

# **Autoreferat**

**Dr n. med. Natalia Vydra**

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów  
im. Profesora Mieczysława Chorażego  
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie –  
Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Gliwicach

**Gliwice, 2022**

**1. Imię i nazwisko:** Natalia Vydra**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

**21.09.2005** uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dyscyplinie „Biologia medyczna” uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii-Institutu im. Marii Skłodowskiej-Curie na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Disruption of spermatogenesis by the spermatocyte-specific expression of a constitutively active heat shock transcription factor 1 (HSF1) in the testes of transgenic mice”, promotor prof. Zdzisław Krawczyk. Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Centrum Onkologii – Institutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

**16.06.2000** uzyskanie dyplomu magistra biologii (z wyróżnieniem) po odbyciu studiów na Wydziale Biologii i Ekologii Grodzieńskiego Uniwersytetu Państwowego im. J. Kupały (Grodno, Białoruś) w latach 1995-2000.

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

|                     |                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2010 – nadal</b> | Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Profesora Mieczysława Chorażego, Narodowy Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach; na stanowisku adiunkta |
| <b>2005 – 2010</b>  | Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Institut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach; na stanowisku adiunkta                                                                                                      |
| <b>2004 – 2005</b>  | Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Institut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach; na stanowisku biologa, ½ etatu                                                                                              |
| <b>2003</b>         | Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Institut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, stypendium Kasy im. J. Mianowskiego (Fundacja na rzecz Nauki Polskiej); staż naukowy                                        |
| <b>2000 – 2002</b>  | Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Institut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, stypendium National Cancer Institute (NCI-NIH, Bethesda, USA); staż naukowy                                                 |
| <b>2000 – 2001</b>  | doktorant studiów doktorskich Institutu Biochemii Narodowej Akademii Białorusi, Grodno, Białoruś                                                                                                                                        |
| <b>2000</b>         | Institut Biochemii Narodowej Akademii Białorusi, Grodno, Białoruś; na stanowisku laboranta.                                                                                                                                             |

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.****4.1. Omówienie osiągnięć naukowych będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej.**

Podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego stanowi **cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych zatytułowany „Rola czynnika transkrypcyjnego HSF1 w komórkach nowotworowych”**, które zostały opublikowane w okresie 2012-2021 (w czasopiśmie o łącznym Impact Factor = 30,695, Załącznik 6).

**Prace tworzące cykl habilitacyjny:****I. Prace oryginalne:**

[1]. **Vydra N\***, Toma A, Glowala-Kosinska M, Gogler-Pigłowska A, Widlak W. Overexpression of Heat Shock Transcription Factor 1 enhances the resistance of melanoma cells to doxorubicin and paclitaxel. *BMC Cancer*. 2013; 13: 504. doi: 10.1186/1471-2407-13-504.

**\*główny badacz, autor korespondencyjny, IF = 3,319, 5-letni IF = 4,372**

[2]. Toma-Jonik A, Widlak W, Korfanty J, Cichon T, Smolarczyk R, Gogler-Pigłowska A, Widlak P, **Vydra N\***. Active heat shock transcription factor 1 supports migration of the melanoma cells via vinculin down-regulation. *Cell Signal*. 2015; 27: 394-401. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.11.029.

**\*główny badacz, autor korespondencyjny, IF = 4,191, 5-letni IF = 4.035.**

[3]. **Vydra N\***, Janus P, Toma-Jonik A, Stokowy T, Mrowiec K, Korfanty J, Długajczyk A, Wojtaś B, Gielniewski B, Widlak W. 17  $\beta$ -Estradiol Activates HSF1 via MAPK Signaling in ER $\alpha$ -Positive Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(10):1533. doi: 10.3390/cancers11101533.

**\*jeden z dwóch głównych badaczy (Vydra N i Janus P w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy), autor korespondencyjny, IF = 6,126, 5-letni IF = 6.999.**

[4]. **Vydra N\***, Janus P, Kuś P, Stokowy T, Mrowiec K, Toma-Jonik A, Krzywón A, Cortez AJ, Wojtaś B, Gielniewski B, Jaksik R, Kimmel M, Widlak W. Heat Shock Factor 1 (HSF1) cooperates with ER $\alpha$  in the regulation of estrogen action in breast cancer cells. *Elife*. 2021; 10:e69843. doi: 10.7554/eLife.69843.

**\*jeden z trzech głównych badaczy (Vydra N, Janus P i Kuś P w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy), autor korespondencyjny, IF = 8,146, 5-letni IF = 9,059.**

**II. Prace przeglądowe:**

[5]. Toma A, Widlak W, **Vydra N\***. Rola czynnika transkrypcyjnego HSF1 w procesie nowotworzenia. *Postępy Biologii Komórki*. 2012; 39: 269–288.

**\*autor korespondencyjny, IF = 0,087**

[6]. **Vydra N\***, Toma A, Widlak W. Pleiotropic role of HSF1 in neoplastic transformation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;14: 144-55. doi: 10.2174/1568009614666140122155942.

**\*autor korespondencyjny, IF = 3,428, 5-letni IF = 3,522**

[7]. Toma-Jonik A, **Vydra N\***, Janus P, Widlak W. Interplay between HSF1 and p53 signaling pathways in cancer initiation and progression: non-oncogene and oncogene addiction. *Cell Oncol (Dordr)*. 2019; 42(5):579-589. doi: 10.1007/s13402-019-00452-0

**\*współautor, IF = 5,304, 5-letni IF = 5.839**

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie wskazanych publikacji naukowych znajdują się w Załączniku 7.

**Wprowadzenie:**

Czynnik transkrypcyjny HSF1 (ang. Heat Shock Factor 1) został opisany w latach 80-tych XX wieku jako regulator ekspresji genów kodujących białka szoku cieplnego (ang. Heat Shock Proteins, HSPs). Jego rola jako głównego regulatora odpowiedzi na stres została udowodniona w licznych eksperymentach biochemicznych i genetycznych. Wiele modeli eksperymentalnych ujawniło rolę HSF1 także w procesach biologicznych związanych z dojrzewaniem komórek płciowych, odpowiedzią immunologiczną, aktywnością ruchową, węchem, słuchem i pamięcią (przegląd w Vydra i Widłak, 2017).

HSF1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych HSF, do której u kręgowców zaliczane również HSF2, HSF3, HSF4, HSF5, HSFX, oraz HSFY. Każdy z tych czynników jest odmiennie regulowany i w odmienny sposób wpływa na transkrypcję genów. HSF1 odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi komórek na tzw. stres proteotoksyczny, prowadzący do nagromadzenia białek o nieprawidłowej strukturze, np. w wyniku szoku termicznego. W warunkach fizjologicznych HSF1 egzystuje jako nieaktywny monomer w kompleksie z m.in. białkami opiekuńczymi należącymi do rodziny HSP (głównie HSP90), PTGES3 (p23) i FKBP4 (immunofilina). W wyniku działania czynników prowadzących do nagromadzenia białek o nieprawidłowej strukturze, białka HSP odłączają się od HSF1, aby pełnić swoje funkcje opiekuńcze wobec innych białek. Zwolniony HSF1 tworzy homotrimery, równocześnie zmienia się wzór jego fosforylacji (za kluczową dla aktywacji jest uważana Ser326). Aktywny HSF1 wiąże się z określonymi rejonami w genomie, z tzw. sekwencją HSE (ang. Heat Shock Element). Geny *HSP*, kodujące białka HSP, stanowią główną grupę molekularnych celi regulowanych przez zaktywowany HSF1. Synteza białek HSP ułatwia przeżycie komórkom z uszkodzonymi makrocząsteczkami (np. zdenaturowanymi białkami) i zwiększa ich odporność na działanie czynników indukujących śmierć komórkową. Oprócz zdolności do indukcji transkrypcji genów *HSP*, HSF1 może hamować aktywację niektórych genów, głównie cytokin prozapalnych biorących udział w reakcjach immunologicznych.

Ponad 10 lat temu wykazano również, że HSF1 sprzyja transformacji nowotworowej (Dai i wsp., 2007). Mechanizm aktywacji i regulacji HSF1 w komórkach nowotworowych wciąż jest nie do końca wyjaśniony, lecz jego zwiększona ekspresja jest charakterystyczna dla wielu typów nowotworów (m.in. prostaty, jamy ustnej, jelita grubego, wątroby, piersi i innych; przegląd w Vydra i wsp., 2014). Aktywacja HSF1 w komórkach nowotworowych może wynikać ze stresu proteotoksycznego (jako efekt zwiększonego obrotu białkami), a także z powodu fosforylacji aktywujących, związanych z rozregulowaniem szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych. Przyjmuje się, że HSF1 nie ma charakteru klasycznego onkogenu czy też supresora wzrostu nowotworowego, lecz jego aktywność może wpływać na różne procesy komórkowe istotne dla fenotypu nowotworowego. Taki mechanizm jest znany jako „non-oncogenic addiction” (Nagel i wsp., 2016). W ostatnich latach przyjmuje się, że celowanie w białka związane z „non-oncogenic addiction” może być strategią terapeutyczną w leczeniu raka. Zaletą takiej strategii jest jej niewielki wpływ na komórki prawidłowe.

**Cel naukowy:**

W momencie rozpoczęcia naszych badań, mimo wykazania zwiększonej ekspresji HSF1 w komórkach nowotworowych, jego rola w kształtowaniu fenotypu nowotworowego nie była dobrze poznana. HSF1 reguluje ekspresję cytoprotekcyjnych białek z rodziny HSP. Tym samym może on ułatwiać przeżycie komórkom z uszkodzonymi makrocząsteczkami i zwiększać oporność komórek nowotworowych na działanie czynników indukujących śmierć komórkową. Zatem postanowiłam zbadać, czy aktywacja HSF1 oraz zależnej od niego odpowiedzi na stres może mieć znaczenie w powstaniu oporności wielolekowej, która jest jedną z przyczyn niepowodzenia

terapii przeciwnowotworowej oraz częstej wznowy procesu nowotworowego po zakończeniu terapii. Kolejnym kierunkiem badań było wyjaśnienie czy i jak HSF1 wpływa na wzrost komórek nowotworowych, ich zdolność do wzrostu niezależnego od podłoża i migracji. W tym celu skonstruowałam model badawczy: komórki czerniaka z ekspresją aktywnego transkrypcyjnie HSF1. Następne badania były nakierowane na zbadanie roli HSF1 w utrzymaniu fenotypu komórek nowotworowych raka piersi, a w szczególności jego możliwej aktywacji pod wpływem działania estrogenów.

### **Uzyskane wyniki:**

#### **(1) Komórki czerniaka ze zwiększoną ekspresją HSF1 wykazują selektywną chemooporność, która nie zależy od akumulacji HSP, ale od zwiększonego wyrzutu leków (Vydra i wsp., 2013).**

Oporność komórek nowotworowych na działanie czynników terapeutycznych (chemoodporność) uważana jest za główną przyczynę niepowodzeń terapii i śmierci pacjentów z chorobami nowotworowymi. Oporność na leki jest zjawiskiem pleiotropowym, w które zaangażowane są różne mechanizmy, zarówno komórkowe i biochemiczne (np. upośledzone gromadzenie leków w komórkach, nasilenie mechanizmów naprawy, i inne), jak i anatomiczne (np. naturalne bariery w organizmie jak krew-mózg, krew-jądra). Do mechanizmów biochemicznych sprzyjających rozwojowi oporności komórek na leki zalicza się zmiany w zdolności komórek do uruchamiania apoptozy, najczęściej wynikające z zaburzeń w równowadze białek anty- i pro-apoptotycznych. Białka HSP (w szczególności HSPA1 i HSPB1), dobrze znane ze swoich właściwości cytoprotekcyjnych, mogą hamować aktywację śmierci komórek na drodze apoptozy. Podwyższona ekspresja kilku HSP, m.in. HSP90, HSPA1, HSPB8 w niektórych nowotworach złośliwych wiąże się z odpornością komórek rakowych na apoptozę indukowaną chemoterapeutykami (Mosser i wsp., 2004). Jak wspomniałam wyżej, HSF1 jest głównym regulatorem ekspresji HSP. Postawiłam więc hipotezę, że aktywacja zależnej od HSF1 odpowiedzi na stres (m.in. związanej z uruchomieniem ekspresji HSP) może mieć działanie cytoprotekcyjne i zwiększać przeżycie komórek nowotworowych poddanych działaniu chemoterapeutyków. W celu potwierdzenia tej hipotezy skonstruowałam model badawczy mysich (B16F10) i ludzkich (WM793B i 1205Lu) komórek czerniaka z ekspresją konstytutywnie aktywnego mutantu HSF1 (z delecją domeny regulatorowej, aa 221-315:  $\Delta$ RD). Ta zmutowana forma HSF1 (nazwana HSF1 $\Delta$ RD lub aHSF1) wykazuje zdolność do wiązania do DNA i aktywacji ekspresji indukowalnych genów *Hsp70i* już w temperaturze fizjologicznej (Vydra i wsp., 2006). Dodatkowo skonstruowałam komórki ze zwiększoną ekspresją HSF1 (hHSF1) oraz z ekspresją mutantu blokującego wiązanie prawidłowego HSF1 do DNA, tzw. „dominant-negative” (HSF1-DN). Potwierdzono prawidłowe działanie modelu, wykazując wzrost ekspresji indukowalnych genów *HSP* (*HSPH1*, *HSPB1*, *HSPA1*) w komórkach z ekspresją aHSF1 lub hHSF1, oraz zahamowanie ekspresji genów *HSP* w komórkach z ekspresją HSF1-DN. Komórki traktowałam czynnikami cytotoksycznymi: doksorubicyną, dakarbazyną, paklitakselem, winblastyną lub bortezomibem. Zauważyłam, że zwiększona ekspresja HSF1 zwiększała przeżycie komórek traktowanych doksorubicyną bądź paklitakselem. Co ciekawe, taka selektywna oporność komórek czerniaka na doksorubicynę nie była zależna od bezpośredniej aktywności transkrypcyjnej HSF1 i ekspresji HSP zależnych od HSF1. Wydaje się, że obecność HSP może być drugorzędnym efektem aktywności HSF1, podczas gdy mechanizmy zależnej od HSF1 oporności komórek nowotworowych na doksorubicynę mogą być powiązane z jego interakcjami z innymi białkami i/lub jego wpływem na ekspresję genów innych niż *HSP*. Poszukując mechanizmu zaangażowanego w zależną od HSF1 oporność komórek nowotworowych na doksorubicynę, wykazałam, że komórki ze zwiększoną ekspresją HSF1 (hHSF1) posiadały lepszą zdolność do wyrzutu na zewnątrz komórki (ang. efflux) związków fluorescencyjnych, takich jak doksorubicyna, rodamina 123 oraz Hoechst 33342.

Korelowało to ze zwiększoną transkrypcją kilku transporterów ABC, m.in. *ABCB1* i *ABCC1*. Ekspresja genu *Abcb1b/ABCB1* była zależna od HSF1 we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych czerniaka, wykazujących zwiększoną ekspresję HSF1. Natomiast ekspresja transporterów nie zwiększała się w komórkach czerniaka z ekspresją aktywnej transkrypcyjnie formy HSF1, sugerując tym samym, że aktywność transkrypcyjna HSF1 nie jest istotna w regulacji ekspresji genów ABC. Podobny efekt lekooporności związanej ze zwiększoną ekspresją *ABCB1* zależną od HSF1 był opisany dla komórek kostniakomięsaka U2-OS oraz komórek wątrobiaka HepG2 (Tchénio i wsp., 2006). Co ciekawe, w komórkach z nadekspresją HSF1 zaobserwowałam wzrost frakcji komórek SP (ang. side population), które posiadają właściwości równoważne komórkom macierzystym.

Podsumowując, nasze badania wskazują na udział HSF1 w kształtowaniu oporności wielolekowej. Nie jest to efekt bezpośrednio zależny od białek HSP i wynika raczej ze zwiększonej ekspresji genów ABC. Aktywność transkrypcyjna HSF1 nie jest wymagana do uzyskania tego efektu, co wskazuje na inne (pozatranskrypcyjne) mechanizmy działania HSF1 w regulacji ekspresji genów ABC.

## **(2) Obecność aktywnego HSF1 sprzyja migracji komórek nowotworowych w modelu mysiego czerniaka (Toma-Jonik i wsp., 2015).**

W czasie, gdy rozpoczynaliśmy badania nakierowane na ustalenie roli HSF1 w kształtowaniu fenotypu komórek nowotworowych, dane literaturowe wskazywały na jego rolę we wzroście komórek niezależnym od podłoża (Khaleque i wsp., 2005), w regulacji ścieżek sygnałowych RAS/MAPK i cAMP/PKA, oraz utrzymaniu wzrostu komórek nowotworowych w warunkach braku czynników wzrostu i aktywacji glikolizy (Dai i wsp., 2007).

W celu wykazania roli HSF1 w kształtowaniu fenotypu komórek nowotworowych postanowiłam zastosować model komórek mysiego czerniaka B16F10. Komórki te posiadają zdolność do tworzenia guzów po wszczepieniu myszom szczepu C57BL/6 podskórnie oraz do przerzutowania po wszczepieniu do żyły ogonowej. Ponadto, wykazują się brakiem aktywacji HSF1 w normalnych warunkach hodowli *in vitro*. Aktywacja HSF1 zachodzi w nich pod wpływem szoku termicznego (wzrost temperatury o kilka stopni). W celu uzyskania aktywacji HSF1 bez konieczności stosowania szoku termicznego skonstruowaliśmy komórki z ekspresją konstytutywnie aktywnego czynnika HSF1 (aHSF1). Szereg analiz (*in vitro*) przeprowadziliśmy również na wybranych liniach ludzkich komórek nowotworowych czerniaka (WM793B i 1205Lu), które zmodyfikowaliśmy podobnie jak mysie komórki B16F10. W odróżnieniu do badań uzyskanych przez Dai i wsp. (2007), w naszych badaniach nie stwierdziliśmy znaczącego wpływu HSF1 na proliferację komórek czerniaka *in vitro* oraz na wzrost guzów *in vivo*. Niemniej jednak wykazałam, że ekspresja aktywnego transkrypcyjnie HSF1 zwiększała potencjał komórek B16F10 do tworzenia przerzutów *in vivo*. Ruchliwość komórek oraz wzrost niezależny od podłoża należą do ważnych mechanizmów wspierających tworzenie przerzutów. W naszym modelu badawczym wykazaliśmy, że obecność aktywnego transkrypcyjnie HSF1 wpłynęła na obie te cechy w komórkach B16F10, a także na ruchliwość ludzkich komórek 1205Lu czerniaka. Poszukując mechanizmu zależnych od HSF1 zmian w ruchliwości komórek wykazano, że ekspresja aktywnego HSF1 powodowała obniżenie ekspresji kilku genów kodujących białka związane z cytoszkieletem, m.in. winkuliny. Winkulina jest białkiem błonowo-cytoszkieletowym, które uczestniczy w zakotwiczeniu F-aktyny do błony komórkowej. W naszym modelu ustaliliśmy, że ekspresja aktywnego HSF1 korelowała ze słabszą adhezją komórek do fibronektyny oraz wpływała na cytoszkielet aktynowy, co może być związane z obniżoną ekspresją winkuliny.

Podsumowując powyższe wyniki otrzymane na modelu komórek czerniaka, stwierdziliśmy, że aktywacja HSF1 sprzyja ruchliwości komórek nowotworowych. Wśród potencjalnych

mechanizmów promujących ruchliwość komórek za pośrednictwem HSF1 może być regulacja ekspresji genów związanych z cytoszkieletem, m.in. winkuliny.

**(3) HSF1 jest aktywowany przez estrogen oraz wspiera zależną od estrogenów migrację komórek raka piersi modulując działanie receptora estrogenowego (ER $\alpha$ ) (Vydra i wsp., 2019; Vydra i wsp., 2021).**

Z badań opisanych powyżej wynika, że HSF1 wspomaga migrację komórek nowotworowych. Ruch komórek nowotworowych odgrywa istotną rolę w tworzeniu przerzutów, które uznaje się za główną przyczynę śmiertelności w chorobach nowotworowych, między innymi w raku piersi. W ostatnich dekadach liczba osób ze zdiagnozowanym rakiem piersi wciąż powiększa się. W Polsce rak piersi stanowi 1/4 zachorowań na nowotwory u kobiet i 1/8 zgonów z powodu choroby nowotworowej (Krajowy Rejestr Nowotworów). W 2011 roku ukazała się praca Santagata i wsp (2011), w której wykazano, że zwiększona ekspresja HSF1 w hormonozależnych nowotworach piersi (ER+, wykazujących ekspresję receptora estrogenowego alfa, ER $\alpha$ ), koreluje z gorszym rokowaniem pacjentek. Receptor estrogenowy należy do rodziny receptorów steroidowych hormonów płciowych, który aktywuje się w wyniku wiązania się z estrogenami (lub biomimetykami hormonalnymi). Zarówno estrogeny, jak i HSF1, są znane ze swojej roli wspierającej nowotworzenie. Natomiast niewiele wiadomo było na temat wzajemnych interakcji pomiędzy uruchamianymi przez nie szlakami sygnałowymi. Postawiłam więc pytanie, czy HSF1 i estrogeny mogą działać synergistycznie w komórkach nowotworowych, i czy mogą współdziałać w utrzymaniu fenotypu komórek nowotworowych hormonozależnego raka piersi.

Do badań możliwych interakcji ścieżek sygnałowych zależnych od HSF1 i estrogenu wykorzystałam linie komórek nowotworowych hormonozależnego raka piersi (MCF7 i T47D), HER2-dodatniego (SKBR3) i potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB 468, BT549) i 2 linie nietumorogenne, pochodzące od pacjentek chorych na mastopatię (MCF10A i MCF12A). Zaobserwowałam, że pod wpływem działania 17 $\beta$ -estradiolu (E2, który jest estrogenem o największym potencjale fizjologicznym) następuje fosforylacja HSF1 w pozycji Ser326 (związana z aktywnością transkrypcyjną), ale ma to miejsce tylko w komórkach wykazujących ekspresję ER $\alpha$  (MCF7 i T47D). Znaczenie ekspresji ER $\alpha$  dla zależnej od estradiolu fosforylacji HSF1 wykazałam w następnych doświadczeniach z wykorzystaniem ligandów aktywujących ER $\alpha$  takich, jak 4',4''-(4-propylo-[1H]-pirazolo-1,3,5-triyl)trisfenol (PPT) oraz bisfenol A (BPA) oraz w doświadczeniach z obniżeniem ekspresji ER $\alpha$  za pomocą swoistych siRNA oraz traktowania komórek MCF7 estradiolem w kombinacji z antagonistami ER $\alpha$ : 4-hydroksytamoksyfenem (4-OHT) lub ICI 182,780. Z literatury wiadomo, że kilka kinaz takich jak AKT, mTOR, kinazy rodziny p38/MAPK może uczestniczyć w fosforylacji HSF1 w pozycji Ser326. W naszych badaniach wykazałam, że w fosforylacji HSF1 stymulowanej przez E2 pośredniczy ścieżka sygnałowa zależna od kinaz MEK/ERK1.

W porównaniu do fosforylacji HSF1 zachodzącej w wyniku działania podwyższonej temperatury, fosforylacja HSF1 indukowana przez E2 wydaje się być umiarkowana. Przeprowadzona analiza wiązania HSF1 do promotorów kilku genów *HSP* (*HSPH1*, *HSPA1*, *HSPB8*) wykazała, że HSF1 aktywowany pod wpływem E2 jest aktywny transkrypcyjnie i nabywa zdolność do wiązania sekwencji regulatorowych genów *HSPH1*, *HSPB8*, ale nie *HSPA1*. Wykonana analiza wysokoprzepustowa identyfikacji miejsc wiązania HSF1 (ChIP-Seq) oraz wysokoprzepustowa analiza ekspresji genów (RNA-Seq) w komórkach MCF7 wykazała, że regulacja kilku genów, w tym *HSPB8*, *LHX4*, *PRKCE*, *WWC* i *GREB1* może być zależna od aktywacji HSF1 w komórkach traktowanych E2. Warto też zaznaczyć, że w porównaniu do liczby genów aktywowanych przez HSF1 w warunkach szoku cieplnego (ok. 7000), liczba genów aktywowanych pod wpływem E2

jest mniejsza, co odzwierciedla niższy poziom fosforylacji HSF1 zachodzący w wyniku działania E2.

Z badań opisanych wyżej wynika, że może istnieć hipotetyczna pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego między sygnalizacją E2/ER $\alpha$  i HSF1. Aktywacja ER $\alpha$  jest procesem wieloetapowym, w który są zaangażowane białka HSP (głównie HSP90) regulowane przez HSF1. Dodatkowo, aktywność transkrypcyjna ER $\alpha$  jest zależna od wielu innych białek, pełniących role ko-aktywatorów lub ko-represorów. Ekspresja genów regulowanych przez ER $\alpha$  może zachodzić przez zakotwiczenie ER $\alpha$  (ang. tethering) w chromatynie przy udziale innych czynników transkrypcyjnych takich jak AP1, STATs, ATF2/JUN, SP1, NF $\kappa$ B (Welboren i wsp., 2009). Za pomocą testu ligacji zbliżeniowej (ang. Proximity Ligation Assay) wykazałam, że również HSF1 oddziałuje z ER $\alpha$  po stymulacji E2. Analizując dane z badań genomicznych (własnych oraz dostępnych w bazie GEO) wykazaliśmy, że również HSF1 może być czynnikiem pośredniczącym w wiązaniu ER $\alpha$  do chromatyny. Stosując technikę wychwytywania konformacji chromosomów (3C) potwierdziliśmy udział HSF1 w zakotwiczeniu ER $\alpha$  i reorganizacji pętli chromatyny po stymulacji estrogenem. Tym samym po raz pierwszy wykazaliśmy, że HSF1 może być czynnikiem umożliwiającym zakotwiczenie ER $\alpha$  w chromatynie, oraz uczestniczy w tworzeniu pętli chromatyny łączących odległe geny w celu skoordynowanej regulacji ich transkrypcji.

Najbardziej znanym działaniem estrogenów poprzez aktywację ER $\alpha$  jest stymulacja procesów związanych z proliferacją. Istnieją również przesłanki wskazujące na możliwy udział sygnalizacji zależnej od estrogenu w regulowaniu ruchliwości i inwazji komórek hormonozależnego raka piersi (Planas-Silva i Waltz, 2007). Postanowiłam zbadać, jak obniżenie ekspresji HSF1 wpłynie na estrogeno-zależne procesy w hormonozależnych komórkach nowotworowych piersi. Skonstruowaliśmy modele eksperymentalne oparte na komórkach hormonozależnego raka piersi (MCF7 i T47D) z niedoborem HSF1 (HSF1 $^{-}$ ). W pierwszej kolejności zastosowaliśmy swoiste dla HSF1 shRNA (shHSF1) uzyskując około 10-krotne obniżenie poziomu HSF1, lecz ekspresja genów *HSP* nadal była indukowana przez szok termiczny. Skonstruowaliśmy więc komórki MCF7 z funkcjonalnym nokautem HSF1, stosując system edycji genomu CRISPR/Cas9 (uzyskaliśmy dwa modele badawcze stosując różne techniki wprowadzania składowych systemu do komórki). Całkowita eliminacja HSF1 wiązała się ze znaczną utratą ekspresji *HSP* w warunkach szoku cieplnego. Wykazałam, że komórki MCF7 z niedoborem HSF1 miały obniżone tempo proliferacji, zarówno w warunkach standardowej hodowli, jak i hodowane w obecności E2. Co więcej, potencjał do tworzenia klonów komórek MCF7 oraz populacja komórek o właściwościach komórek macierzystych były znacznie obniżone dla komórek HSF1 $^{-}$ . W odróżnieniu od komórek MCF7, brak ekspresji HSF1 w innej linii komórek hormonozależnego raka piersi, T47D, nie wpływał na ich tempo proliferacji i potencjał do tworzenia klonów. W przeciwieństwie do komórek MCF7, komórki T47D/HSF1 $^{-}$  rosły nieco szybciej, niż komórki HSF1 $^{+}$ , choć różnica nie była statystycznie istotna i nie zaobserwowano różnic w cyklu komórkowym. Tym samym wydaje się, że wpływ HSF1 na tempo proliferacji może być komórkowo-swoisty i zależeć od innych czynników (np. mutacji p53 obecnej w T47D). Porównując zdolność komórek HSF1 $^{+}$  i HSF1 $^{-}$  do migracji w obecności E2 wykazano, że dłuższa (kilkudniowa) stymulacja E2 sprzyja migracji komórek HSF1 $^{+}$ , której towarzyszy utrata połączeń międzykomórkowych, wzrost odsetka komórek o morfologii ameboidalnych lub mezenchymalnych, zwiększona adhezja do kolagenu. Brak ekspresji HSF1 prowadził do zmniejszenia liczby migrujących komórek MCF7, a także komórek T47D. Wyniki te są zgodne z wcześniejszą obserwacją, że HSF1 sprzyja migracji komórek nowotworowych (pkt. 2). Badając profil ekspresji genów w komórkach MCF7 z odmienną ekspresją HSF1 (HSF1 $^{+}$  vs HSF1 $^{-}$ ) wykazaliśmy, że około 20% genów odpowiada mniej skutecznie na stymulację E2 w komórkach MCF7 z niedoborem HSF1. Wśród nich znalazły się geny związane z regulacją proliferacji, migracji i adhezji, co pokrywa się z obserwacjami z doświadczeń funkcjonalnych.

W celu sprawdzenia czy poczynione przez nas obserwacje *in vitro* mogą mieć wartość prognostyczną dla pacjentek z hormonozależnym rakiem piersi przeprowadziliśmy analizę korelacji przeżycia chorych na raka piersi w zależności od poziomu transkryptu ER $\alpha$  i HSF1. W tym celu wykorzystaliśmy dane RNA-Seq zdeponowane w bazie danych TCGA. Analiza danych została przeprowadzona we współpracy z Politechniką Śląską (mgr Paweł Kuś, prof. Marek Kimmel). W odróżnieniu od danych uzyskanych przez Santagata i wsp. (2011) i Gökmen-Polar i wsp. (2016) nasza analiza nie wykazała istotnej wartości prognostycznej HSF1 i ER $\alpha$  dla przeżycia pacjentek z hormonozależnym rakiem piersi, gdy analizowano poziom transkryptów HSF1 lub ER $\alpha$  pojedynczo. Ich wpływ jest zauważalny tylko po wykluczeniu przypadków o umiarkowanym poziomie mRNA dla genów *ESR1*, kodującego receptor estrogenowy alfa (ER $\alpha$ ), lub *HSF1*. Ponadto wykazano, że raki ER+ stanowiły grupę, w których poziom ekspresji HSF1 był wyższy w nowotworach tworzących przerzuty, niż w przypadkach bez przerzutów. Tylko w grupie raków ER+ zaobserwowano proporcjonalny wzrost choroby przerzutowej wraz ze wzrostem ekspresji HSF1. Ta analiza danych z TCGA wykazująca korelację między rosnącym poziomem HSF1 a chorobą przerzutową w hormonozależnych rakach piersi potwierdza obserwacje z modelu *in vitro*, wskazującą, że HSF1 sprzyja ruchliwości komórek nowotworowych, która odgrywa ważną rolę w początkowej fazie przerzutowania.

Hormonoterapia, oparta na podaniu anty-estrogenów, jest jedną z metod leczenia hormonozależnego raka piersi zarówno u pacjentek przed, jak i po menopauzie. Niektóre przesłanki wskazują na związek wysokiego poziomu HSF1 z opornością hormonozależnych nowotworów piersi na terapię hormonalną (Santagata i in., 2011; Gökmen-Polar i Badve, 2016). W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek MCF7 i T47D wykazałam, że niedobór HSF1 może zwiększać wrażliwość na terapię hormonalną (4-hydroksytamoksyfen, 4-OHT) lub ostatnio stosowany w terapii raka piersi inhibitor CDK4/6 (palbocyklib). Co więcej, 4-OHT skuteczniej hamował stymulowaną przez E2 fosforylację ER $\alpha$  (która jest związana z jego aktywacją i może być związana z nabytą opornością na tamoksyfen) w komórkach z niedoborem HSF1.

Podsumowując powyższe wyniki, stwierdziliśmy, że HSF1 i ER $\alpha$  współpracują na wielu poziomach w odpowiedzi komórek hormonozależnego raka piersi na stymulację estrogenem. Zaangażowanie zależnych od HSF1 białek opiekuńczych w regulację aktywności ER $\alpha$  znane jest od dawna. Natomiast nasze badania wykazały, że estrogen poprzez ER $\alpha$  oraz ścieżkę MAPK aktywuje HSF1, który następnie wraz z ER $\alpha$  uczestniczy w reorganizacji chromatyny i tym samym stymuluje transkrypcję estrogeno-zależnych genów. Geny aktywowane przez ER $\alpha$  i HSF1 odgrywają ważną rolę w regulacji wzrostu i rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych.

### **Podsumowanie.**

Podsumowując wyniki badań przedstawionych w cyklu prac doświadczalnych, wykazałam, że:

#### **1. HSF1 przyczynia się do kształtowania fenotypu komórek nowotworowych opornego na leki.**

Zwiększona ekspresja HSF1 sprzyja selekcji komórek o zwiększonym potencjale do wyrzutu szkodliwych substancji na zewnątrz (np. doksorubicyny, paklitakselu). Ta funkcja HSF1 nie jest związana z regulacją ekspresji HSP, lecz raczej z jego wpływem na transkrypcję genów ABC, a kodowane przez nie białka aktywnie usuwają związki z komórki. Ponadto, badania *in vitro* wykazały znaczenie HSF1 w oporności komórek hormonozależnego raka piersi na leki stosowane w terapii hormonalnej (4-hydroksytamoksyfen) bądź terapii zaawansowanego raka piersi (palbocyklib).

#### **2. HSF1 znacząco wpływa na zdolność komórek nowotworowych do migracji.**

Wykazaliśmy to zarówno w modelu komórek czerniaka z ekspresją aktywnego transkrypcyjnie HSF1, jak i w komórkach hormonozależnego raka piersi. W przypadku komórek czerniaka może być to wynikiem zahamowania ekspresji genów związanych z oddziaływaniem

komórek z macierzą zewnątrzkomórkową. W hormonozależnych komórkach nowotworowych piersi wpływ HSF1 na ruchliwość komórek może być związany z jego aktywacją w wyniku działania estrogenów poprzez receptor ER $\alpha$  i kinazy MEK1/2, a następnie współdziałaniu z ER $\alpha$  w regulacji genów odpowiedzialnych za wzrost i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych. Naszą oryginalną obserwacją jest wykazanie, że HSF1 może być dodatkowym czynnikiem umożliwiającym zakotwiczenie ER $\alpha$  w chromatynie, uczestnicząc w tworzeniu i reorganizacji pętli chromatyny łączących odległe geny w celu skoordynowanej regulacji ich transkrypcji.

***Reasumując, nasze badania wskazują, że HSF1 może pełnić ważną rolę w progresji choroby nowotworowej w kierunku tworzenia przerzutów, sprzyjając migracji komórek oraz zwiększając oporność komórek nowotworowych na stosowane terapie.***

Podsumowanie funkcji HSF1 mających potencjalne znaczenie dla procesu nowotworzenia przedstawiliśmy w kilku pracach przeglądowych opublikowanych w *Postęпах Biologii Komórki* (Toma i wsp., 2012), w *Curr Cancer Drug Targets* (Vydra i wsp., 2014) oraz w *Cell Oncol* (Toma-Jonik i wsp., 2019).

#### **4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.**

Po ukończeniu studiów w czerwcu 2000 roku rozpoczęłam pracę w Instytucie Biochemii w Grodnie na stanowisku laboranta. W październiku zostałam doktorantem studiów doktorskich w Instytucie Biochemii w Grodnie, które z przyczyn formalnych zakończyłam w 2001. Na początku listopada 2000 roku otrzymałam dwuletnie stypendium finansowane przez NCI-Office of International Affairs (Bethesda, Stany Zjednoczone), które umożliwiło mi podjęcie badań naukowych w ówczesnym Zakładzie Biologii Nowotworów (Centrum Onkologii-Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach). Uzyskane w 2003 roku roczne stypendium Kasy im. J. Mianowskiego (Fundacja na rzecz Nauki Polskiej) pozwoliło kontynuować rozpoczęte badania, a od kwietnia 2004 zostałam zatrudniona na ½ etatu na stanowisku biologa, po obronie pracy doktorskiej w 2005 – na cały etat na stanowisku adiunkta naukowo-badawczego.

Włączyłam się w prace badawcze grupy kierowanej przez prof. Zdzisława Krawczyka. Przedmiotem badań była charakterystyka struktury promotora indukowalnego przez stres genu *Hspa1b* i swoistego dla jąder genu *Hspa2* szczura. Geny te zostały wykryte, sklonowane i wstępnie scharakteryzowane w wyniku badań prowadzonych przez zespół w latach 90-ch ubiegłego stulecia. Uczestniczyłam w badaniach nakierowanych na zrozumienie mechanizmu aktywacji promotora genu *Hspa1b* szczura pod wpływem niektórych nośników DNA opartych na liposomach. Ta obserwacja została poczyniona podczas badań funkcjonalnych nakierowanych na badanie aktywności promotora genu *Hspa1b* szczura w odpowiedzi na stres, opartych na lipofekcji konstruktów do komórek. Sklonowałam kilka konstruktów plazmidowych zawierających sekwencje regulatorowe promotora genu *Hsp1b*, sprawdziłam wpływ kilku komercyjnych preparatów liposomowych takich jak Lipofectin i Lipofectamine 2000 na aktywność promotora oraz oddziaływanie HSF1 z sekwencją regulatorową HSE w komórkach poddanych lipofekcji. Wynikiem tych badań było wykazanie, że niektóre liposomy kationowe mogą nie nadawać się do badań funkcjonalnych promotorów genów *HSP*, a lipofekcja może powodować niezamierzone zmiany w globalnej ekspresji genów w transfekowanych komórkach (Fischer-Kierzkowska i wsp., 2009).

Brałam też udział w pracach dotyczących struktury promotora genu *Hspa2*, który koduje białko swoiste dla spermatocytów. Uczestniczyłam w badaniach nakierowanych na poznanie mechanizmów warunkujących ekspresję genu w spermatocytach myszy, co było o tyle istotne, że promotor *Hspa2* był wykorzystany przez nasz zespół do konstrukcji transgenów i myszy

transgenicznym. Wykazano m.in. funkcjonalne znaczenie alternatywnego miejsca rozpoczęcia transkrypcji w uruchomieniu ekspresji *Hspa2* w komórkach spermatogenicznych podczas rozwoju postnatalnego (Ściegłńska i wsp., 2004), a także znaczenie kilku sekwencji regulatorowych zawartych pomiędzy dwoma miejscami startu transkrypcji (Widłak i wsp., 2007). Otrzymanie przez nas poliklonalnej surowicy króliczej swoiście rozpoznającej HSPA2 umożliwiło detekcję białka u gryzoni i zbadanie wzoru jego ekspresji w tkankach myszy (Vydra i wsp., 2009). Następnie uczestniczyłam w badaniach nakierowanych na poznanie znaczenia białek rodziny HSPA (HSPA1 i HSPA2) w utrzymaniu fenotypu nowotworowego komórek niedrobnokomórkowego raka płuc, które są prowadzone pod kierownictwem dr hab. Doroty Ściegłńskiej. Uczestniczyłam w otrzymaniu linii komórkowych z obniżoną ekspresją HSPA1 za pomocą swoistych shRNA. Wykazano, że obniżenie ekspresji pojedynczego genu HSPA1 lub HSPA2 nie uwrażliwia tych komórek na działanie cis-platyny. Natomiast hamowanie aktywności białek rodziny HSPA za pomocą pan-inhibitora VER-155008 lub JG-98 znacznie uwrażliwiało komórki na działanie bortezomibu, inhibitora proteasomu. Wyniki te sugerują, że równoczesne hamowanie funkcji proteasomu i białek z rodziny HSPA mogłoby być skuteczną metodą w leczeniu nowotworów (Sojka i wsp., 2019). Jednoczesne hamowanie kilku paralogów HSPA (np. poprzez zahamowanie aktywacji HSF1), jako sposobu uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie leków przeciwnowotworowych (np. manumicyny), wykazano następnie w pracy Sojka i wsp. (2021).

Jednym z nurtów moich zainteresowań było badanie roli HSF1 w odpowiedzi komórek spermatogenicznych na stres indukowany podwyższoną temperaturą. Badania te stanowiły treść mojej pracy doktorskiej. Założeniem tego projektu było poszerzenie wiedzy o mechanizmach degeneracji nabłonka plemnikotwórczego spowodowanej podwyższeniem temperatury. Stosując model myszy transgenicznych ze swoistą ekspresją transkrypcyjnie aktywnego HSF1 w spermatocytach udowodniłam, że aktywacja HSF1 w spermatocytach prowadzi do zahamowania spermatogenezy uruchamiając śmierć komórek spermatogenicznych na drodze apoptozy, która naśladuje śmierć wywołaną szokiem cieplnym. Co zaskakujące, ektopowa ekspresja HSP70i (białka cytoprotekcyjnego) w spermatocytach nie chroni przed apoptozą indukowaną przez HSF1 bądź stres termiczny (Widłak i wsp., 2003; Vydra i wsp., 2006; Widłak i wsp., 2007a), a ekspresja genów *HSP* swoistych dla spermatogenezy zostaje zahamowana (Widłak i wsp., 2007b). Ten temat następnie był kontynuowany pod kierownictwem dr hab. Wiesławy Widłak, a badania były nakierowane na poszukiwanie mechanizmów odmiennej funkcji HSF1 w komórkach spermatogenicznych (wrażliwych na szok termiczny) i somatycznych (opornych na szok termiczny), w którym istotną rolę stanowiły wysokoprzepustowe analizy ekspresji genów skojarzone z analizą miejsc wiązania HSF1 do DNA w izolowanych spermatocytach i hepatocytach poddanych działaniu podwyższonej temperatury. W tym projekcie uczestniczyłam w opracowaniu techniki immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) oraz techniki otrzymania spermatocytów i hepatocytów (Kuś-Liśkiewicz i wsp., 2013; Korfanty i wsp., 2014). W efekcie zidentyfikowano wiązanie HSF1 do sekwencji regulatorowych HSE umiejscowionych w intronach genu *Pmaip1*. Gen ten koduje białko PMAIP1/NOXA o znanym działaniu pro-apoptotycznym. Udokumentowano wiązanie HSF1 do sekwencji regulatorowej genu *Pmaip1* prowadzące do wzrostu jego ekspresji w spermatocytach, a także w innych komórkach somatycznych wrażliwych na szok cieplny. Dane te wskazują, że HSF1 może odgrywać nie tylko funkcję cytoprotekcyjną (aktywując ekspresję genów kodujących białka szoku cieplnego), która dominuje w komórkach opornych na szok termiczny, ale może również indukować apoptozę (poprzez PMAIP1), co przy równoczesnym braku aktywacji HSP wiąże się ze zwiększoną wrażliwością na stres (Janus i wsp., 2020). W ten sposób aktywacja HSF1 przyczynia się np. do eliminacji komórek plemnikotwórczych uszkodzonych podczas szoku cieplnego i zapobiega przekazywaniu uszkodzonego materiału genetycznego następnemu pokoleniu. Nasze

badania wykazały również, że funkcja taka nie jest pełniona za pośrednictwem genu *Phlda1*, co było sugerowane we wcześniejszych pracach z grupy Akira Nakai (Janus et al., 2019). Z listy genów otrzymanej w wyniku wysokoprzepustowej analizy ekspresji genów wytypowano i scharakteryzowano kilka genów o nieznanej na tamten moment funkcji: *1700094C09Rik* (obecnie *SPACA7*) jako gen kodujący białko zlokalizowane w akrosomie (Korfanty i wsp., 2012), *3110001I22Rik* (obecnie *Bfar* wariant 3) jako gen kodujący białko, zaangażowane w metabolizm RNA (Mrowiec i wsp., 2021) oraz wykazano interakcję SPEN (ekspresja wzrasta w komórkach spermatogenicznych po szoku termicznym) z chromatyną poprzez oddziaływania z MTA1, który wchodzi w skład kompleksu białkowego przebudowującego nukleosom (Korfanty i wsp., 2018).

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

W latach 2007-2008 odbyłam staż podoktorski na Uniwersytecie Turku (styczeń-maj 2007) oraz Imperial College w Londynie (czerwiec 2007 – sierpień 2008) w grupie prof. Ilpo Huhtaniemi. Podczas mojego pobytu na Uniwersytecie w Turku uczestniczyłam w pracach mających na celu otrzymanie myszy transgeniczných z ukierunkowanym wyłączeniem ekspresji genu *Hsd17b3*, kodującego dehydrogenazę 17 $\beta$ -hydroksysteroidową. Pracowałam nad konstrukcją wektora do wyłączenia genu za pomocą rekombinacji RED/ET, hodowlą mysich zarodkowych komórek macierzystych (ang. embryonic stem cells), oraz uzyskaniem i genotypowaniem klonów komórek ES w celu selekcji klonów, w których nastąpiło wyłączenie genu.

Drugi przedmiot badań, w którym brałam udział w Imperial College, miał na celu znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy istnieje minimalne stężenie testosteronu wystarczające do utrzymania pozagonadalnego działania androgenów przy równoczesnym braku aktywacji spermatogenezy. To zagadnienie jest istotne dla rozwoju zagadnień męskiej antykoncepcji hormonalnej. Najbardziej znaną metodą hormonalnej antykoncepcji męskiej jest hamowanie syntezy wewnątrzjądrowego testosteronu poprzez hamowanie wydzielania hormonów gonadotropowych, przede wszystkim hormonu luteotropowego. Osiąga się to poprzez podawanie wysokiej dawki egzogenego testosteronu, które hamuje wydzielanie gonadotropin na skutek negatywnego sprzężenia zwrotnego. W projekcie wykorzystano myszy transgeniczne, wykazujące brak ekspresji receptora luteotropowego (LHR/-). Myszy te wykazują zahamowanie spermatogenezy na skutek braku syntezy testosteronu w wyniku zaburzenia sygnalizacji zależnej od gonadotropin. Myszy LHR/- traktowano rosnącymi dawkami testosteronu i oceniano wznowienie spermatogenezy oraz pozagonadalne działania androgenowe (w tym supresję gonadotropin i zachowania seksualne). Wykazano, że nie istnieje dawka testosteronu, która utrzymałaby funkcje seksualne przy równoczesnym zahamowaniu wydzielania testosteronu i aktywacji spermatogenezy. Wydaje się zatem, że terapeutyczny zakres działania antykoncepcyjnego opartego na podawaniu egzogenego testosteronu jest bardzo wąski lub nawet nieistniejący, co może tłumaczyć niewystarczającą skuteczność takiej strategii. Podczas hamowania sekrecji gonadotropin i wewnątrzjądrowego testosteronu, egzogennie wprowadzany testosteron może promować spermatogenezę. Co ciekawe, stężenie wewnątrzjądrowego testosteronu koniecznego do stymulacji spermatogenezy jest znacznie niższe, niż normalnie występujący wysoki poziom fizjologiczny. Te obserwacje uwiadcniają trudności w opracowaniu skutecznych sposobów hamowania syntezy bądź działania wewnątrzjądrowego testosteronu, aby osiągnąć stałą supresję spermatogenezy. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy Oduwole i wsp., 2014.

Reasumując moje osiągnięcia naukowo-badawcze, które nie wchodzą w skład cyklu badań będącego podstawą pracy habilitacyjnej, obejmują 18 prac doświadczalnych, które ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny IF=87,553). Całkowity IF wszystkich moich prac wynosi 118,248, liczba cytowań (wg Web of Science) - 468, w tym 342 bez autocytowań. Wyniki moich prac były też prezentowane na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik 8).

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

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach nie prowadzi typowej działalności dydaktycznej. Tym niemniej, w trakcie pracy w Instytucie Onkologii opiekowałam się studentami w ramach wolontariatów, praktyk i stażów studenckich. Byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Agnieszki Toma-Jonik pt. „Rola czynnika transkrypcyjnego HSF1 w progresji nowotworu i chemooporności komórek czerniaka” (wyróżnioną przez Radą Naukową Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, 2015), oraz dyplomowej pracy magisterskiej Joanny Bonk pt. „Badanie aktywności promotora genu *Hspa1b* w komórkach B16(F10) mysiego czerniaka z nadekspresją aktywnego czynnika transkrypcyjnego HSF1” (Politechnika Śląska, Gliwice, 2011).

Prowadziłam wykłady i laboratoria z przedmiotów „Biochemistry and the basics of organic chemistry” oraz „High-throughput techniques in molecular biology” dla doktorantów szkoły doktorskiej Polsko-Japońskiej Akademii Technik Komputerowych (PJATK) w ramach projektu INTERKADRA (Nr UDA -POKL-04.01.01-00-014/10-00 w latach 2012-2014).

#### **7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

##### **Kierowanie projektami grantowymi:**

1. Kierownik projektu finansowanego przez Narodowy Centrum Nauki, nr 2014/13/B/NZ7/02341 (OPUS 7) pt. „Mechanizm i znaczenie aktywacji czynnika transkrypcyjnego HSF1 w transformacji nowotworowej indukowanej przez estrogen”. Projekt był realizowany w latach 2015-2019.
2. Kierownik projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), nr N N401 031837 pt. „Udział czynnika transkrypcyjnego HSF1 w nabywaniu oporności wielolekowej komórek nowotworowych i w selekcji komórek podtrzymujących wzrost nowotworu”. Projekt był realizowany w latach 2009-2012.

##### **Wyróżnienia i nagrody:**

- 2018: I nagroda za najlepszą prezentację plakatową, jako współautor pracy „The elevated level of HSF1 directs human mammary epithelial cells towards mesenchymal phenotype” podczas XXII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.
- 2016: Wyróżnienie za prezentację plakatową, jako współautor pracy „HSF1-dependent changes in the transcription of the MCF7 cells after heat shock or estrogen exposure” podczas XX Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.
- 2015: I nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za najlepszą pracę naukową w 2014 roku: Korfanty et. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during heat shock response in mouse testes. *Int J Biochem Cell Biol*; 2014; 57:76-83. Nagroda zespołowa.

- 2014: II nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za najlepszą pracę w 2013 roku: Kuś-Liśkiewicz et al. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. *BMC Genomics*; 2013; 14: e456. Nagroda zespołowa.
- 2014: Wyróżnienie za prezentację plakatu, jako współautor pracy „HSF1-dependent down-regulation of vinculin is responsible for enhanced migration of the melanoma cells” podczas XVIII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice.
- 2007: II nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za najlepszą pracę naukową w 2006: Vydra et al. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ.* 2006; 13:212-22. Nagroda zespołowa.
- 2007: Wyróżnienie w konkursie PTBioch im. Jakuba Karola Parnasa na najlepszą pracę naukową w 2006: Vydra et al. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ.* 2006; 13:212-22. Nagroda zespołowa.
- 2007: Nagroda PTO im. Hilarego Koprowskiego za najlepszą pracę naukową: Vydra et al. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ.* 2006;13 :212-22. Nagroda zespołowa.
- 2006: Nagroda Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych badaczy.
- 2005: Nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za najlepszy doktorat obroniony przed Radą Naukową Centrum Onkologii przez pracownika Centrum Onkologii, Warszawa.
- 2005: Nagroda Dyrektora Centrum Onkologii za najlepszą pracę naukową w 2004: Ścieglik et al. Location of promoter elements necessary and sufficient to direct testis-specific expression of the Hst70/Hsp70.2 gene. *Biochem J.* 2004; 379: 739-47. Nagroda zespołowa.
- 2003: Wyróżnienie PTBioch im. Włodzimierza Mozołowskiego za prezentację plakatu, jako współautor pracy „Transcriptional active heat shock factor 1 (HSF1) leads to seminiferous epithelium degeneration in mice testes” podczas 39-go Zjazdu PTBioch, Gdańsk.

### Spis literatury.

1. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.* 2007; 130(6):1005-18. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.020.
2. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarzab M, Lisowska KM, Krawczyk Z. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol.* 2011;12:27. doi: 10.1186/1471-2199-12-27
3. Gökmen-Polar Y, Badve S. 2016. Upregulation of HSF1 in estrogen receptor positive breast cancer. *Oncotarget* 7:84239–84245. doi:10.18632/oncotarget.12438
4. Janus P, Toma-Jonik A, Vydra N, Mrowiec K, Korfanty J, Chadalski M, Widlak P, Dudek K, Paszek A, Rusin M, Polańska J, Widlak W. Pro-death signaling of cytoprotective heat shock factor 1: upregulation of NOXA leading to apoptosis in heat-sensitive cells. *Cell Death Differ.* 2020; 27:2280-2292. doi: 10.1038/s41418-020-0501-8.

5. Janus P, Mrowiec K, Vydra N, Widłak P, Toma-Jonik A, Korfanty J, Smolarczyk R, Widłak W. PHLDA1 Does Not Contribute Directly to Heat Shock-Induced Apoptosis of Spermatocytes. *Int J Mol Sci.* 2019 30; 21 (1):267. doi: 10.3390/ijms21010267.
6. Khaleque MA, Bharti A, Gong J, Gray PJ, Sachdev V, Ciocca DR, Stati A, Fanelli M, Calderwood SK. Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene.* 2008; 27:1886–1893. doi:10.1038/sj.onc.1210834.
7. Korfanty J, Stokowy T, Chadalski M, Toma-Jonik A, Vydra N, Widłak P, Wojtaś B, Gielniewski B, Widlak W. SPEN protein expression and interactions with chromatin in mouse testicular cells. *Reproduction.* 2018;156(3):195-206. doi: 10.1530/REP-18-0046.
8. Korfanty J, Stokowy T, Widlak P, Gogler-Pigłowska A, Handschuh L, Podkowiński J, Vydra N, Naumowicz A, Toma-Jonik A, Widlak W. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 57:76-83. doi: 10.1016/j.biocel.2014.10.006.
9. Korfanty J, Toma A, Wojtas A, Rusin A, Vydra N, Widlak W. Identification of a new mouse sperm acrosome-associated protein. *Reproduction.* 2012;143(6):749-57. doi: 10.1530/REP-11-0270.
10. Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://onkologia.org.pl/nowotwory--piersi-kobiet/>
11. Kus-Liśkiewicz M, Polańska J, Korfanty J, Olbryt M, Vydra N, Toma A, Widłak W. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. *BMC Genomics.* 2013; 14:456. doi:10.1186/1471-2164-14-456.
12. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 2004; 23: 2907-18. doi: 10.1038/sj.onc.1207529.
13. Mrowiec K, Chadalski M, Paszek A, Vydra N, Janus P, Pietrowska M, Toma-Jonik A, Gramatyka M, Widłak W. The periphilin 1-like BFAR isoform 3 is highly expressed in transcriptionally silent oocytes and involved in RNA metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021;1868(10):119086. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119086.
14. Nagel R, Semenova EA, Berns A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. *EMBO Rep.* 2016; 17: 1516–1531. <https://doi.org/10.15252/embr.201643030>.
15. Oduwole OO, Vydra N, Wood NE, Samanta L, Owen L, Keevil B, Donaldson M, Naresh K, Huhtaniemi IT. Overlapping dose responses of spermatogenic and extragonadal testosterone actions jeopardize the principle of hormonal male contraception. *FASEB J.* 2014; 28: 2566-76. doi: 10.1096/fj.13-249219.
16. Planas-Silva MD, Waltz PK. Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 104: 11-21. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.039.
17. Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, Schnitt SJ, Whitesell L, Tamimi RM, Lindquist S, Ince TA. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:18378–18383. doi:10.1073/pnas.1115031108.
18. Sojka DR, Hasterok S, Vydra N, Toma-Jonik A, Wieczorek A, Gogler-Pigłowska A, Sciegłńska D. Inhibition of the Heat Shock Protein A (HSPA) Family Potentiates the Anticancer Effects of Manumycin A. *Cells.* 2021; 10(6): 1418. doi: 10.3390/cells10061418.
19. Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Vydra N, Cortez AJ, Filipczak PT, Krawczyk Z, Sciegłńska D. Functional redundancy of HSPA1, HSPA2 and other HSPA proteins in non-small cell lung carcinoma (NSCLC); an implication for NSCLC treatment. *Sci Rep.* 2019; 9: 14394. doi: 10.1038/s41598-019-50840-7.

20. Scieglińska D, Vydra N, Krawczyk Z, Widlak W. Location of promoter elements necessary and sufficient to direct testis-specific expression of the Hst70/Hsp70.2 gene. *Biochem J.* 2004; 379: 739-47. doi: 10.1042/BJ20031842.
21. Tchénio T, Havard M, Martinez LA, Dautry F. Heat shock-independent induction of multidrug resistance by heat shock factor 1. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 580-91. doi: 10.1128/MCB.26.2.580-591.2006.
22. Toma A, Widlak W, Vydra N. Rola czynnika transkrypcyjnego HSF1 w procesie nowotworzenia. *Postępy Biologii Komórki.* 2012; 39: 269–288
23. Toma-Jonik A, Vydra N, Janus P, Widlak W. Interplay between HSF1 and p53 signaling pathways in cancer initiation and progression: non-oncogene and oncogene addiction. *Cell Oncol (Dordr).* 2019; 42(5):579-589. doi: 10.1007/s13402-019-00452-0
24. Vydra N, Toma A, Widlak W. Pleiotropic role of HSF1 in neoplastic transformation. *Curr Cancer Drug Targets.* 2014;14(2):144-55. doi: 10.2174/1568009614666140122155942.
25. Vydra N, Winiarski B, Rak-Raszewska A, Piglowski W, Mazurek A, Scieglińska D, Widlak W. The expression pattern of the 70-kDa heat shock protein Hspa2 in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 2009; 132: 319-30. doi: 10.1007/s00418-009-0605-1
26. Vydra N, Malusecka E, Jarzab M, Lisowska K, Glowala-Kosinska M, Benedyk K, Widlak P, Krawczyk Z, Widlak W. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 212-22. doi: 10.1038/sj.cdd.4401758.
27. Welboren WJ, van Driel MA, Janssen-Megens EM, van Heeringen SJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG. ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J.* 2009; 28: 1418-28. doi: 10.1038/emboj.2009.88
28. Widlak W, Benedyk K, Vydra N, Glowala M, Scieglińska D, Malusecka E, Nakai A, Krawczyk Z. Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific hst70 gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(2): 535-41.
29. Widlak W, Vydra N, Dudaladava V, Scieglińska D, Winiarski B, Krawczyk Z. The GC-box is critical for high level expression of the testis-specific Hsp70.2/Hst70 gene. *Acta Biochim Pol.* 2007; 54: 107-12.
30. Widlak W and Vydra N. The Role of Heat Shock Factors in Mammalian Spermatogenesis. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017 ;222: 45-65. doi: 10.1007/978-3-319-51409-3\_3.
31. Xu W, Baribault H, Adamson ED. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 1998; 125: 327-37.

.....*N. Vydra*.....  
(podpis wnioskodawcy)