

autoreferat

(załącznik 4a)

dr Patrycja Przygodzka

**Instytut Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk**

Łódź, 2023

1. Imię i nazwisko **Patrycja Przygodzka**
Nazwisko panieńskie **Barańska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2005 doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej	Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytet Medyczny w Łodzi Tytuł rozprawy: „ <i>Udział czynnika wzrostu VEGF we wczesnych etapach zmian proangiogennych w komórkach śródbłónka.</i> ” Promotor: prof. dr hab. Zofia Pawłowska
2001 magister biologii specjalność: biofizyka	Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Łódzki Tytuł pracy magisterskiej: „ <i>Wpływ promieniowania laserowego niskiej mocy na żywotność oraz stan oksydoredukcyjny fibroblastów (linia CHO K1) – dawki ciągle i frakcjonowane.</i> ” Promotor: prof. dr hab. Maria Bryszewska

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2007/07/01 - obecnie	Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi adiunkt
2020/04	Centralny Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Laboratorium Wirusów Oddechowych diagnostyka SARS-CoV-2
2005/09/01 - 2007/07/01	Katedra Biochemii Medycznej i Biofizyki Uniwersytet w Umeå, Szwecja staż podoktorski
2004/11/01 - 2005/09/01	Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi asystent naukowy
2001 - 2005	słuchacz Stacjonarnego Studium Doktorskiego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Identyfikacja nowych czynników molekularnych regulujących zmiany prowadzące do wzrostu inwazyjności komórek raka jelita grubego.”

Osiągnięciem jest cykl pięciu publikacji naukowych związanych tematycznie, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia:

Wszystkie poniżej wymienione prace zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora.

1.		
Autorzy <i>*autor korespondujący</i>		Przygodzka Patrycja*, Papiewska-Pajak Izabela, Bogusz Helena, Kryczka Jakub, Sobierajska Katarzyna, Kowalska M. Anna., Boncela Joanna
Tytuł		Neuromedin U is upregulated by Snail at early stages of EMT in HT29 colon cancer cells.
Czasopismo, wydawca, nr tomu/zeszytu, strony/nr artykułu		Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects Elsevier B.V.; Nov;1860(11 Pt A):2445-2453
Rok i typ publikacji	2016	praca oryginalna
Punktacja z roku publikacji	IF = 4,702	MNiSW = 35
DOI	10.1016/j.bbagen.2016.07.012	
cytowania wg Web of Science (core collection)		21
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:		
- sformułowaniu hipotezy badawczej, że neromedyna U jest zaangażowana w proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek raka jelita grubego - zaplanowaniu prac eksperymentalnych - wiodącym udziale w pracy doświadczalnej: udział w przygotowaniu modelu komórkowego, klonów komórek HT29 ze stabilną nadekspresją Snail i ich charakterystyce (barwienie immunofluorescencyjne, mikroskopia konfokalna, funkcjonalne testy komórkowe: test tworzenia kolonii, test wzrostu na podłożu nieadherentnym), badania dotyczące neuromedyny U (analizy ekspresji genów real time-PCR i białka, test ELISA) - zebraniu i przygotowaniu materiału do analizy transkryptomicznej, podsumowaniu i opracowaniu jej wyników - wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji artykułu, dominującym udziale w jego redakcji oraz wiodącym udziale w dyskusji z recenzentami jako autor korespondujący.		

2.		
Autorzy <i>*autor korespondujący</i>		Przygodzka Patrycja*, Papiewska-Pajak Izabela, Bogusz-Koziarska Helena, Sochacka Ewelina, Boncela Joanna, Kowalska M. Anna
Tytuł		Regulation of miRNAs by Snail during epithelial-to-mesenchymal transition in HT29 colon cancer cells.
Czasopismo, wydawca, nr tomu/zeszytu, strony/nr artykułu		Scientific Reports Springer Nature; Feb 15;9(1):2165
Rok i typ publikacji	2019	praca oryginalna
Punktacja z roku publikacji	IF = 3,998	MNiSW = 140
DOI	10.1038/s41598-019-39200-7	
cytowania wg Web of Science (core collection)		20
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:		
• postawieniu hipotezy, że poziom ekspresji Snail w komórkach raka jelita grubego może zmieniać zawartość mikroRNA w mikropęcherzykach wydzielanych z tych komórek • udziale w przygotowaniu klonów komórek linii HT29 ze stabilną nadekspresją Snail • opracowaniu metody izolacji mikroRNA oraz przygotowaniu prób do analizy transkryptomicznej, podsumowaniu i analizie otrzymanych wyników • zaplanowaniu eksperymentów wyjaśniających związek pomiędzy poziomem ekspresji Snail a miR-192/194, w tym opracowanie metody i przeprowadzenie immunoprecypitacji chromatyny • wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji artykułu, dominującym udziale w jego redakcji oraz dyskusji z recenzentami jako autor korespondujący.		

3.		
Autorzy <i>*autor korespondujący</i>	Przygodzka Patrycja*, Soboska Kamila, Sochacka Ewelina, Boncela Joanna	
Tytuł	Neuromedin U: A Small Peptide in the Big World of Cancer.	
Czasopismo, wydawca, nr tomu/zeszytu, strony/nr artykułu	Cancers MDPI; 2019, 11, 1312	
Rok i typ publikacji	2019	praca przeglądowa
Punktacja z roku publikacji	IF = 6,126	MNiSW = 140
DOI	10.3390/cancers11091312	
cytowania wg Web of Science (core collection)		14
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:		
- wyborze tematu pracy przeglądowej i wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji artykułu - wykonaniu analizy literatury związanej z tematyką pracy, analizie baz danych dotyczących regulacji ekspresji genu kodującego neuromedynę U (NMU) w komórkach - udziale w redakcji manuskryptu.		

4.		
Autorzy <i>*autor korespondujący</i>		Przygodzka Patrycja*, Sochacka Ewelina, Soboska Kamila, Pacholczyk Marcin, Papiewska-Pajak Izabela, Przygodzki Tomasz, Płociński Przemysław, Ballet Steven, De Prins An, Boncela Joanna
Tytuł		Neuromedin U induces an invasive phenotype in CRC cells expressing the NMUR2 receptor.
Czasopismo, wydawca, nr tomu/zeszytu, strony/nr artykułu		Journal of Experimental & Clinical Cancer Research BMC; Sep 7;40(1):283
Rok i typ publikacji	2021	praca oryginalna
Punktacja z roku publikacji	IF = 12,658	MNiSW = 140
DOI	10.1186/s13046-021-02073-8	
cytowania wg Web of Science (core collection)		1
Moim wkładem w powstanie tej pracy, wykonanej w ramach kierowanego przeze mnie projektu Sonata Bis 6, było:		
- sformułowanie hipotezy badawczej, zdefiniowanie zadań badawczych i ich podział pomiędzy wykonawców - dobór metodyki i opracowanie protokołów badawczych - wiodącej roli w opracowaniu koncepcji artykułu, dominującym udziale w jego redakcji oraz dyskusji z recenzentami jako autor korespondujący.		
Mój wkład w uzyskanie wyników zaprezentowanych w tej pracy polegał na:		
- interpretacji i podsumowaniu analiz baz danych pod względem ekspresji genów - wyborze panelu komórkowego do badań - zaplanowaniu i analizie ekspresji genów (PCR w czasie rzeczywistym) - zaplanowaniu i analizie szlaku aktywacji mobilizacji wapnia w komórce - analizie poziomu ekspresji genów receptorów integrynowych (cytometria przepływowa).		

5.		
Autorzy <i>*autor korespondujący</i>	Przygodzka Patrycja*, Soboska Kamila, Sochacka Ewelina, Pacholczyk Marcin, Braun Marcin, Kassassir Hassan, Papiewska-Pajak Izabela, Kielbik Michał, Boncela Joanna	
Tytuł	Neuromedin U secreted by colorectal cancer cells promotes a tumour-supporting microenvironment.	
Czasopismo, wydawca, nr tomu/zeszytu, strony/nr artykułu	Cell Communication and Signaling BMC; (2022) 20:193	
Rok i typ publikacji	2022	praca oryginalna
Punktacja z roku publikacji	IF = 7,54	MNiSW = 140
DOI	10.1186/s12964-022-01003-1	
cytowania wg Web of Science (core collection)	0	
Moim wkładem w powstanie tej pracy, wykonanej w ramach kierowanego przeze mnie projektu Sonata Bis 6, było:		
- sformułowanie hipotezy badawczej, zdefiniowanie zadań badawczych i ich podział pomiędzy wykonawców - dobór metodyki i opracowanie protokołów badawczych		

- wiodącej roli w opracowaniu koncepcji artykułu, dominującym udziale w jego redakcji oraz dyskusji z recenzentami jako autor korespondujący.

Mój wkład w uzyskanie wyników zaprezentowanych w tej pracy polegał na:

- wykonaniu barwienia immunohistochemicznego preparatów tkankowych
- interpretacji i podsumowaniu wyników analiz baz danych pod względem ekspresji genów
- wyborze modeli komórkowych do badań
- zaplanowaniu i analizie ekspresji genów (PCR w czasie rzeczywistym)
- obrazowaniu komórek z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej

Dane naukometryczne dotyczące osiągnięcia

(dane z roku publikacji artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego)

Łączny IF	35,024
Łączna punktacja KBN/MNiSW/MEiN	595
Łączna liczba cytowań (ISI Web of Science Core Collection)	57

c) Omówienie osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

Jelito grube, ostatni odcinek układu pokarmowego człowieka składa się z jelita ślepego (kątnicy), okrężnicy oraz odbytnicy zakończonej odbytem. Rak jelita grubego (RJG, *ang. colorectal carcinoma – CRC*) jest zmianą patologiczną wywodzącą się najczęściej z łagodnych zmian o charakterze polipów, rozwijających się z komórek gruczołowych nabłonka wyściełającego jelito grube. W większości przypadków choroba ma charakter sporadyczny, nieuwarunkowany genetycznie (90 – 95% wszystkich przypadków RJG diagnozowanych u pacjentów po 50 roku życia). Zmiany o podłożu dziedzicznym zaobserwowano w stosunkowo rzadko występujących: niezwiązanych z polipowością zespołach Lyncha oraz rodzinnej polipowatości gruczolakowatej [1]. Wśród wszystkich nowotworów złośliwych występujących obecnie na świecie, nowotwory jelita grubego zajmują trzecie miejsce wśród mężczyzn i drugie wśród kobiet pod względem częstości występowania. Coraz doskonalsze systemy ogólnodostępnych badań przesiewowych pozwalają na wczesne wykrycie choroby. Jednak mimo strategii prewencyjnych i wdrożenia przedoperacyjnych i pooperacyjnych terapii, od kilku lat dynamika umieralności na ten typ nowotworu na świecie charakteryzuje się wysokim wzrostem. Zdiagnozowanie choroby na wczesnym etapie jej rozwoju znacznie poprawia rokowania, a odsetek 5-letnich przeżyć pacjentów z RJG oscyluje wokół 90%. Jednak wykrycie guzów w bardziej zaawansowanym stadium, a szczególnie pojawienie się przerzutów (najczęściej do wątroby, płuc i otrzewnej) dramatycznie pogarsza prognozę i odsetek 5-letnich przeżyć pacjentów z RJG spada do około 10% [2, 3].

Ze względu na brak dobrych metod, które pozwalają na wiarygodną identyfikację stopnia inwazyjności komórek guza, podjęcie decyzji dotyczącej doboru terapii nie jest łatwe. Kluczowa jest więc identyfikacja procesów prowadzących do nabywania przez komórki nowotworowe właściwości komórek inwazyjnych. Ważne jest również rozpoznanie wczesnych markerów, których oznaczenie u

pacjentów pomógłoby lekarzom w szybkiej charakterystyce zmiany i podjęciu decyzji o wdrożeniu obciążającej terapii przed- lub pooperacyjnej. Tylko niektóre z opisanych w tym kontekście cech komórek nowotorowych mają obecnie zastosowanie jako czynniki prognostyczne przebiegu choroby, są to m.in. fenotyp MSI, mutacje *KRAS/NRAS* i *BRAF*. Mimo wielu obiecujących odkryć biomarkerów [4], których zmiany ekspresji w RJG mogłaby w przyszłości przełożyć się na działania kliniczne, badania w kierunku identyfikacji czynników prognostycznych i predykcyjnych w RJG są wciąż pożądane i intensywnie prowadzone.

RJG jest wysoce heterogenną chorobą o zróżnicowanym podłożu molekularnym, mechanizmie powstawania i rozwoju oraz fenotypie komórek wchodzących w skład guza. W celu oszacowania rokowania, doboru najbardziej skutecznej terapii, określenia prawdopodobieństwa występowania nawrotów oraz wskaźników przeżycia pacjenta, opracowane zostały liczne podtypy RJG. Obecnie stosowana klinicznie klasyfikacja TNM (ang. *tumor-node-metastasis*) ułatwia podejmowanie decyzji terapeutycznych, ale nadal nie jest doskonała i podlega ciągłym korektom [5]. Jedną z najnowszych klasyfikacji RJG uwzględniającą zarówno obserwacje kliniczne choroby, jak i cechy molekularne komórek nowotworowych jest klasyfikacja molekularna CMS (ang. *consensus molecular subtypes*). W jej obrębie wyróżnia się cztery podtypy RJG: immunologiczny (CMS1), kanoniczny (CMS2), metaboliczny (CMS3) oraz mezenchymalny (CMS4) [6]. Do pierwszej grupy (CMS1) przypisano nowotwory o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej, z wysokim poziomem hypermetylacji wysp CpG oraz mutacją *BRAF*. Guzy te charakteryzuje wysoka ekspresja genów świadczących o obecności komórek odpornościowych w mikrośrodkowisku nowotworu, a czas przeżycia pacjentów jest krótszy po nawrocie choroby. Podtyp CMS2 wiąże się z dużą częstością występowania niestabilności chromosomalnej oraz aktywacją szlaków Wnt i Myc. Grupę CMS3 stanowią nowotwory z niską częstością występowania niestabilności chromosomalnej, ale najwyższą częstością występowania mutacji genu *KRAS*. Nowotwory tego typu charakteryzują zaburzenia metabolizmu m.in. glutaminy lub/i kwasów tłuszczowych. CMS4, ostatni z wyróżnionych podtypów cechuje aktywacja szlaku TGF- β , intensywny proces angiogenezy i nasilone procesy zapalne. Nowotwory te cechuje krótszy czas całkowitego przeżycia [6, 7]. Zastosowana klasyfikacja coraz bardziej zbliża do wyróżnienia najważniejszych cech RJG danego podtypu, jednak nie jest jeszcze stosowana klinicznie i jej użyteczność jest nadal analizowana [8].

Badania progresji nowotworowej, która tak istotnie obniża przeżywalność pacjentów, doprowadziły do przełomowego odkrycia udziału zjawiska przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*) w procesie tworzenia inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych. EMT to odwracalny proces zachodzący w warunkach fizjologicznych m.in. podczas rozwoju embrionalnego i modelowania tkanek [9, 10], który został zaadoptowany przez komórki nowotworowe i umożliwia im inwazję [11]. Zmiany zachodzące na poziomie ekspresji genów powodują, że dobrze spolaryzowane, silnie przylegające do siebie komórki nabłonka tracą polaryzację i rozluźniają połączenia międzykomórkowe, zyskując wydłużony kształt komórek mezenchymalnych o

podwyższonej mobilności i zdolności do migracji. Proces ten jest inicjowany i kontrolowany przez szereg czynników transkrypcyjnych, m.in. Snail, Twist i czynniki z rodziny Zeb. Zmiany morfologiczne i funkcjonalne komórek są związane z zahamowaniem produkcji markerów nabłonka (m.in. kadheryny E, kładyn, okładyn) i pojawieniem się lub wzrostem ekspresji markerów komórek mezenchymalnych (m.in. wimentyny, fibronektyny, kadheryny N). Początkowo EMT rozumiano jako proces jednoetapowej zmiany fenotypu z nabłonkowego na mezenchymalny. Dopiero wyniki kolejnych badań (w tym omówionych w ramach osiągnięcia) zweryfikowały ten pogląd. Obecnie wiadomo, że proces EMT w komórkach nowotworowych to zmiana fenotypu, która następuje poprzez szereg odwracalnych stanów przejściowych, co pozwala komórkom nowotworowym łatwo dostosować się do szybko zmieniających się warunków w mikrośrodku guza. Tę zdolność komórek nowotworowych do adaptacji nazwano plastycznością nabłonkowo-mezenchymalną (EMP, ang. *epithelial-mesenchymal plasticity*) [12], a procesy z nią związane, jak EMT i towarzyszący mu odwrotny, MET (ang. *mesenchymal-epithelial transition*) zaczęto badać pod kątem wykorzystania ich jako celów terapeutycznych. Stanowiło to impuls do poszukiwania uniwersalnych biomarkerów (m.in. białek, RNA, mikroRNA) rosnącego potencjału metastatycznego komórek RJG oraz samego procesu EMT [12]. Połączenie klasycznej terapii przeciwnowotworowej z czynnikami zakłócającymi plastyczność komórek stwarza nadzieję na znaczące obniżenie ryzyka nawrotów choroby i jej progresji.

Po wielu latach badań nad plastycznością nabłonkowo-mezenchymalną komórek nowotworowych, oczywistym stało się jednak, że progresję nowotworową należy rozpatrywać w całym, złożonym mikrośrodku nowotworu (ang. *TME, tumour microenvironment*). A więc nie tylko obserwując zmiany samych komórek nowotworowych, które stanowiły do pewnego czasu główny materiał badawczy, ale badając odpowiedź i wzajemną relację innych składników mikrośrodka guza. Środowisko w jakim dochodzi do powstania i rozwoju zmiany nowotworowej jest układem, na który składają się głównie macierz zewnątrzkomórkowa, fibroblasty, komórki układu odpornościowego oraz komórki śródbłonka mikronaczyn krwionośnych i limfatycznych występujących w bezpośrednim sąsiedztwie guza [13]. Analiza procesów zachodzących w tym skomplikowanym mikrośrodku stanowi w ostatnim czasie główny nurt badań w kontekście chorób nowotworowych, w tym RJG.

Wyniki zaprezentowane w przedstawionym do oceny cyklu publikacji wpisały się w główne ścieżki badawcze dotyczące raka jelita grubego. Poniżej zostały omówione w ramach dwóch głównych zagadnień.

Charakterystyka zmian transkryptomicznych i funkcjonalnych zachodzących w komórkach linii raka jelita grubego we wczesnych etapach procesu EMT

(publikacja nr 1)

Badania zrealizowane zostały w ramach projektu Maestro, w który zostałam zaangażowana w roku 2012. Głównym celem projektu była detekcja zmian wywołanych w komórkach RJG w wyniku nadekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny Snail. Białko Snail to znany już wtedy,

molekulamy „włącznik” procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego zachodzącego m.in. w komórkach nowotworowych RJG, a prowadzącego do wzrostu ich inwazyjności. Jako model badawczy zastosowano komórki RJG linii HT29 ze stabilną nadekspresją *Snail*. Linia HT29 jest linią o fenotypie nabłonkowym, którą charakteryzuje niski endogenny poziom ekspresji *Snail* i małe zdolności inwazyjne. Klony komórek o różnym stopniu nadekspresji (HT29-Snail) oraz komórki transfekowane pustym wektorem (HT29-pcDNA) stosowane jako komórki kontrolne, uzyskano metodą selekcji klonalnej, tj. długotrwałej hodowli w obecności antybiotyku selekcyjnego, genetycyny. Zaobserwowano, że komórki z nadekspresją *Snail* zyskały cechy komórek mezenchymalnych: wydłużony kształt, rozproszony charakter kolonii, obniżoną ekspresję markerów komórek epithelialnych (kadheryna E i kładyna 1) i wzrost ekspresji genu kodującego wimentynę, marker komórek mezenchymalnych. Obserwacje proliferacji, adhezji i migracji klonów pozwoliły na stwierdzenie, że nadekspresja *Snail* uruchamia w komórkach RJG proces przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Charakterystyka uzyskanych klonów potwierdziła użyteczność przygotowanego modelu badawczego do analizy zmian w funkcjonowaniu komórek RJG na wczesnych etapach procesu EMT. Z wybranych i scharakteryzowanych klonów komórek HT29 wyizolowano całkowite RNA i poddano je analizie transkryptomowej z wykorzystaniem mikromacierzy. Zidentyfikowane zmiany ekspresji genów pod wpływem nadekspresji *Snail* przeanalizowano za pomocą oprogramowania Ingenuity Pathway Analysis (IPA), które pozwala przewidywać wpływ zaobserwowanych zmian na poziomie transkryptomu na procesy zachodzące w komórkach. **W ten sposób zidentyfikowano grupę 541 genów, których ekspresja obniżyła się (340 genów) lub podwyższyła (201 genów) w wyniku nadekspresji *Snail*.** Analiza IPA pozwoliła stwierdzić, że zarejestrowane zmiany w poziomie ekspresji genów są bezpośrednio związane z nasileniem mobilności komórek nowotworowych, co zaobserwowaliśmy eksperymentalnie oraz z regulacją ich przeżywalności. Globalny obraz zmian w transkryptomie oraz funkcjonowaniu klonów wskazywał jednak, że nadekspresja *Snail* nie indukuje definitywnej zmiany fenotypu komórek RJG na mezenchymalny, ale rozpoczyna ten proces, wprowadzając komórki w stan fenotypu przejściowego (ang. *intermediate epithelial state*). Klony komórek RJG pod wpływem nadekspresji *Snail* zyskały część markerów mezenchymalnych i stały się bardziej ruchliwe, a więc zdolne do inwazji. Nie obniżyły jednak tempa proliferacji, co jest cechą komórek w EMT oraz nie straciły wszystkich cech komórek nabłonkowych. Nasze obserwacje komórek RJG potwierdziły, nieliczne wtedy doniesienia, że **proces EMT powinien być postrzegany jako spektrum stanów przejściowych pomiędzy fenotypami, a więc celem terapeutycznym nie mogą być komórki danego fenotypu, ale mechanizmy wyzwalające plastyczność komórek nowotworowych.** Stopień zróżnicowania poszczególnych komórek RJG w pojedynczym guzie nowotworowym jest jednym z głównych powodów progresji choroby mimo stosowanej terapii.

W kolejnym etapie, w poszukiwaniu nowych markerów indukcji EMT w komórkach RJG, zwrócono szczególną uwagę na geny, których ekspresja wzrosła najbardziej w badanym układzie. Oprócz opisanych wcześniej m.in. genów kodujących fibronektynę (*FNI*) czy tenascynę C (*TNC*), związanych

już wcześniej z EMT, zidentyfikowano wiele takich, których znaczenie w tym procesie nie było odkryte, jak całej grupy glikoprotein, czy kolagenów.

W centrum naszych zainteresowań znalazł się gen kodujący mały neuropeptyd, neuromedynę U (NMU), która dotychczas nie była opisana w kontekście RJG, a doniesienia wskazujące na jej potencjalny związek z rozwojem innych typów nowotworów były nieliczne i bardzo ogólne. Wiedza na temat ekspresji *NMU*, obróbki i wydzielania białka z komórek okazała się ograniczona. Dodatkowo jej działanie poprzez receptory NMUR1 i NMUR2 poza układem nerwowym, było trudne do zbadania, głównie z uwagi na niski poziom endogennej ekspresji genów dla receptorów oraz brak różnicujących przeciwciał. W ten sposób nasze badania nad rolą NMU w progresji RJG ujawniły konieczność i potrzebę przeprowadzenia badań podstawowych dotyczących neuromedyny U. Na początku **potwierdziliśmy podwyższoną ekspresję *NMU* w komórkach HT29, zależną od poziomu ekspresji *Snail*, a zidentyfikowaną w badaniach transkryptomicznych. Wykazaliśmy również wydzielanie NMU przez komórki HT29-*Snail* do medium hodowlanego, w którym zaobserwowaliśmy też obecność mRNA kodującego NMU. Po raz pierwszy wykazaliśmy, że komórki HT29 z zaindukowanym procesem EMT oraz z podwyższoną mobilnością, produkują i wydzielają białko oraz mRNA kodujące neuromedynę U oraz wykazują ekspresję jej receptora.** Znaczenie tych zjawisk było badane w kolejnych projektach.

(publikacja nr 2)

Odkrycia związane z aktywnością regulatorową cząsteczek mikroRNA otworzyły w nauce nowy rozdział również w obszarze badań progresji nowotworowej i metastazy [14]. Dlatego kolejnym krokiem w poszukiwaniu kluczowych mechanizmów i markerów charakteryzujących komórki RJG o podwyższonej inwazyjności, towarzyszącej wczesnym etapom procesu EMT, była analiza zmian w poziomie ekspresji mikroRNA. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem opisanego powyżej modelu komórek HT29 ze stabilną nadekspresją *Snail*, a analizę mikroRNA przeprowadzono z użyciem mikromacierzy *miRCURY LNA™ microRNA Array 7th Gen* (Exiqon), które zawierały sondy komplementarne do ludzkich, mysich, szczurzych i wirusowych mikroRNA oraz małych jąderkowych RNA zawierających motyw C/D box (SNORDs) zarejestrowanych w bazie *miRBase 18.0*.

Zaobserwowaliśmy, że aktywacja EMT wywołana nadekspresją *Snail* w komórkach RJG nie wpływa na zdolność komórek do produkcji mikroRNA i nie zaburza ekspresji genów kodujących dwa główne enzymy zaangażowane w ten proces, Dicer i Drosha. Znacząco zmieniły się jednak proporcje pomiędzy poszczególnymi typami produkowanych cząsteczek, a zmiany te były zależne od stopnia nadekspresji *Snail* w komórkach. Spośród kilkudziesięciu zidentyfikowanych różnicujących mikroRNA, największe zmiany zaobserwowano w obecności miR-205, let-7i i SNORD13, których ekspresja wzrosła w komórkach o podwyższonej inwazyjności oraz miR-192 i miR-194, których ekspresja uległa obniżeniu w takich komórkach. Wzrost ekspresji miR-205 i let-7i, został potwierdzony metodą real-time PCR, co pozwoliło nam zabrać

głos w dyskusji dotyczącej funkcji tych cząsteczek w progresji RJG. Są to bowiem cząsteczki zaliczane do supresorów lub aktywatorów rozwoju choroby zależnie od typu nowotworu [15-17]. My wykazaliśmy ich potencjalny udział w procesach prowadzących do wzrostu inwazyjności komórek raka jelita grubego. Interesującą obserwacją z perspektywy czasu był też wzrost poziomu ekspresji SNORD13 w klonach HT29-Snail. Nie podjęliśmy się wówczas analizy funkcji SNORD13 w EMT, ale późniejsze badania roli małych jąderkowych RNA w metastazie [18] mogłaby skłonić do powrotu do tego tematu.

Czynnik transkrypcyjny Snail, zastosowany w naszym modelu badawczym jest opisanym represorem transkrypcji. Zadaliśmy pytanie, czy podwyższona obecność Snail w komórkach HT29 wpływa bezpośrednio na zaobserwowane obniżenie ekspresji miR-192 i miR-194. Cząsteczki te zostały wcześniej zaliczone do grupy mikroRNA hamujących rozwój guza. Postawioną hipotezę potwierdziliśmy poprzez wyciszenie ekspresji *Snail*, które podwyższyło poziom miR-192 i miR-194 w komórkach RJG. Dodatkowo na drodze immunoprecypitacji chromatyny, wykazaliśmy wiązanie czynnika Snail do sekwencji promotorowej prekursora pri-miR-192/194. **W ten sposób po raz pierwszy powiązaliśmy nadekspresję Snail z obniżeniem poziomu ekspresji mikroRNA hamujących rozwój guza w komórkach RJG, które może wynikać m.in. z bezpośredniego wiązania Snail do promotora mikroRNA.**

Wyniki analizy transkryptomicznej i mikroRNA w komórkach w początkowej fazie procesu EMT dostarczyły nam bardzo dużo danych. Z uwagi na charakter badań, **głównym osiągnięciem pracy jest więc lista różnicujących mikroRNA i ich korelacja ze zmianami zidentyfikowanymi w transkryptomie komórek.** Potwierdziła ona spójność otrzymanych wyników i pozwoliła wskazać nie tylko zmiany w poziomie produkowanych mikroRNA, ale również pośrednio pokazać efekt ich aktywności regulatorowej, w postaci zmian ekspresji genów docelowych.

Aby dopełnić charakterystykę modelu komórek RJG na wczesnym etapie EMT indukowanego nadekspresją *Snail*, przeprowadzono sekwencjonowanie (ang. *NGS*, *next generation sequencing*) zawartości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych z komórek HT29-Snail w porównaniu do komórek kontrolnych. Pełny raport z tych analiz został opublikowany w pracy spoza osiągnięcia, ale w omawianej pracy pokazaliśmy, że **poziom mikroRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych odzwierciedla zmiany zarejestrowane w komórkach.** Komórki mogą więc komunikować się z mikrośrodowiskiem za pomocą mikroRNA pakowanych do pęcherzyków.

Wyniki zawarte w publikacjach omówionych w tej części stały się inspiracją wielu kolejnych projektów badawczych, poświęconych pojedynczym obserwacjom, takim jak zmiany w poziomach glikoprotein, kolagenów czy neuromedyny U w komórkach RJG o podwyższonej inwazyjności w wyniku przebiegu EMT.

Charakterystyka funkcji neuromedyny U w mikrośrodkowisku raka jelita grubego.*(publikacja nr 3)*

Po zakończeniu badań dotyczących mikroRNA wróciłam do zagadnień związanych z analizą transkryptomu w komórkach raka jelita grubego z zaindukowanym procesem EMT. Temat znaczenia i udziału neuromedyny U (NMU) w procesie progresji RJG okazał się bardzo interesujący. Wyniki badań wstępnych pomogły w przygotowaniu własnego projektu badawczego Sonata Bis 6 (NCN) pt. „Neuromedyna U jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita grubego i odczynu”, który otrzymał pozytywną decyzję w sprawie finansowania i w ramach którego, kontynuowałam badania. Z uwagi na coraz liczniejsze doniesienia wskazujące na udział neuromedyny U w procesach związanych z progresją nowotworową, analiza dostępnej literatury pozwoliła na opracowanie artykułu przeglądowego przedstawionego do oceny. W pracy tej zebrano dostępną wtedy wiedzę na temat ekspresji NMU, syntezy, wydzielania i obróbki różnych form peptydu oraz rodzajów, dystrybucji i funkcji klasycznych (NMUR1, NMUR2) i alternatywnych (NTSR1/GHSR1b) receptorów dla NMU, które należą do rodziny receptorów związanych z białkiem G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*). Neuromedyna U jest konserwatywnym peptydem, którego różnej długości izoformy spotykane są w wielu organizmach. U człowieka jest to dwudziestopięć-aminokwasowy peptyd ze wspólną dla wszystkich organizmów sekwencją ostatnich pięciu aminokwasów amidowanego C-końca (-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-NH₂) determinującą aktywność peptydu. Mechanizmy działania NMU były badane głównie w układzie nerwowym, ale wszystkie ówczesne doniesienia były pozbawione podstawowych informacji m.in. na temat wielostopniowej regulacji produkcji peptydu, co podkreśliśmy w naszej pracy. Główną i najbardziej interesującą część publikacji stanowi **szczegółowe podsumowanie doniesień dotyczących ekspresji genu NMU, jej receptorów oraz jej działania w chorobach nowotworowych**. Prace podejmujące tą tematykę skupiały się jednak na oznaczeniu poziomu ekspresji genów i wydzielonej NMU z komórek. Brakowało informacji na temat formy i aktywności peptydu oraz zdolności komórek do odpowiedzi na działanie NMU. Zauważyliśmy, że dane opisujące aktywację receptorów dla NMU uzyskano w większości przypadków na podstawie badań prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowych z nadekspresją tych receptorów, a więc prezentowano mechanizm działania, a nie faktyczną reaktywność receptorów obecnych na komórkach. Dodatkowo analiza literatury ujawniła prawdopodobną trudność badaczy w identyfikacji receptorów NMU na poziomie białka, co było dla nas cenną wskazówką, pomocną w realizacji projektu. W większości typów nowotworów (poza nowotworami jamy ustnej i gardła) obserwowano podwyższoną ekspresję NMU, która wiązana była jednocześnie z progresją choroby. Ekspresja genów dla receptorów NMUR1 i NMUR2 była bardzo zróżnicowana pomiędzy typami nowotworu. Rosnące zainteresowanie neuromedyną U i wciąż nowe obserwacje sugerujące istotny udział tego peptydu w progresji nowotworowej nie obejmowały jednak znaczenia NMU w raku jelita grubego.

(publikacja nr 4)

Projekt Sonata Bis 6 zakładał badanie odpowiedzi komórek nowotworowych na NMU obecne w środowisku. Podjęto się też weryfikacji hipotezy, że NMU może oddziaływać na inne, nienowotworowe komórki obecne w mikrośrodowisku guza, które charakteryzują się ekspresją receptorów dla tego białka. Prace eksperymentalne wykonane w ramach pierwszej części projektu zaowocowały czwartą publikacją przedstawioną do oceny. Z uwagi na fakt, że temat udziału NMU w raku jelita grubego nie był dotychczas podejmowany, badania rozpoczęto od analizy danych zawartych w bazie danych TCGA (*ang. The Cancer Genome Atlas*), a dotyczących poziomu ekspresji genów w ludzkich tkankach raka jelita grubego. Analizy wykonano dzięki współpracy z dr Marcinem Pacholczykiem, adiunktem w Instytucie Automatyki, Wydziału Automatyki Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej. Wykazano, że **ekspresja NMU jest istotnie podwyższona w tkance nowotworowej izolowanej nawet we wczesnych stadiach choroby w porównaniu z sąsiadującą tkanką zdrową. Dodatkowo wysoki poziom NMU w tkance guza wiąże się z nieco gorszymi rokowaniami. Ekspresja receptora NMUR1 okazała się istotnie niższa, a receptora NMUR2 - znacząco wyższa w tkance chorej niż w zdrowej tkance sąsiadującej.** Ten nieoczekiwany wynik zdeterminował kierunek kolejnych badań. Co interesujące, w tkankach o wysokiej ekspresji NMUR2 zaobserwowano niższą ekspresję markera różnicowania komórek, *CDH-1* (kadheryna E) i wyższą ekspresję *MMP-1*, jednego z mediatorów inwazyjności guza pierwotnego. **W tkankach o podwyższonym poziomie NMU i receptora NMUR2 zarejestrowano istotnie więcej przypadków inwazji perineuralnej związanej z pogorszeniem rokowania w RJG.** Ponieważ dane w bazie TCGA dotyczą całych tkanek i nie można na ich podstawie wnioskować o ekspresji NMU i jej receptorów w poszczególnych typach komórek, w kolejnych badaniach zastosowano model komórek linii raka jelita grubego.

W panelu sześciu dobrze scharakteryzowanych, ale różnych pod względem genetycznym i fenotypowym linii komórkowych RJG (Caco-2, SW480, SW620, HCT15, HCT116, and HT29) zidentyfikowano ekspresję NMU, w odróżnieniu od prawidłowej, nabłonkowej linii kontrolnej (CCD 841 CoN). Otrzymane wyniki potwierdziły zróżnicowanie wybranych linii komórkowych, które zostało odzwierciedlone w różnym poziomie ekspresji NMU, oznaczonym na poziomie mRNA i białka, jak również wydzielania peptydu. Po analizie wyników zidentyfikowaliśmy linie komórkowe o niskiej ekspresji NMU, w których czułość metody nie pozwoliła na wykrycie białka (Caco-2, HT29, SW620) oraz linie z wysoką ekspresją NMU, w których zidentyfikowano białko zarówno w lizatach komórkowych, jak i w medium pochodzonym (HCT15, HCT116, SW480). Potwierdziliśmy tym samym, że komórki te wydzielają NMU do środowiska. NMU z podłoża, w którym hodowano komórki najsilniej wydzielające ten peptyd zostało poddane analizie spektrometrycznej. **Pozwoliło to po raz pierwszy wykazać wydzielanie NMU w postaci dwóch białek prekursorowych o długościach 174-AA i 158-AA. Jest to nowa, istotna informacja ponieważ proces powstawania i obróbki NMU nie był wcześniej wyjaśniony i w szczegółach nadal pozostaje nieznany. Dodatkowo pokazaliśmy, że**

NMU stanowi ładunek wydzielanych przez komórki RJG pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, znanych z ich czynnego udziału w komunikacji międzykomórkowej m.in. w procesie progresji nowotworowej. Znaczenie tego zjawiska pozostaje na razie niezbadane.

W kolejnym kroku zadaliśmy pytanie, czy NMU wydzielone z komórek RJG może autokrynnie oddziaływać na te komórki. W celu udzielenia odpowiedzi, zbadaliśmy ekspresję genów kodujących receptory NMU w komórkach nowotworowych. W przypadku jednej z linii, HCT116, zidentyfikowaliśmy ekspresję *NMUR1*, w trzech kolejnych (Caco-2, HT29, SW480) ekspresję *NMUR2*, a w komórkach linii HCT15 nie zidentyfikowaliśmy żadnego z receptorów. Dodatkowo stwierdziliśmy że linie SW480 i SW620 są zdolne do utworzenia alternatywnego receptora dla NMU, tj. NTSR1/GHSTR1b. Ze względu na to ciekawe zróżnicowanie w ekspresji receptorów i brak informacji dotyczących sposobu regulacji ich ekspresji, postanowiliśmy przyjrzeć się bliżej temu zagadnieniu. **Wykazaliśmy, że ekspresja *NMUR1* i *NMUR2* w komórkach RJG podlega regulacji poprzez metylację DNA, co stwarza możliwość włączania i wyłączania produkcji receptorów przez komórki i ich adaptacji do warunków mikrośrodowiska.** Co ciekawe, zaobserwowano, że linie, w których wykazano ekspresję receptora dla NMU zostały zaklasyfikowane do podtypów molekularnych CMS3 i CMS4, nowotworów dających gorsze prognozy i trudnych w leczeniu.

Zebrane dane na temat ekspresji *NMU* i receptorów NMU pozwoliły sformułować hipotezę, że niektóre typy komórek RJG mogą być aktywowane przez wydzielony przez te komórki peptyd (działanie autokrynnie NMU). Prace innych autorów dotyczące aktywacji receptorów dla NMU były prowadzone na modelu komórek z egzogenną nadekspresją receptorów. **W naszych badaniach wykazaliśmy po raz pierwszy pobudzenie szlaków sygnałowych aktywowanych na drodze NMU/NMUR2, na komórkach RJG z endogennym poziomem tego receptora, rejestrując sygnał związany z mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego oraz aktywację fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2.** Aktywacja tego szlaku jest uznawana jako świadectwo aktywacji receptorów z rodziny GPCR [19]. Jednoznaczna identyfikacja aktywacji receptorów nie była możliwa poprzez działanie na komórki syntetyczną neuromedyną U (NMU-9), co spowodowane jest niską ekspresją receptorów, charakterystyczną dla receptorów z rodziny GPCR. W celu eksperymentalnego potwierdzenia działania NMU na komórki RJG konieczne okazało się zastosowanie bardziej stabilnych agonistów receptorów. Ta część badań wymagała dodatkowo analizy stabilności peptydu i zaowocowała nawiązaniem współpracy z prof. Stevenem Balletem z Vrije Universiteit Brussel z Belgii. Zespół profesora S. Balleta pomógł nam zidentyfikować problemy dotyczące aktywności NMU-9 i dostarczył dobrze scharakteryzowane peptydy, otrzymane w wyniku modyfikacji ludzkiej NMU-8, a będące specyficznymi agonistami receptorów o podwyższonym powinowactwie i stabilności proteolitycznej [20]. Z naszych obserwacji wynika, że do detekcji aktywacji receptorów na komórkach RJG wymagane jest bardzo wysokie lokalne stężenie stabilnego peptydu przy błonie komórkowej, stąd konieczność zastosowania agonistów.

Po potwierdzeniu aktywności receptora NMUR2 obecnego na komórkach RJG zbadany został fenotyp komórek poddanych działaniu NMU. W tym celu przygotowano i scharakteryzowano klony linii HT29 i Caco-2 ze stabilną nadekspresją *NMU*. Taki model pozwolił na obserwację komórek, które poddane są ciągłemu, autokrynnemu działaniu podwyższonego stężenia NMU i charakteryzuje je ekspresja NMUR2. Zaobserwowano, że **klony z nadekspresją *NMU* mają nasilone zdolności migracyjne i inwazyjne oraz charakteryzują się pobudzonym szlakiem aktywacji kinaz ERK1/2, co świadczy pośrednio o aktywacji receptora NMUR2**. Ponieważ mobilność i inwazyjność komórek nowotworowych jest silnie zależna od ich oddziaływania z macierzą zewnątrzkomórkową, klony komórek HT29-NMU i Caco-2-NMU zbadaliśmy pod względem ekspresji genów kodujących podjednostki receptorów integrynowych. Integryny to receptory powierzchniowe związane z procesem progresji nowotworowej [21]. **Ciągłe pobudzenie komórek RJG poprzez ich aktywację NMU spowodowało istotne podwyższenie ekspresji genów podjednostek integrynowych αV , $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 6$ o udokumentowanym udziale w procesach prowadzących do progresji nowotworowej. Zebrane dane potwierdziły, że podwyższona produkcja i wydzielanie NMU przez komórki RJG może prowadzić do ich autokrynnnej aktywacji za pośrednictwem receptora NMUR2 i zmiany ich fenotypu na sprzyjający inwazji.**

(publikacja nr 5)

Kolejną część badań rozpoczęliśmy od potwierdzenia, na poziomie białkowym, zidentyfikowanych wcześniej zmian w ekspresji *NMU* na poziomie mRNA, które zarejestrowaliśmy analizując dane zdeponowane w bazie TCGA. W tym celu wykonaliśmy barwienie immunohistochemiczne NMU komercyjnie dostępnych tkanek izolowanych od pacjentów z RJG. **Istotne zmiany w poziomie peptydu pomiędzy tkanką nowotworową a sąsiadującą tkanką normalną zaobserwowaliśmy głównie w nowotworach o niskim stopniu zaawansowania (g1)**. Różnice te zacierały się wraz z rosnącym zaawansowaniem choroby.

Analiza danych (TCGA) pod kątem przeżywalności pacjentów z RJG wykazała krótszy całkowity czas przeżycia pacjentów z nowotworami charakteryzującymi się wysokim poziomem mRNA dla NMUR1. W grupie tej zidentyfikowaliśmy więcej przerzutów do węzłów chłonnych oraz podwyższoną ekspresję czynnika *VEGFC* (ang. vascular endothelial growth factor type C) związanego z tworzeniem naczyń limfatycznych. Związek podwyższonej ekspresji *NMUR1* z gorszą przeżywalnością pacjentów z RJG był zaskakujący, ponieważ ekspresja tego receptora, zgodnie z danymi z bazy TCGA, spada w komórkach RJG względem normalnych tkanek sąsiadujących, co raczej sugeruje jego działanie niesprzyjające rozwojowi nowotworu. Wzbudziło to nasze zainteresowanie, szczególnie w kontekście niespójnych doniesień na temat obecności receptorów NMU w innych nowotworach (publikacja 3). Ekspresję *NMUR1* obserwowano wcześniej nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w innych, nienowotworowych komórkach potencjalnie obecnych w mikrośrodowisku guza. W związku z powyższym przeanalizowaliśmy wyniki w bazie TCGA pod względem poziomu ekspresji markerów różnych typów komórek mikrośrodowiska w tkankach nowotworowych (RJG). **W grupie z**

podwyższonym poziomem ekspresji *NMUR1* zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję markerów m.in. komórek śródbłonna naczyń, makrofagów i płytek krwi. Pozwoliło nam to na postawienie hipotezy, że NMU obecne w mikrośrodkowisku guza działa nie tylko autokrynnie na komórki RJG, ale również parakrynnie na inne komórki nienowotworowe.

Z uwagi na fakt, że dane w bazie TCGA dotyczą całych tkanek i nie można na ich podstawie wnioskować o ekspresji *NMUR1* w poszczególnych typach komórek, kolejne badania prowadzono na modelach komórkowych. Zastosowano dwa modele badawcze makrofagów: makrofagi różnicowane z komórek linii THP-1 (TDM, ang. *THP-1 derived macrophages*) oraz makrofagi różnicowane z monocytów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców (MDM, ang. *monocyte derived macrophages*). Jako model komórek śródbłonna mikronaczyń krwionośnych zastosowano linię komórkową HMEC-1, a ludzkie płytki krwi izolowano z koncentratów płytkowych zdrowych dawców. Ekspresja *NMUR1* została potwierdzona we wszystkich badanych typach komórek zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka. W celu sprawdzenia odpowiedzi badanych komórek na NMU, komórki inkubowano z syntetyczną NMU-9, jak również medium pochodzącym z komórek RJG z potwierdzoną nadekspresją peptydu i jego istotnym wydzielaniem. Podobnie jak w przypadku komórek RJG aby potwierdzić aktywację NMUR1 analizowaliśmy fosforylację kinaz ERK1/2 pod wpływem działania NMU. **Wykazaliśmy aktywację receptora NMUR1 zarówno w komórkach śródbłonna, jak i w makrofagach, co świadczy o tym, że komórki nienowotworowe, potencjalnie obecne w środowisku guza, mają zdolność reagowania na podwyższone stężenie NMU wydzielane przez komórki raka jelita grubego.**

Kolejno, przeprowadziliśmy testy funkcjonalne w celu sprawdzenia jak działanie NMU wpływa na funkcje badanych komórek. Temat ten nie był dotychczas podejmowany w kontekście chorób nowotworowych. Zbadano więc kluczowe procesy zachodzące w mikrośrodkowisku nowotworu, jak zmiany fenotypu komórek oraz wpływ na ich funkcje, w tym wydzielanie cytokin, chemotaksję, migrację czy angiogenezę.

Na podstawie istotnie większej liczby komórek migrujących przez membranę półprzepuszczalną w kierunku rosnącego stężenia NMU-9 stwierdzono, że **NMU działa na makrofagi chemotaktycznie**, co potwierdza potencjalny, bezpośredni udział peptydu w zwiększaniu populacji makrofagów w mikrośrodkowisku nowotworowym. **Dodatkowo NMU nasila ich zdolności migracyjne, wywołuje ich polaryzację w kierunku pronowotworowego fenotypu M2 (obecność markera CD206) oraz zmienia profil wydzielanych przez nie cytokin, m.in. zwiększając uwalnianie CCL-2 i CXCL-12 o udokumentowanym działaniu pronowotworowym.** Przedstawione wyniki wskazują, że NMU może potencjalnie modulować obecność i fenotyp makrofagów promując rozwój choroby. Pozwoliło nam to zabrać głos w dyskusji na temat kontrowersji wokół roli makrofagów w przebiegu i progresji RJG [22]. W dalszej części pracy zbadano wpływ NMU potencjalnie obecnej w niszy nowotworu na wzajemne interakcje makrofagów i komórek nowotworowych. Oceniono wpływ czynników wydzielanych przez makrofagi traktowane NMU na zdolności migracyjne komórek RJG. Na podstawie analizy otrzymanych

wyników **stwierdzono istotną statystycznie stymulację migracji komórek linii HCT116 pod wpływem medium pochodzącego z makrofagów traktowanych NMU-9 w stosunku do próby kontrolnej. Komórki RJG wydzielające NMU do mikrośrodowiska mogą zatem promować jego pronowotworowy charakter nie tylko na drodze autokrynej, ale także w wyniku parakrynnego działania na makrofagi.**

Komórki śródbłoka mikronaczyniowego związanego ze zmianą nowotworową nazywane są śródbłonkiem dysfunkcyjnym [23], który pośredniczy w wymianie substancji odżywczych pomiędzy układem krwionośnym a niszą nowotworu, odpowiada za proces angiogenezy i ułatwia przedostawanie się komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych (proces intrawazacji). Zwiększone zagęszczenie naczyń krwionośnych w okolicy guza, oznacza większe prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów. Z naszych obserwacji wynika, że **pod wpływem NMU komórki śródbłoka zyskują cechy śródbłoka dysfunkcyjnego. Przejawia się to podwyższeniem poziomu produkcji białek charakterystycznych dla komórek okolicy guza (IGBP-7 oraz wimentyny) oraz nasileniem wydzielania charakterystycznych dla nich cytokin jak CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF i GM-CSF, ICAM-1 oraz IL-6. Zgodnie z doniesieniami mogą one mieć aktywność proangiogenną (ICAM-1) oraz determinować interakcje z makrofagami (CCL-2) i komórkami nowotworowymi (CCL-2, CCL-5). Obserwacje funkcjonalne wskazują na NMU jako czynnik proangiogeny, który zwiększa intensywność migracji komórek śródbłoka oraz ich zdolność do tworzenia struktur kapilaropodobnych w hodowli na sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej.**

Przedstawione wyniki wskazują na aktywność NMU względem makrofagów i komórek śródbłoka, która jest wykorzystywana przez komórki RJG do stworzenia mikrośrodowiska sprzyjającego progresji nowotworowej.

Mimo wcześniejszych doniesień na temat podwyższonej ekspresji NMU w różnego typu nowotworach oraz danych dotyczących występowania receptorów NMU na różnych komórkach potencjalnie obecnych w niszy nowotworowej [24], nasze **badania aktywności neuromedyny U w mikrośrodowisku nowotworu były nowatorskie.**

Z uwagi na podstawowy charakter przedstawionych badań, jest nadal za wcześnie żeby jednoznacznie wskazać NMU lub jej receptory jako markery wczesnych etapów progresji RJG. Nie jest też pewne, czy będziemy w stanie zdobyć wystarczająco informacji, żeby ścieżka NMU/NMUR zyskała status celu terapeutycznego. Jednak otrzymane wyniki, rozwój narzędzi badawczych i publikowane dane z innych zespołów zachęcają do kontynuowania badań w tym temacie. Wyniki zgromadzone w ramach projektu Sonata Bis 6 stały się podstawą dwóch rozpraw doktorskich, dr Kamili Soboskiej i mgr Eweliny Sochackiej. Zdobyta wiedza i dane przyczyniły się też do przygotowania kolejnego projektu badawczego poświęconego roli NMU w progresji RJG zatytułowanego: **„Znaczenie prognostyczne neuromedyny U i jej receptorów w przebiegu nowotworów jelita grubego, rola w metastazie”.** Projekt ten uzyskał pozytywną decyzję w sprawie finansowania w ramach konkursu Opus 21 (NCN) i we wrześniu 2022 r. rozpoczęła się jego realizacja. Za pomocą modeli zwierzęcych, obserwacji

tkanek ludzkich oraz badania śródbłonna limfatycznego, podjęta zostanie próba weryfikacji hipotezy, że neuromedyna U i jej receptory wpływają stymulująco na wzrost inwazyjności raka jelita grubego i mogą stać się markerami prognostycznymi choroby.

Podsumowanie osiągnięcia naukowego

- Przygotowano i wykonano pełną charakterystykę modelu badawczego komórek RJG z zaindukowanym procesem EMT w wyniku stabilnej nadekspresji genu dla czynnika transkrypcyjnego Snail (HT29-Snail).
- Komórki HT29-Snail o podwyższonej inwazyjności w wyniku indukcji przejścia EMT poddano analizie transkryptomicznej w wyniku której:
 - zidentyfikowano grupę 541 genów różnicujących, których ekspresja obniżyła się (340 genów) lub podwyższyła (201 genów) w wyniku nadekspresji *Snail*. Zarejestrowane zmiany w poziomie ekspresji genów były bezpośrednio związane z nasileniem mobilności komórek nowotworowych i regulacją ich przeżywalności.
 - potwierdzono, że globalny obraz zmian w transkryptomie oraz fenotypie klonów HT29-Snail nie indukuje definitywnej zmiany fenotypu komórek RJG na mezenchymalny, ale rozpoczyna ten proces, wprowadzając komórki w stan fenotypu przejściowego (ang. *intermediate epithelial state*).
 - wnioskowano, że proces EMT w komórkach RJG powinien być postrzegany jako spektrum stanów przejściowych pomiędzy fenotypami, a więc celem terapeutycznym nie mogą być komórki danego fenotypu, ale mechanizmy wyzwalające plastyczność komórek nowotworowych.
 - wykazano podwyższoną ekspresję mRNA kodującego neuromedynę U (NMU) w komórkach HT29, zależną od poziomu ekspresji *Snail*. Po raz pierwszy pokazano, że komórki HT29 z zaindukowanym procesem EMT oraz z podwyższoną mobilnością w wyniku nadekspresji *Snail*, produkują i wydzielają białko oraz mRNA kodujące neuromedynę U jak również wykazują ekspresję jej receptora, NMUR2.
- Komórki HT29-Snail o podwyższonej inwazyjności w wyniku indukcji przejścia EMT poddano analizie ekspresji cząsteczek mikroRNA w wyniku której:
 - wykazano, że aktywacja EMT wywołana nadekspresją Snail w komórkach RJG nie wpływa na zdolność komórek do produkcji mikroRNA i nie zaburza ekspresji genów kodujących dwa główne enzymy zaangażowane w ten proces, Dicer i Drosha.
 - zaobserwowano znacząco zmienione proporcje pomiędzy poszczególnymi typami produkowanych cząsteczek mikroRNA. Zmiany były zależne od stopnia nadekspresji *Snail* w komórkach. Spośród kilkudziesięciu zidentyfikowanych różnicujących mikroRNA, największe zmiany zaobserwowano w obecności miR-205, let-7i i SNORD13, których ekspresja wzrosła w

komórkach o podwyższonej inwazyjności oraz miR-192 i miR-194, których ekspresja uległa obniżeniu w takich komórkach.

- po raz pierwszy powiązano nadekspresję Snail z obniżeniem poziomu ekspresji mikroRNA hamujących rozwój guza (miR-192 i miR-194) w komórkach RJG, które może wynikać m.in. z bezpośredniego wiązania Snail do promotora prekursora tych mikroRNA.

- Wyniki analizy transkryptomicznej i mikroRNA w komórkach w początkowej fazie procesu EMT dostarczyły długą listę zawierającą dane na temat różnicujących mikroRNA i ich korelacji ze zmianami zidentyfikowanymi w transkryptomie komórek. W ten sposób wskazano nie tylko zmiany w poziomie produkowanych mikroRNA, ale również pośrednio pokazano efekt ich aktywności regulatorowej, w postaci zmian ekspresji genów docelowych.
- Zebrano dostępną wiedzę na temat ekspresji genu dla neuromedyny U, syntezy, wydzielania i obróbki różnych form peptydu oraz rodzajów, dystrybucji i funkcji klasycznych (NMUR1, NMUR2) i alternatywnych (NTSR1/GHSR1b) receptorów dla NMU. Po raz pierwszy szczegółowo podsumowano doniesienia dotyczące roli NMU i jej receptorów w przebiegu chorób nowotworowych.
- Przeprowadzono badania roli NMU w aktywacji komórek RJG, w wyniku których:
 - wykazano, że ekspresja *NMU* jest istotnie podwyższona w tkance nowotworowej izolowanej nawet we wczesnych stadiach choroby w porównaniu z sąsiadującą tkanką zdrową. Dodatkowo wysoki poziom *NMU* w tkance guza wiąże się z gorszymi rokowaniami. Ekspresja receptora *NMUR1* okazała się istotnie niższa, a receptora *NMUR2* - znacząco wyższa w tkance chorej niż w zdrowej tkance sąsiadującej.
 - scharakteryzowano panel linii komórkowych RJG pod względem ekspresji *NMU* i jej receptorów
 - po raz pierwszy wykazano wydzielanie NMU w postaci dwóch białek prekursorowych o długościach 174-AA i 158-AA.
 - wykazano, że NMU stanowi ładunek wydzielanych przez komórki RJG pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, znanych z ich czynnego udziału w komunikacji międzykomórkowej m.in. w procesie progresji nowotworowej.
 - zaobserwowano, że ekspresja *NMUR1* i *NMUR2* w komórkach RJG podlega regulacji poprzez metylację DNA, co stwarza możliwość włączania i wyłączania produkcji receptorów przez komórki i ich adaptacji do warunków mikrośrodowiska.
 - po raz pierwszy udokumentowano pobudzenie szlaków sygnałowych aktywowanych na drodze NMU/NMUR2, na komórkach RJG z endogennym poziomem tego receptora, rejestrując sygnał związany z mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego oraz aktywację fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2.
 - wykazano, że klony z nadekspresją *NMU* mają nasilone zdolności migracyjne i inwazyjne

- udowodniono, że ciągle pobudzenie komórek RJG poprzez ich aktywację NMU powoduje istotne podwyższenie ekspresji podjednostek integrynowych αV , $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 6$ o udokumentowanym udziale w procesach prowadzących do progresji nowotworowej.
- potwierdzono, że podwyższona produkcja i wydzielanie NMU przez komórki RJG może prowadzić do ich autokrynej aktywacji za pośrednictwem receptora NMUR2 i zmiany ich fenotypu na sprzyjający inwazji.
- Przeprowadzono badania roli NMU wydzielonego przez komórki RJG w aktywacji makrofagów i komórek śródbłonna, w wyniku których:
 - wykazano aktywację receptora NMUR1 zarówno w komórkach śródbłonna, jak i w makrofagach, co świadczy o tym, że komórki nienowotworowe, potencjalnie obecne w środowisku guza, mają zdolność reagowania na podwyższone stężenie NMU wydzielane przez komórki raka jelita grubego.
 - stwierdzono, że NMU działa na makrofagi chemotaktycznie, nasila ich zdolności migracyjne, wywołuje ich polaryzację w kierunku pronowotworowego fenotypu M2 (obecność markera CD206) oraz zmienia profil wydzielanych przez nie cytokin, m.in. zwiększając wydzielanie CCL-2 i CXCL-12 o udokumentowanym działaniu pronowotworowym.
 - wykazano, że komórki RJG wydzielające NMU do mikrośrodowiska mogą promować jego pronowotworowy charakter nie tylko na drodze autokrynej, ale także w wyniku parakrynnego działania na makrofagi.
 - zaobserwowano, że pod wpływem działania NMU komórki śródbłonna zyskują cechy śródbłonna dysfunkcyjnego. Przejawia się to podwyższeniem poziomu produkcji białek charakterystycznych dla komórek okolicy guza (IGBP-7 oraz wimentyny) oraz nasileniem wydzielania charakterystycznych dla nich cytokin jak CCL-2, CCL-5, CXCL-10, G-CSF i GM-CSF, ICAM-1 oraz IL-6.
 - wykazano, że NMU działa jako czynnik proangiogeny, który zwiększa intensywność migracji komórek śródbłonna oraz ich zdolność do tworzenia struktur kapilaropodobnych w hodowli na sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej.
- Dostarczone dane dotyczące udziału NMU w rozwoju RJG mają istotne znaczenie dla odkrycia procesów zachodzących w mikrośrodowisku RJG, ale również w innych typach nowotworów, w których jej znaczenie było raportowane.

d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Funkcje komórek śródbłonna naczyń w procesie fizjologicznej i patologicznej angiogenezy.

W latach 2001-2005, po ukończeniu studiów na Uniwersytecie Łódzkim (kierunek: biologia, specjalność: biofizyka), byłam uczestnikiem studiów doktoranckich w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Medycznej (ZBMiM) na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, które odbywałam pod opieką promotorską prof. Zofii Pawłowskiej. Część doświadczałną pracy doktorskiej wykonywałam w

ramach Centrum Doskonałości MolMed, projektu finansowanego z funduszy europejskich, ale byłam również angażowana w inne projekty realizowane w ZBMiM pod kierownictwem prof. Czesława S. Cierniewskiego. Głównym obiektem moich zainteresowań były komórki śródbłonka, ich funkcjonowanie i mechanizmy zachodzące podczas procesu fizjologicznej i patologicznej angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Badałam adhezję i migrację komórek śródbłonka oraz tworzenie struktur kapilaropodobnych szczególnie pod kątem udziału tych procesów w angiogenezie umożliwiającej wzrost guza nowotworowego. **W wyniku innowacyjnej w tamtym czasie metody analizy proteomicznej opisaliśmy zmiany proteomu komórek śródbłonka indukowanych do tworzenia nowych struktur naczyniowych śródblonkowym czynnikiem wzrostu, VEGF.** Czynniki ten jest kluczowy w indukcji angiogenezy, procesu zachodzącego zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych, w szczególności umożliwiającego unaczynienie guza nowotworowego. Poznanie mechanizmów uruchamianych w komórkach śródbłonka jest więc kluczowe dla poszukiwania nowych sposobów interwencji terapeutycznych mających na celu np. zatrzymanie rozwoju nowotworu. Zidentyfikowaliśmy i opisaliśmy istotne zmiany jakościowe w obecności wielu białek w komórkach śródbłonka, w tym białek szoku cieplnego i receptorów integrynowych. Wyniki zostały zebrane w pracach opublikowanych na łamach *Proteomics* oraz *Cancer Genomics & Proteomics*. Na podstawie uzyskanych danych przygotowałam rozprawę doktorską, zatytułowaną „Udział czynnika wzrostu VEGF we wczesnych etapach zmian proangiogennych w komórkach śródbłonka”. Badania związane z rolą śródbłonka naczyniowego w angiogenezie i reakcjach zapalnych kontynuowałam w ramach pracy w zespole prof. Czesława S. Cierniewskiego również po uzyskaniu stopnia doktora. Analizy odpowiedzi komórek na autokryne działanie VEGF-D wydzielonego przez komórki śródbłonka obecne w okolicy guza doprowadziły do identyfikacji funkcji VEGF-D jako kolejnego czynnika proangiogenego w niszy nowotworowej. W poszukiwaniu czynników wpływających na indukcję zmian proangiogennych w śródblonku w wyniku procesów zapalnych zidentyfikowano szlak NFAT-2 / Cox-2, którego aktywacja prowadzi do istotnej zmiany profilu integryn powierzchniowych obecnych na śródblonku i promuje angiogenezę. Obok badań procesów związanych z angiogenezą, naszą uwagę zwrócił temat degeneracji naczyń krwionośnych wynikający z pobudzenia receptorów NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor* znany jako receptor dla glutaminianu) na komórkach śródbłonka w takich chorobach jak retinopatia cukrzycowa. Matryna 3, uważana wówczas za białko macierzy jądrowej, z obecnie potwierdzoną zdolnością do wiązania RNA i DNA [25], wskazywana była jako regulator śmierci neuronów w wyniku nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA. Z uwagi na ekspresję tych receptorów na komórkach śródbłonka przetestowaliśmy rolę matryny 3 w funkcjonowaniu komórek. Wykazano, że matryna 3 reguluje proliferację śródbłonka, a wyciszenie jej ekspresji prowadzi do uruchomienia mechanizmów prowadzących do nekrozy.

Prace związane opisana aktywnością opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

- Pawłowska Z., Jerczyńska H., Szmraj J., **Barańska P.**, Świątkowska M., Cierniewski C.S. Natriuretic peptides reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(4), 1153-1157 (2002); PMID: 12511982

- **Barańska P.**, Jerczyńska H., Pawłowska Z. Czynniki wzrostu śródbłonnika naczyń - budowa i funkcje. Postępy Biochemii, 51(1), 12-21 (2005); PMID: 16209337
- Pawłowska Z., **Barańska P.**, Jerczyńska H., Koziolkiewicz W., Cierniewski C.S. Heat shock proteins and other components of cellular machinery for protein synthesis are up-regulated in vascular endothelial cell growth factor-activated human endothelial cells. Proteomics, 5(5), 1217-1227 (2005); doi:10.1002/pmic.200400983
- Jerczyńska H., **Barańska P.**, Walkowiak B., Koziolkiewicz W., Pawłowska Z. Growth of endothelial cells at surfaces of selected biomaterials. Engineering of Biomaterials, 43-44, 21-24 (2005).
- **Barańska P.**, Jerczyńska H., Pawłowska Z., Koziolkiewicz W., Cierniewski C.S. Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA.hy 926. Cancer Genomics & Proteomics, 2(5), 265-270 (2005); PMID: 31394624
- Komorowski J., Jerczyńska H., Siejka A., **Barańska P.**, Ławnicka H., Pawłowska Z., Stępień H. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. Life Sciences, 78, 2558-2563 (2006); doi:10.1016/j.lfs.2005.10.016

Prace związane opisaną aktywnością opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

- Papiewska-Pajak I., Boncela J., **Przygodzka P.**, Cierniewski C.S. Autocrine effects of VEGF-D on endothelial cells after transduction with AD-VEGF-D(DeltaNDeltaC). Experimental Cell Research, Apr 1;316(6), 907-914 (2010); doi: 10.1016/j.yexcr.2010.01.014; PMID: 20096685
- Mena M.P., Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Kozaczuk A., Boncela J., Cierniewski C.S. NFAT2 regulates COX-2 expression and modulates the integrin repertoire in endothelial cells at the crossroads of angiogenesis and inflammation. Experimental Cell Research, Jun 10;324(2), 124-136 (2014); doi: 10.1016/j.yexcr.2014.03.008
- **Przygodzka P.**, Boncela J., Cierniewski C.S. Matrin 3 as a key regulator of endothelial cell survival. Experimental Cell Research, Apr 1;317(6), 802-811 (2011); doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.009

Rola białek z rodziny serpin w funkcjonowaniu komórek

Po uzyskaniu stopnia doktora, rozpoczęłam staż podoktorski w Katedrze Biochemii Medycznej i Biofizyki Uniwersytetu w Umeå w Szwecji w zespole prof. Tor Ny. Moją aktywność naukową realizowaną na Uniwersytecie Umeå opisałam szczegółowo poniżej w punkcie 5 autoreferatu. Praca podczas stażu rozpoczęła moje wieloletnie zaangażowanie w badania poświęcone funkcji serpin, interesujących białek należących do grupy inhibitorów proteaz serynowych o zróżnicowanych funkcjach.

Po zakończeniu stażu wróciłam do Instytutu Biologii Medycznej PAN, w którym objęłam stanowisko adiunkta, w Pracowni Proteomiki Komórkowej. Brałam udział w licznych projektach badawczych realizowanych przez zespół kierowany przez prof. Czesława S. Cierniewskiego (m.in. dr hab. Joannę Boncelę). **Badania, w których brałam udział doprowadziły do wyjaśnienia roli serpin PAI-1 i PAI-2 w aktywności komórek śródbłonnika oraz aktywności proteasomu, wieloskładnikowego kompleksu odpowiedzialnego za degradację białek enzymatycznych i regulatorowych.**

Prace związane opisaną aktywnością

- **Przygodzka P.**, Ramstedt B., Engel T., Larsson G., Wilczyńska M. Bomapin is a redox-sensitive nuclear serpin that affects responsiveness of myeloid progenitor cells to growth environment. BMC Cell Biology, 11, 30 (2010); doi: 10.1186/1471-2121-11-30
- Boncela J., **Przygodzka P.**, Papiewska-Pajak I., Wyroba E., Osinska M., Cierniewski C.S. Plasminogen activator inhibitor type 1 interacts with alpha3 subunit of proteasome and modulates its activity. Journal of Biological Chemistry, Feb 25;286(8), 6820-6831 (2011); doi: 10.1074/jbc.M110.173781; PMID: 21135093

- Boncela J., **Przygodzka P.**, Papiewska-Pajak I., Wyroba E., Cierniewski C.S. Association of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) with proteasome within endothelial cells activated with inflammatory stimuli. *Journal of Biological Chemistry*, Dec 16;286(50), 43164-43171 (2011); doi: 10.1074/jbc.M111.245647; PMID: 21976669
- Boncela J., **Przygodzka P.**, Wyroba E., Papiewska-Pajak I., Cierniewski C.S. Secretion of SerpinB2 from endothelial cells activated with inflammatory stimuli. *Experimental Cell Research*, May 1;319(8), 1213-1219 (2013); doi: 10.1016/j.yexcr.2013.02.018

Badania procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT)

Projekt, w którym podjęta została tematyka EMT, a którego efekty omówione zostały przy okazji opisu osiągnięcia, zapoczątkował liczne badania. Scharakteryzowany model komórek HT29-Snail został wykorzystany razem z analogicznym modelem komórek czerniaka z nadekspresją Snail do wykazania, że lumikan (mały proteoglikan) hamuje migrację komórek czerniaka z zaindukowanym procesem EMT poprzez hamowanie ekspresji genu dla metaloproteinazy 14 (*MMP-14*). Badania EMT, z uwagi na podobieństwo głównych regulatorów procesu, rozszerzyły się na analizy procesu przejścia śródbłonkowo-mezenchymalnego (EndoMT) zaangażowanego w rozwój nowotworów i chorób związanych z zaburzeniami włóknienia (ang. *fibrotic disorders*). W jednej z prac opisano funkcję czynnika MRTF (ang. *myocardin-related transcription factor*) w regulacji ekspresji *Snail* w komórkach śródbłonka a tym samym jego rolę w indukowaniu procesu EndMT.

Prace związane z opisaną aktywnością

- Stasiak M., Boncela J., Perreau C., Karamanou K., Chatron-Colliet A., Proult I., **Przygodzka P.**, Chakravarti S., Maquart F.X., Kowalska M.A., Wegrowski Y., Brézillon S. Lumican Inhibits SNAIL-Induced Melanoma Cell Migration Specifically by Blocking MMP-14 Activity. *PLoS One*, Mar 1;11(3):e0150226 (2016); doi: 10.1371/journal.pone.0150226
- Sobierajska K., Ciszewski W. M., Macierzynska-Piotrowska E., Klopocka W., **Przygodzka P.**, Karakula M., Pestka K., Wawro M.E. and Niewiarowska J. The New Model of Snail Expression Regulation: The Role of MRTFs in Fast and Slow Endothelial-Mesenchymal Transition. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 5875 (2020); doi:10.3390/ijms21165875

Badania wydzielania i składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez komórki nowotworowe

Zagadnienia związane z wydzielaniem, składem i funkcją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w progresji nowotworowej to wciąż żywy temat w biologii nowotworów. W ramach współpracy z dr Izabelą Papiewską-Pajak brałam udział w badaniach mikropęcherzyków wydzielanych z komórek RJG. Odkryto, że mysie komórki MC38 z zaindukowanym procesem EMT wydzielają mikropęcherzyki z podwyższoną zawartością glikoproteiny - glipikan-1, która jest markerem RJG. Transport glipikanu-1 w pęcherzykach może ułatwiać komórkom nowotworowym tworzenie nowych nisz nowotworowych w organizmie. Potencjał mikropęcherzyków do modyfikacji mikrośrodowiska nowotworu, jak również do modulacji nowych nisz nowotworowych zainspirował wykonanie pełnej analizy zawartości mikroRNA w pęcherzykach wydzielanych z komórek HT29-Snail. Część tych wyników została omówiona w opisie osiągnięcia. Pęcherzyki uwolnione przez komórki we wczesnym etapie EMT różniły się zawartością mikroRNA, a ich badania *in vivo* w modelu mysim wskazały, że mają one potencjał pro-zapalny.

Prace związane opisaną aktywnością

- Papiewska-Pajak I., Krzyzanowski D., Katela M., Rivet R., Michlewska S., **Przygodzka P.**, Kowalska M.A. and Brézillon S. Glypican-1 Level Is Elevated in Extracellular Vesicles Released from MC38 Colon Adenocarcinoma Cells Overexpressing Snail. *Cells*, 9, 1585 (2020); doi:10.3390/cells9071585
- Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Krzyzanowski D., Soboska K., Szulc-Kielbik I., Stasikowska-Kanicka O., Boncela J., Wagrowska-Danilewicz M. and Kowalska M.A. Snail Overexpression Alters the microRNA Content of Extracellular Vesicles Released from HT29 Colorectal Cancer Cells and Activates Pro-Inflammatory State In Vivo. *Cancers*, 13, 172 (2021); <https://doi.org/10.3390/cancers13020172>

Wykorzystanie techniki barwienia fluorescencyjnego i obrazowania konfokalnego w badaniach interakcji międzykomórkowych i biologii komórki.

Uczestnictwo w realizacji licznych projektów badawczych pozwoliło mi na rozwijanie warsztatu badawczego i nawiązywanie współpracy, która poszerzała zakres moich zainteresowań. W ramach tej współpracy m.in. planowałam działania, rejestrowałam i analizowałam wyniki z zakresu obrazowania konfokalnego. Każda z tych aktywności rozwijała moje umiejętności i wiedzę. Za szczególnie cenną uważam współpracę z prof. Przemysławem Lewkowiczem z Zakładu Immunogenetyki Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Nasza współpraca zaowocowała między innymi powstaniem czterech wysokopunktowanych publikacji. Zdjęcie obrazujące neutrofile produkujące interleukinę 10 wykonane przeze mnie za pomocą mikroskopii konfokalnej w ramach jednej z prac zostało docenione przez edytorów z Nature Publishing Group i znalazło się na okładce czasopisma.

Wybrane prace związane opisaną aktywnością

- Kielbik M., Szulc I., Brzezińska M., Bednarska K., **Przygodzka P.**, Sułowska Z., Nowak M., Klink M. Nitric oxide donors reduce the invasion ability of ovarian cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs*, Nov; 25(10), 1141-1151 (2014); doi: 10.1097/CAD.0000000000000149
- Michalski M., St Swierzko A., Lukasiewicz J., Man-Kupisinska A., Karwaciak I., **Przygodzka P.**, Cedzynski M. Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*. *Immunobiology*, Jan; 220(1), 117-123 (2015); doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.012
- Lewkowicz N., Mycko M.P., **Przygodzka P.**, Ćwiklińska H., Cichalewska M., Matysiak M., Selmaj K., Lewkowicz P. Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunology*, Mar; 9(2), 364-378 (2015); doi: 10.1038/mi.2015.66
- Piątek P., Domowicz M., Lewkowicz N., **Przygodzka P.**, Matysiak M., Dzitko K., Lewkowicz P. C5a-Preactivated Neutrophils Are Critical for Autoimmune-Induced Astrocyte Dysregulation in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder *Frontiers in Immunology*, July 23 (2018); doi.org/10.3389/fimmu.2018.01694
- Lewkowicz N., Piątek P., Namiecinska M., Domowicz M., Bonikowski R., Szmaj J., **Przygodzka P.**, Stasiolek M. and Lewkowicz P. Naturally Occurring Nervonic Acid Ester Improves Myelin Synthesis by Human Oligodendrocytes. *Cells*, 8, 786 (2019); doi:10.3390/cells8080786
- Piątek P., Namiecinska M., Domowicz M., **Przygodzka P.**, Wiecek M., Michlewska S., Lewkowicz N., Tarkowski M. and Lewkowicz P. MS CD49d+CD154+ Lymphocytes Reprogram Oligodendrocytes into Immune Reactive Cells Affecting CNS Regeneration. *Cells*, 8, 1508 (2019); doi:10.3390/cells8121508

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2005 r., rozpoczęłam staż podoktorski w Katedrze Biochemii Medycznej i Biofizyki Uniwersytetu w Umeå w Szwecji w zespole prof. Tor Ny, gdzie pod kierownictwem dr Małgorzaty Wilczyńskiej rozwijałam swój warsztat metodyczny, brałam udział w kursach i seminariach, a przede wszystkim uczestniczyłam w projekcie finansowanym przez Cancer

Research Found in Norrland, zatytułowanym: „Fizjologiczna i patologiczna rola serpin wewnątrzkomórkowych w procesach hematopoezy i rozwoju białaczek”. W laboratorium o uznanych w świecie sukcesach dotyczących badań serpin, w szczególności PAI-1 i PAI-2, inhibitorów aktywatora plazminogenu, zajmowałam się badaniami bomapiny, innego białka z rodziny serpin, w kontekście procesów związanych z rozwojem choroby nowotworowej. Bomapina to jądrowe białko, które produkowane jest w komórkach progenitorowych szpiku kostnego i komórkach białaczek, ale zanika po całkowitym zróżnicowaniu komórek do leukocytów. Wykazano że, bomapina uwrażliwia komórki progenitorowe na warunki środowiska regulując ich proliferację i apoptozę, dwa procesy kluczowe dla prawidłowej hematopoezy, której zakłócenia prowadzą do zmian białaczkowych. Wyniki zaprezentowano w formie dwóch plakatów na konferencji: *XIth International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, Satlsjobaden, Sztokholm, Sweden 2007* i podsumowano w pracy oryginalnej **Przygodzka P., Ramstedt B., Engel T., Larsson G., Wilczyńska M.** *Bomapin is a redox-sensitive nuclear serpin that affects responsiveness of myeloid progenitor cells to growth environment. BMC Cell Biology 2010; 11: 30; doi: 10.1186/1471-2121-11-30*. Praca w międzynarodowym zespole naukowców, stosującym szerokie spektrum metod badawczych pozwoliła mi nie tylko poszerzyć swoje kompetencje, ale również nabrać samodzielności i poznać różne sposoby rozwiązywania problemów naukowych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

a) Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

W roku 2012 zostałam zaangażowana w realizację projektu Maestro (NCN), który stał się źródłem mojego zainteresowania neuromedyną U i zapoczątkował serię publikacji w tej tematyce oraz stał się inspiracją do przygotowania własnego projektu badawczego. **W 2016 roku otrzymałam pozytywną decyzję NCN, w sprawie finansowania projektu Sonata Bis 6 zatytułowanego: „Neuromedyna U jako nowy potencjalny regulator przerzutowania w raku jelita grubego i odbytnicy”.** W ramach projektu stworzyłam zespół dzięki zatrudnieniu dwóch stypendystek, które wykonywały badania w ramach prac doktorskich, w których pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Dr Kamila Soboska obroniła rozprawę doktorską z wyróżnieniem i 18 października 2022 r. uzyskała stopień doktora nauk medycznych. Mgr Ewelina Sochacka po zakończeniu prac badawczych w projekcie zakwalifikowała się do programu BioLAB (Fulbright Poland), który obejmuje roczny staż zagraniczny w laboratorium kierowanym przez prof. Saurabh Kulkarni (Department of Cell Biology, University of Virginia); obecnie przygotowuje rozprawę doktorską.

dr Kamila Soboska – stypendystka projektu Sonata Bis 6 (kierownik: dr P. Przygodzka), 2016-2022,
Kierunek: Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki
Medycznej. „Neuromedyna U (NMU) jako regulator aktywności komórek mikrośrodowiska raka jelita
grubego.” - praca doktorska wykonana w Pracowni Sygnalizacji Komórkowej Instytutu Biologii
Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Nadanie tytułu doktora nauk medycznych dn. 18-10-2022 r.

Promotor: dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN

Promotor pomocniczy: dr Patrycja Przygodzka

mgr Ewelina Sochacka - stypendystka projektu Sonata Bis 6 (kierownik: dr P. Przygodzka) 2016-2022,
Kierunek: Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki
Medycznej. „Rola neuromedyny U (NMU) w regulacji potencjału migracyjnego komórek raka jelita
grubego” - praca doktorska wykonana w Pracowni Sygnalizacji Komórkowej Instytutu Biologii
Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Promotor: dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN

Promotor pomocniczy: dr Patrycja Przygodzka

b) Opieka naukowa podczas praktyk studenckich

Agata Jackiewicz Wydział PŁ: Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej
Rodzaj i rok studiów: stacjonarne, I rok stacjonarnych studiów mgr II stopnia
Kierunek studiów: Biotechnologia, termin odbycia praktyki: 17.09.2012 –
28.09.2012

Agnieszka Godos Wydział PŁ: Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej
Rodzaj i rok studiów: stacjonarne, I rok stacjonarnych studiów mgr II stopnia
Kierunek studiów: Biotechnologia, termin odbycia praktyki: 17.09.2012 –
28.09.2012

Maciej Smolarz Wydział UMED: Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia
Podypłomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Rodzaj i rok studiów: stacjonarne, I rok stacjonarnych studiów II stopnia
Kierunek studiów: Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia Medyczna,
termin odbycia praktyki: 01.07.2013 – 31.07.2013

Edyta Zub

Wydział PŁ: Biotechnologii i Nauk o Żywności

Rodzaj i rok studiów: stacjonarne, I rok st. Mgr Kierunek studiów:

Biotechnologia

Specjalność: Mikrobiologia Techniczna, termin odbycia praktyki: 12.09.2016 – 23.09.2016

c) Organizacja „Dni Otwartych”

W latach 2010-2016 brałam czynny udział w przygotowaniu Dni Otwartych w IBM PAN organizowanych w ramach Festiwalu Nauki.

d) Przedstawiciel adiunktów i asystentów w Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN

W latach 2012-2015 oraz 2016-2019 uczestniczyłam w obradach Rady Naukowej IBM PAN jako przedstawiciel adiunktów i asystentów zatrudnionych w Instytucie. Podczas tych kadencji pełniłam funkcję Sekretarza Rady Naukowej.

e) Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Jerczyńska H., Pawłowska Z., Szemraj J., **Barańska P.**, Świątkowska M., Cierniewski C.S. Wpływ peptydów natriuretycznych na ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu typu I (PAI-1) w komórkach śródbłoka ludzkiego. Konferencja Acta Angiologica, 8, 53, 2002, Kraków 2002; plakat
2. Pawłowska Z., Jerczyńska H., Szemraj J., **Barańska P.**, Świątkowska M., Cierniewski C.S. Natriuretic peptides reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells by the inhibition of its promoter activity. European Life Scientist Organisation (ELSO) Congress, Nicea 2002; plakat
3. Jerczyńska H., Pawłowska Z., Szemraj J., **Barańska P.**, Świątkowska M., Cierniewski C.S. Inhibition of PAI-1 promoter activity by C-type peptide in human endothelial cells. International Symposium on Promotion of International Cooperation in Eastern and Southern Europe in the Field of Medicinal Biotechnology, 58, Łódź 2002; plakat
4. **Barańska P.**, Pawłowska Z., Jerczyńska H., Cierniewski C.S. The role of vascular endothelial growth factor in an early phases of proangiogenic changes in human endothelial cells. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham 2003; CD067, J. Thromb. Haemost., suppl. 1 July 2003; plakat
5. Pawłowska Z., Jerczyńska H., **Barańska P.**, Świątkowska M., Cierniewski C.S. Downregulation of PAI-1 expression by natriuretic peptides is mediated by MAPK cascade in human endothelial cells. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham 2003, P1275, J. Thromb. Haemost., suppl. 1 July 2003; plakat
6. **Barańska P.**, Jerczyńska H., Koziolkiewicz W., Pawłowska Z., Cierniewski C.S. Induction of the angiogenic phenotype in HUVEC by VEGF. Acta Bioch. Pol., 50, 185, suppl. 1/2003; plakat
7. Pawłowska Z., **Barańska P.**, Jerczyńska H., Koziolkiewicz W., Cierniewski C.S. Cellular machinery for protein synthesis is highly upregulated in VEGF-activated human endothelial cells. IV Interdisciplinary Euroconference on Angiogenesis. p51, Helsinki, Finland 2004; plakat

8. Pawlowska Z., **Baranska P.**, Jerczynska H., Koziolkiewicz W., Cierniewski C. S. Upregulation of cellular machinery for protein synthesis upon activation of human endothelial cells by VEGF. 29th Meeting of the Federation of the European Biochemical Societies, Warsaw, 2004, Europ. J. Biochem. The FEBS Journal, 271, suppl. 1, 2004; plakat
9. Jerczynska H., **Baranska P.**, Pawlowska Z., Walkowiak B. Growth of endothelial cells at surfaces of selected biomaterials. 2nd Summer School: Biomedical applications of carbon surfaces. 10, 2004, 21st - 25th of September 2004, Lodz / Wysowa; plakat
10. Pawlowska Z., Komorowski J., Jerczynska H., Siejka A., **Baranska P.**, Lawnicka H., Stepień H. Thalidomide Affects Early Phases of VEGF Stimulated Angiogenesis in Human Endothelial Cells. a/ The FEBS Journal, 272, suppl. 1, 043P, Budapest 2005 b/ J. Thromb. Haemost., 3, suppl. 1, P0555, Sydney 2005; plakat
11. Walkowiak B., Jerczynska H., **Baranska P.**, Koziolkiewicz W., Pawlowska Z. Interaction of endothelial cells with selected biomaterials causes changes in protein expression profile. The FEBS Journal, 272, suppl. 1, Budapest 2005; plakat
12. Walkowiak B., Jerczynska H., **Baranska P.**, Koziolkiewicz W., Pawlowska Z. Protein expression profile of endothelial cells is changed by contact with selected biomaterials. Konferencja Biologii Komórki, Łódź 2005, Folia Histochemica et Cytobiologica, 43, suppl. 1, S5/2, 2005; plakat

Po uzyskaniu stopnia doktora

13. **Przygodzka P.**, Olausson B., Tengell T., Larsson G., Wilczynska M. Bomapin Is a Redox-regulated Serpin which Stabilizes Retinoblastoma Protein during Apoptosis and Increases Proliferation of Leukemia Cells. XIth International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, Satlsjobaden, Sztokholm, Sweden 2007; plakat
14. Olausson B., **Przygodzka P.**, Dahl L., Carlsson L., Wilczynska M. The Serpinb8 Is Alternatively Spliced to the Known Long Form and a Novel Short Form. XIth International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation, Satlsjobaden, Sztokholm, Sweden 2007; plakat
15. **Przygodzka P.**, Boncela J., Cierniewski C.S. Nuclear matrix protein matrin 3 as a possible nuclear processes regulator. 21st International Union of Biochemistry and Molecular Biology International Congress and 12th Federation of National Societies of Biochemistry and Molecular Biology in the Asian and Oceanian Region Congress of Biochemistry and Molecular Biology: "Biomolecules for Quality of Life" Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Biochemii i Biologii Molekularnej, Szanghaj, Chiny 2009; plakat
16. Boncela J., **Przygodzka P.**, Cierniewski C.S. Interaction of PAI-1 and proteasome in endothelial cells. 21st International Union of Biochemistry and Molecular Biology International Congress and 12th Federation of National Societies of Biochemistry and Molecular Biology in the Asian and Oceanian Region Congress of Biochemistry and Molecular Biology: "Biomolecules for Quality of Life" Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Biochemii i Biologii Molekularnej, Szanghaj, Chiny 2009; plakat
17. Boncela J., Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Wyroba E., Cierniewski C.S. PAI-1 and PAI-2 inhibit proteasome activity favoring proapoptotic signaling in endothelial cells. XXIII International Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, 23-28 lipca 2011, Kyoto, Japonia; plakat

18. Mena M.P., Papiewska-Pajak I., Kozaczuk A., Stasiak M., Boncela J., **Przygodzka P.**, Cierniewski C.S. Role of the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) in Inducing a Pro-angiogenic Profile of Integrin Expression in Endothelial Cells. 2nd Congress of Biochemistry and Cell Biology, 46th Meeting of the Polish Biochemical Society and 1st Conference of the Polish Cell Biology Society; 5-9 września 2011, Kraków, Acta Biochimica Polonica (2011), Vol. 58, suppl. 2, p. 149; plakat
19. **Przygodzka P.**, Boncela J., Wyroba E., Papiewska-Pajak I. and Cierniewski C.S. Secretion of PAI-2 from endothelial cells activated with inflammatory stimuli. 22nd International Union of Biochemistry and Molecular Biology & 37th FEBS Congress Seville, Spain September 4–9, 2012 FEBS Letters Volume 279 Supplement 1 September 2012; plakat
20. Mena M.P., Kozaczuk A., Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Stasiak M., Boncela J., Cierniewski C.S. Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) as a Switch Inducing a Pro-angiogenic Integrin Profile in Endothelial Cells. 47th Congress of the Polish Biochemical Society and Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 2012. 11-14 września 2012, Poznań Acta Biochimica Polonica (2012), Vol. 59 suppl. 3, p. 131; plakat
21. **Przygodzka P.**, Boncela J., Papiewska-Pajak I., Słapek M., Cierniewski C.S. VEGF and PAI-1 in endothelial cells apoptosis: balance between survival and death signals. 38th FEBS Congress: Mechanisms in Biology, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 FEBS Journal, Volume 280, Issue Supplement s1:246; SW03.S13–119; plakat
22. Mena M.P., Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Boncela J., Cierniewski C.S. Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) as a key control of endothelial cell phenotype. 38th FEBS Congress: Mechanisms in Biology, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 FEBS Journal, Volume 280, Issue Supplement s1:24; SW01.S1–70; plakat
23. Papiewska-Pajak I., Balcerczyk A., Słapek M., Boncela J., **Przygodzka P.**, Bartosz G., Cierniewski C.S. The influence of VEGF-D on redox homeostasis of human endothelial cells. 38th FEBS Congress: Mechanisms in Biology, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013 FEBS Journal Volume 280, Issue Supplement s1:246; SW03.S13–118; plakat
24. Słapek M., Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Boncela J., Cierniewski C.S., Kowalska M.A. Microvesicles secreted from the colorectal cancer cell line HT29 can transfer into cells constituting metastatic niche. BIO 2014 Congress, Warsaw, Poland, September 9th - 12th, Abstracts Supplement 1:55, P2.45; plakat
25. Klink M., Kiełbik M., Szulc Kiełbik I., **Przygodzka P.**, Sulowska Z. Antitumoral activity of Nitric oxide-releasing compounds. IV International workshop on Nitric oxide Institute of Biomedicine of Sevilla (IBiS) Sevilla, Spain March 13-14, 2015; wykład na zaproszenie (M Klink)
26. **Przygodzka P.**, Papiewska-Pajak I., Kryczka J., Sobierajska K., Kowalska M.A., Boncela J. New players in the early stages of colon cancer metastasis – transcriptional changes orchestrated by SNAIL. The 6th EMBO Meeting 2015, 5-8 September, Birmingham, United Kingdom, A 208, p.92; plakat
27. Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Boncela J., Kowalska M.A. Colorectal Cancer Cell Line HT29 Secrete Microvesicles that Can Be Incorporated into Cells Constituting Metastatic Niche.” The 42nd Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers „Oncology in the biomarker era: Biology-Diagnostics-Therapy. ISOBM 2015, 3-7 October, Zakopane; Tumor Biology, volume 36, Issue 1 Supplement, PP-49, plakat
28. **Przygodzka P.**, Papiewska-Pajak I., Kryczka J., Sobierajska K., Kowalska M.A., Boncela J. New Players in the Early Stages of Colon Cancer Metastases - Transcriptional Changes Orchestrated by SNAIL. The 42nd Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers „Oncology in

- the biomarker era: Biology-Diagnostics-Therapy” ISOBM 2015 , 3-7 October, Zakopane; Tumor Biology, volume 36, Issue 1 Supplement, PP-53; plakat
29. Piątek P., Domowicz M., Lewkowicz N., **Przygodzka P.**, Matysiak M., Dzitko K., Selmaj K.W., Lewkowicz P. Anti-AQP4 autoantibody, C5a, neutrophils and glutamate - four necessary, related components essential for neuromyelitis optica inflammation. Abstract: EP1456; 7th The European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (joint with ACTRIMS) Meeting 25 - 28 October 2017, Paris, France; plakat
 30. Krzywińska A., Boncela J., **Przygodzka P.**, Galdyszyńska M., Ciosek J., Drobnik J. Induction of expression changes of the integrin subunit alpha 2 (ITGA2) in human heart fibroblast cultures. Oral presentation S1.8 (Drobnik J); 27th Congress of The Polish Physiological Society, Journal of Physiology and Pharmacology 2017 Sept; vol. 68, suppl.1, p.33; plakat
 31. Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Michlewska S., Krzyżanowski D., Boncela J., Kowalska M.A. Extracellular vesicles secreted by colorectal cancer cell line HT29 overexpressing Snail can fuse with and activate the cells constituting metastatic niche. BIO 2018 Congress Gdańsk, Poland, September 2018 Acta Biochimica Polonica Vol 65 No S2 (2018): Supplement: Book of Abstracts Link: <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/issue/view/42> Congress BIO 2018 Session 17: Tumor Microenvironment in Cancer Progression Page 105 O17.4; plakat
 32. **Przygodzka P.**, Papiewska-Pajak I., Bogusz H., Boncela J., Kowalska M.A. Snail regulation of microRNAs during epithelial-to-mesenchymal transition in HT29 colorectal cancer cells. BIO 2018 Congress Gdańsk, Poland, September 2018 Acta Biochimica Polonica Vol 65 No S2 (2018): Supplement: Book of Abstracts Link: <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/issue/view/42> Congress BIO 2018 Session 17: Tumor Microenvironment in Cancer Progression Page 107 P17.3; plakat
 33. Papiewska-Pajak I., **Przygodzka P.**, Michlewska S., Krzyżanowski D., Boncela J., Kowalska M.A. Snail modulates extracellular vesicles-mediated interleukin release by cells constituting premetastatic niche in human colorectal cancer. ISEV2018, Hiszpania, Barcelona 02-06.05.2018 r. (2018) ISEV2018 abstract book, Journal of Extracellular Vesicles Volume 7, 2018 - Issue suppl: ISEV 2018 abstract book Link: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2018.1461450> ISEV 2018 abstract book Page 233 PS07.06; plakat
 34. Sochacka E., Soboska K., **Przygodzka P.** Charakterystyka linii komórkowych raka jelita grubego i odbytnicy pod względem ekspresji neuromedyny U. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN ŁÓDŹ, 24 – 25.05.2018 r. Poster P.98; plakat
 35. Soboska K., Sochacka E., **Przygodzka P.**, Boncela J. Neuromedin U as a potential colorectal cancer microenvironment modulator. European Association for Cancer Research (EACR) 2nd joint EACR-MRS Conference "Seed and Soil - mechanisms of metastasis" 07-09 October 2019 Berlin, Germany; poster session, poster no. 104, Abstract book page 139; plakat
 36. Sochacka E., Soboska K., **Przygodzka P.**, Boncela J. Neuromedin U is implicated in colorectal cancer cells invasiveness. European Association for Cancer Research (EACR) 2nd joint EACR-MRS Conference "Seed and Soil - mechanisms of metastasis" 07-09 October 2019 Berlin, Germany; poster session, poster no. 105, Abstract book page 140; plakat
 37. Soboska K., Sochacka E., Pacholczyk M., Papiewska-Pajak I., Braun M., Kiełbik M., Boncela J., **Przygodzka P.** Neuromedin U as a modulator of CRC microenvironment – induction of colorectal cancer cells and macrophages motility. 18th Biennial Congress of the Metastasis Research Society, November 15 – 17, 2021; poster no. 75; plakat

38. Soboska K., Sochacka E., Pacholczyk M., Papiewska-Pająk I., Braun M., Kassassir H., Kiełbik M., Boncela J., **Przygodzka P.** Modulation of colorectal cancer microenvironment by neuromedin U secreted by cancer cells - the importance of functional tumour associated cells in cancer invasiveness research. EACR conference Seed and Soil: In Vivo Models of Metastasis Virtual Event, Worldwide: 25 - 26 January 2022 POSTER NO. 21; plakat
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

a) Nagrody

- Nagroda uznaniowa Dyrektora Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi dla Sekretarza Rady Naukowej IBM PAN za wzorowe wywiązywanie się z obowiązków służbowych – 2012 r.
- Nagroda uznaniowa Dyrektora Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi za uzyskane osiągnięcia 1° - 2016, 2017, 2018, 2020 r. i 2° - 2019 r.
- Nagroda uznaniowa Dyrektora Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi za współautorstwo publikacji ukazujących się w czasopismach wyróżnionych przez JCR, lista A wydanych drukiem w 2016 roku – 2017 r.
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia uzyskane w 2021 r. za wkład w cykl publikacji pt.: "Proces zapalny jako wspólny czynnik towarzyszący chorobom cywilizacyjnym (cukrzyca typu 2 oraz zaburzeniom depresyjnym) – aspekty epigenetyczne i terapeutyczne"

b) Wyróżnienia

Zdjęcie obrazujące neutrofile produkujące interleukinę 10 wykonane przeze mnie za pomocą mikroskopii konfokalnej w ramach mojej współpracy z Prof. Przemysławem Lewkowiczem (UMED, Łódź) zostało docenione przez edytorów z Nature Publishing Group i znalazło się na okładce numeru Mucosal Immunology vol. 9(2) w marcu 2016 r.

c) Nawiązana współpraca z badaczami z Polski

W ramach mojej aktywności z zakresu obrazowania konfokalnego nawiązałam współpracę z prof. Przemysławem Lewkowiczem z Zakładu Immunogenetyki Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Nasza współpraca zaowocowała między innymi powstaniem czterech wysokopunktowanych publikacji.

Oprócz bardzo owocnej współpracy w ramach zespołu projektowego (Sonata Bis 6), nawiązałam nową, cenną współpracę, dzięki której zakres badań dotyczących neuromedyny U mógł zostać znacznie poszerzony. Wśród osób z którymi nawiązałam współpracę należy wymienić dr Marcina Pacholczyka, specjalistę w zakresie analizy baz danych (Instytut Automatyki, Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej) i dr Marcina Brauna, specjalistę w zakresie przygotowania i analizy preparatów immunohistochemicznych (Zakład Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

d) Nawiązana współpraca międzynarodowa

W ramach stażu doktorskiego, który odbywałam w Katedrze Biochemii Medycznej i Biofizyki Uniwersytetu w Umeå w Szwecji nawiązałam cenną współpracę z prof. Torem Ny oraz jego zespołem w zakresie biologii serpin, z prof. Richardem Lundmarkiem w zakresie barwienia fluorescencyjnego komórek i obrazowania konfokalnego, z zespołem prof. Andrei'a Chabes'a w zakresie analiz cytometrycznych. Po powrocie do Polski, w roku 2011, przygotowałam i zgłosiłam w konkursie Pomost (Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej) projekt badawczy zatytułowany: „Rola matryny 3 w funkcji neuronów i chorobie Alzheimera”, w którym zaplanowana była współpraca z prof. Ludmillą Morozową-Roche z Uniwersytetu Umeå, niestety projekt nie uzyskał finansowania. Część kontaktów utrzymuję do dziś, a nawiązana współpraca stanowiła wsparcie realizowanych już w Polsce projektów związanych z badaniami serpin, m.in. otrzymaliśmy od prof. Małgorzaty Wilczyńskiej wektory do kontrolowanej nadekspresji genów kodujących serpiny.

Pytania pojawiające się podczas badań nad neuromedyną U w ramach projektu własnego, Sonata Bis 6, sprowokowały moje poszukiwania specjalistycznego wsparcia od strony chemii peptydów. W sprawie mojego projektu napisałam do prof. Stevena Balleta (Vrije Universiteit Brussel), który entuzjastycznie odniósł się do naszych obserwacji i zaoferował przesłanie agonistów receptorów dla NMU, które umożliwiły nam kontynuację badań nad aktywacją receptorów na komórkach RJG. Nawiązana w ten sposób współpraca zaowocowała wspólną publikacją i wspólnym przygotowaniem jednego z zadań badawczych w kolejnym projekcie dotyczącym NMU (Opus 21), który uzyskał finansowanie i rozpoczął się we wrześniu 2022 r.

e) Szkolenia i kursy

2003/12	"Flow cytometry methods - research and diagnostic" – Uniwersytet Łódzki
2007/11	"Molecular cloning" - Umeå University, 901 87 Umeå, Sweden
2010/04	"Gene expression School" - Applied Biosystems, Warszawa
2011/10	"Self-presentation and public speaking" – Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Warszawa
2014/10	"Project Management in a Nutshell" - Ster dla B+R, Warszawa
2020/05	"Prism Academy – GraphPad" – kurs on-line
2020/06	"EndNote Online Course - Become an Expert Today" – kurs on-line

Bibliografia

- [1] E. Dekker, P.J. Tanis, J.L.A. Vleugels, P.M. Kasi, M.B. Wallace, Colorectal cancer, *Lancet*, 394 (2019) 1467-1480.
- [2] Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022, American Cancer Society, (2020).
- [3] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin*, 71 (2021) 209-249.
- [4] E. Koncina, S. Haan, S. Rauh, E. Letellier, Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges, *Cancers (Basel)*, 12 (2020).
- [5] J.P. Pei, C.D. Zhang, X. Fu, Y. Ba, S. Yue, Z.M. Zhao, D.Q. Dai, A Novel TNM Classification for Colorectal Cancers based on the Metro-ticket Paradigm, *J Cancer*, 12 (2021) 3299-3306.
- [6] J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang, A. de Reynies, A. Schlicker, C. Soneson, L. Marisa, P. Roepman, G. Nyamundanda, P. Angelino, B.M. Bot, J.S. Morris, I.M. Simon, S. Gerster, E. Fessler, E.M.F. De Sousa, E. Missiaglia, H. Ramay, D. Barras, K. Homicsko, D. Maru, G.C. Manyam, B. Broom, V. Boige, B. Perez-Villamil, T. Laderas, R. Salazar, J.W. Gray, D. Hanahan, J. Tabernero, R. Bernards, S.H. Friend, P. Laurent-Puig, J.P. Medema, A. Sadanandam, L. Wessels, M. Delorenzi, S. Kopetz, L. Vermeulen, S. Tejpar, The consensus molecular subtypes of colorectal cancer, *Nat Med*, 21 (2015) 1350-1356.
- [7] H. Sawayama, Y. Miyamoto, K. Ogawa, N. Yoshida, H. Baba, Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification, *Ann Gastroenterol Surg*, 4 (2020) 528-539.
- [8] A.M. Khaliq, C. Erdogan, Z. Kurt, S.S. Turgut, M.W. Grunvald, T. Rand, S. Khare, J.A. Borgia, D.M. Hayden, S.G. Pappas, H.R. Govekar, A.E. Kam, J. Reiser, K. Turaga, M. Radovich, Y. Zang, Y. Qiu, Y. Liu, M.L. Fishel, A. Turk, V. Gupta, R. Al-Sabti, J. Subramanian, T.M. Kuzel, A. Sadanandam, L. Waldron, A. Hussain, M. Saleem, B. El-Rayes, A.A. Salahudeen, A. Masood, Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas, *Genome Biol*, 23 (2022) 113.
- [9] M.A. Nieto, R.Y. Huang, R.A. Jackson, J.P. Thiery, EMT: 2016, *Cell*, 166 (2016) 21-45.
- [10] J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y. Huang, M.A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, 139 (2009) 871-890.
- [11] A. Dongre, R.A. Weinberg, New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20 (2019) 69-84.
- [12] E.D. Williams, D. Gao, A. Redfern, E.W. Thompson, Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis, *Nat Rev Cancer*, 19 (2019) 716-732.
- [13] N.A. Giraldo, R. Sanchez-Salas, J.D. Peske, Y. Vano, E. Becht, F. Petitprez, P. Validire, A. Ingels, X. Cathelineau, W.H. Fridman, C. Sautès-Fridman, The clinical role of the TME in solid cancer, *Br J Cancer*, 120 (2019) 45-53.
- [14] Y. Peng, C.M. Croce, The role of MicroRNAs in human cancer, *Signal Transduct Target Ther*, 1 (2016) 15004.
- [15] A.Y. Qin, X.W. Zhang, L. Liu, J.P. Yu, H. Li, S.Z. Wang, X.B. Ren, S. Cao, MiR-205 in cancer: an angel or a devil?, *Eur J Cell Biol*, 92 (2013) 54-60.
- [16] Y. Liu, X. Hu, L. Hu, C. Xu, X. Liang, Let-7i-5p enhances cell proliferation, migration and invasion of ccRCC by targeting HABP4, *BMC Urol*, 21 (2021) 49.
- [17] J. Song, L. Wang, Q. Ma, Y. Yang, Z. Yang, B. Wang, N. He, Let-7i-5p inhibits the proliferation and metastasis of colon cancer cells by targeting kallikrein-related peptidase 6, *Oncol Rep*, 40 (2018) 1459-1466.
- [18] J. van der Werf, C.V. Chin, N.I. Fleming, SnoRNA in Cancer Progression, Metastasis and Immunotherapy Response, *Biology (Basel)*, 10 (2021).
- [19] R. Jain, U. Watson, L. Vasudevan, D.K. Saini, ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs, *Int Rev Cell Mol Biol*, 338 (2018) 79-109.
- [20] A. De Prins, C. Martin, Y. Van Wanseele, L.J. Skov, C. Tomboly, D. Tourwe, V. Caveliers, A. Van Eeckhaut, B. Holst, M.M. Rosenkilde, I. Smolders, S. Ballet, Development of potent and proteolytically stable human neuromedin U receptor agonists, *Eur J Med Chem*, 144 (2018) 887-897.
- [21] S. Hou, J. Wang, W. Li, X. Hao, Q. Hang, Roles of Integrins in Gastrointestinal Cancer Metastasis, *Front Mol Biosci*, 8 (2021) 708779.

- [22] M.L. Pinto, E. Rios, C. Duraes, R. Ribeiro, J.C. Machado, A. Mantovani, M.A. Barbosa, F. Carneiro, M.J. Oliveira, The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer, *Front Immunol*, 10 (2019) 1875.
- [23] J.W. Franses, N.C. Drosu, W.J. Gibson, V.C. Chitalia, E.R. Edelman, Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis, *Int J Cancer*, 133 (2013) 1334-1344.
- [24] Y. Ye, Z. Liang, L. Xue, Neuromedin U: potential roles in immunity and inflammation, *Immunology*, 162 (2021) 17-29.
- [25] A.M. Malik, S.J. Barnada, Matrin 3 in neuromuscular disease: physiology and pathophysiology, *JCI Insight*, 6 (2021).

.....
(podpis wnioskodawcy)