. Seya T, Tanaka N, Shinji S, Yokoi K, Koizumi M, Teranishi N, Yamashita K, Tajiri T, Ishiwata T and Naito Z: *Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis*. Oncol Rep 2006;16:1225-1230.
47. Sofeu Feugaing DD, Götte M and Viola M: *More than matrix:the multifaceted role of decorin in cancer*. Eur J Cell Biol 2013;92:1-11.
48. X iao ZM, Wang XY and Wang AM: *Periostin induces chemoresistance in colon cancer cells through activation of the PI3K/Akt/ survivin pathway*. Biotechnol Appl Biochem. 2015;62(3):401-6.
49. Karsenty G, Park RW. *Regulation of type I collagen genes expression*. Int Rev Immunol. 1995;12:177-185.
50. Mienaltowski MJ, Birk DE. *Structure, physiology, and biochemistry of collagens*. Adv Exp Med Biol. 2014;802:5-29.
51. Yasui W, Oue N, Ito R, et al. *Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications.* Cancer Sci. 2004;95:385-92.
52. Zhu XL, Ai ZH, Wang J, et al. *Weighted gene co-expression network analysis in identification of endometrial cancer prognosis markers*. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13:4607-4611.
53. Xiong G, Deng L, Zhu J, et al. *Prolyl-4-hydroxylase α subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition*. BMC Cancer. 2014;14:1.
54. Helleman J, Jansen MP, Span PN, et al. *Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer*. Int J Cancer. 2006;118:1963-1971.
55. Huebner K, Cannizzaro LA, Jabs EW, et al. *Chromosomal assignment of a gene encoding a new collagen type (COL15A1) to 9q21 --> q22*. Genomics. 1992;14:220–224.
56. Harris A, Harris H, Hollingsworth MA. *Complete suppression of tumor formation by high levels of basement membrane collagen*. Mol Cancer Res. 2007;5:1241-1245.
57. Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. *Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology*. J Biol. Chem. 2005;280:4005–4008.
58. Parikka M, Kainulainen T, Tasanen K, et al. *Alterations of collagen XVII expression during transformation of oral epithelium to dysplasia and carcinoma.* J Histochem Cytochem. 2003;51:921-929.
59. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, et al. *Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression*. BMC Med. 2008;6:11.

60. 1. Herrmann M, Winkler T, Gaipl U, Lorenz H, Geiler T, Kalden JR (2000) *Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Int Arch Allergy Immunol 123:28–35.
61. Nel AE.*T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse*. Clin Immunol. 2002;109:758–770.
62. Tsokos GC, Liossis SN (1999) *Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death*. Immunol Today 20:119–124.
63. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M (1990) Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 33:1665–1673.
64. Krishnan S, Warke VG, Nambiar MP, Tsokos GC, Farber DL. The FcR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells. J Immunol 2003;170:4189–95.
65. Fuks F, BurgersWA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. Nat Genet 2000;20:88–91.
66. Januchowski R, Prokop J, Jagodzinski PP. Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. JAppl Genet 2004;45:237–48.
67. Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, Amento EP, Chrisp CE,Yung RL, et al. *Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice*. J Clin Invest 1993;92:38–53.
68. Nambiar MP,Warke VG, Fisher CU, Tsokos G. *Effect of trichostatin A on human T cells resembles signaling abnormalities in T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a new mechanism for TCR zeta chain deficiency and abnormal signaling*. J Cell Biochem 2002;85:459–69.
69. Nambiar MP, Mitchell JP, Ceruti RP, Malloy MA, Tsokos GC. *Prevalence of T cell receptor zeta chain deficiency in systemic lupus erythematosus*. Lupus 2003;12:46–51.
70. J. Ross, *Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes*, Trends Genet. 1996;12:171–175.
71. Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. *Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse*. J Clin Invest 2003;111:539–52.
72. Moreira JM, Scheipers P, Sorensen P. *The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+T cell responses*. BMC Cancer 2003;3:30.
73. Murdoch C, Finn A. *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood. 2000;95:3032–3043.
74. Hornung D, Bentzien F, Wallwiener D, Kiesel L, Taylor RN. *Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid*. Mol Hum Reprod. 2001;7:163–168.
75. Filippatos G, Parissis JT, Adamopoulos S, Kardaras F. *Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications*. Curr Mol Med. 2003;3:139–147.
76. Carreau S, Lambard S, et al.*Aromatase expression and role of estrogens in male gonad.* Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:35–41.
77. Robertson KM, O'Donnell L, et al. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. Proc Natl Acad Sci US4A. 1999;96:7986–7991.
78. M. Maliepaard, M. A. Van Gastelen, L. A. De Jong et al., "Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecanselected ovarian tumor cell line," Cancer Research, 1999;59:4559–4563.
79. Berger W, Elbling L, Micksche M. *Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-team exposure to antineoplastic drugs*. Int J Cancer. 2000;88:293–300.

80. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins introduction. Pflugers Arch 2004;447:465–8.
81. Ying H, Wolfgang S. *Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells*. Cancer Lett 2006;239:168–82.
82. Nakanishi T. *Drug transporters as targets for cancer chemotherapy*. Cancer Genomics Proteomics 2007;4:241–54.
83. Uchino H, Kanai Y, Do K, et al. *Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition.* Mol Pharmacol 2002;61:729–37.
84. Gorlick R, Go¨ ker E, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, et al. *Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression.* Blood 1997;89:1013.
85. Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. *Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem1995;270:17468–75.
86. Januchowski R, Zawierucha P, Andrzejewska M, Ruciński M, Zabel M. *Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines.* Biomed Pharmacother. 2013 Apr;67(3):240-5.
87. Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Robinson IB. *Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family*. Mol Cell Biol 1989;9(9): 3808–20.
88. Arai Y, Masuda M, Sugawara I, Arai T, Motoji T, Tsuruo T, et al. *Expression of the MDR1 and MDR3 gene products in acute and chronic leukemias.* Leuk Res 1997;21(4):313–9.
89. Kedersha NL, Rome LH: *Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA*. J Cell Biol 1986;103,699–709.
90. Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH: *The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase.* J Cell Biol 1999;146: 917–928.
91. Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH: Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. J Biol Chem 1999;274:32712–32717.
92. Szaflarski W, Nowicki M, Zabel M. *The structure of cellular vaults, their role in the normal cell and in the multidrug resistance of cancer*. Postepy Biochem. 2011;57(3):266-73.
93. Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Cianfriglia M, Arancia G, Molinari A. *Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells*. Histochem J. 2000;32(10):599-606.
94. Bhatia P, Bernier M, Sanghvi M, Moaddel R, Schwarting R, Ramamoorthy A, Wainer IW. *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localises to the nucleus in glioblastoma multiforme cells*. Xenobiotica. 2012;42(8):748-55.
95.Babakhanian K, Bendayan M, Bendayan R. *Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Sep 21;361(2):301-6.
96. Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Shikita T, Zini N, Ognibene A, et al. *Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution*. Eur J Cell Biol 1995;68:226–39.
97. K. Wojtowicz, W. Szaflarski, R. Januchowski, P. Zawierucha, M. Nowicki, M. Zabel, *Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P*. Acta Biochim. Pol. 2012;59(4):445–450.
98. A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, P. Crateri, L. Toccacieli, M. Marra, M. Colone, M. Cianfriglia, G. Arancia, *Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells*, Curr. Protein Pept. Sci. 2002;3(6):653–670.

99. L.M. Greenberger, S.S. Williams, E. Georges, V. Ling, S.B. Horwitz, Electrophoretic analysis of P-glycoproteins produced by mouse J774.2 and Chinese hamster ovary multidrug-resistant cells, J. Natl. Cancer Inst. 1988;80:506–510.
100. K. Mohrmann, et al., *Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*, Cancer Chemother. Pharmacol. 2005;56:344–350.
101. N.K. Diop, C.A. Hrycyna, *N-linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane*, Biochemistry. 2005;44:5420–5429.
102. G.S. Jacob, Glycosylation inhibitors in biology and medicine, Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5(5):605–611.
103. Oda K, Fujiwara T and Ikehara Y: *Brefeldin A arrests the intracellular transport of viral envelope proteins in primary cultured rat hepatocytes and HepG2 cells*. Biochem J. 1990;265:161-167.
104. Pili R, Chang J, Partis RA, Mueller RA, Chrest FJ and Passaniti A: *The α-glucosidase I inhibitor castanospermine alters endothelial cell glycosylation, prevents angiogenesis, and inhibits tumor growth*. Cancer Res. 1995;55:2920-2926.