

AUTOREFERAT

Dr Dorota Ścieglińska

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach

Gliwice, 2015

1. Imię i Nazwisko: **Dorota Ściegłńska**

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

- 17.12.2002 stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna
- Nadany przez Radę Naukową Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
- Promotor: Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk
- Recenzenci: Dr hab. Hanna Rokita i Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
- Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Struktura promotora i części 5' jednostki transkrypcji homologicznych genów hst70 szczura i HSPA2 człowieka kodujących białko opiekuńcze o kluczowym znaczeniu dla procesu spermatogenezy”*.
- Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie.
- 06.07.1995 tytuł magistra biologii
- Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice.
- Tytuł pracy magisterskiej: *„Wykorzystanie metody RT-PCR do wykrywania transkryptów genu hst70 w wybranych narządach szczura”*.

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

- 01.06.2003 do chwili obecnej adiunkt w Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, od 01.10.2010 w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów.
- 01.07.1996 – 31.05.2003 asystent w Zakładzie Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach
- 21.04.1999 – 07.09.1999 urlop macierzyński
- 01.12.1998 – 19.02.1999 staż naukowy w laboratorium Prof. Ilpo Huhtaniemi, Department of Physiology, Institute of Biomedicine, University of Turku, Turku, Finlandia. Stypendystka programu CIMO (CIMO fellowship).
- 01.09.1995 – 30.06.1996 biolog w Zakładzie Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach
- 01.02.1995 – 30.08.1995 technik ½ etatu w Zakładzie Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

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

A) Tytuł osiągnięcia naukowego / artystycznego

Przedkładam do oceny monotematyczny cykl pięciu oryginalnych publikacji naukowych oraz jednej pracy poglądowej zatytułowany:

„Ekspresja i funkcja białka kodowanego przez ludzki gen *HSPA2* w komórkach somatycznych”.

B) Prace stanowiące podstawę habilitacji:

1. **Ścieglińska D***, Pięglowski W, Mazurek A, Małusecka E, Zebracka J, Filipczak P, Krawczyk Z. (2008). The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104: 2193-2206.
* autor korespondencyjny; **IF = 3.54**
2. **Ścieglińska D***, Pięglowski W, Chekan M, Mazurek A, Krawczyk Z. (2011). Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study. *Histochemistry and Cell Biology*, 135: 337-350.
* autor korespondencyjny; **IF = 2.588**
3. Filipczak PT, Pięglowski W, Glowala-Kosinska M, Krawczyk Z, **Ścieglińska D***. (2012). HSPA2 overexpression protects V79 fibroblasts against bortezomib-induced apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 90: 224-231.
* autor korespondencyjny; **IF = 2.915**
4. **Ścieglińska D***, Gogler-Pięglowska A, Butkiewicz D, Chekan M, Małusecka E, Harasim J, Habryka A, Krawczyk Z. (2014). HSPA2 is expressed in human tumors and correlates with clinical features in non-small cell lung carcinoma patients. *Anticancer Research* 34: 2833-2840.
* autor korespondencyjny; **IF = 1.826**
5. **Ścieglińska D***, Krawczyk Z. (2015). Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. *Cell Stress and Chaperones* 20: 221-35.
* autor korespondencyjny; **IF = 3.136**
6. Habryka A, Gogler-Pięglowska A, Sojka D, Kryj M, Krawczyk Z, **Ścieglińska D*** (2015). Cell type-dependent modulation of the gene encoding heat shock protein HSPA2 by hypoxia-inducible factor HIF-1: down-regulation in keratinocytes and up-regulation in HeLa cells. *BBA Gene Regulatory Mechanisms* 1849: 1155-1169
* autor korespondencyjny; **IF = 6.332**

Sumaryczny IF = 20,364

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie publikacji naukowych w załączeniu [załącznik nr 6].

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie – białka szoku termicznego

Badania nad genami kodującymi białka szoku termicznego HSP (ang. heat shock protein) zapoczątkował pół wieku temu Ferrucci Ritossa (1962), który zauważył, że pod wpływem wysokiej temperatury na chromosomach ślinianki larw *Drosophila. busckii* pojawiają się charakterystyczne puffy. Struktury te zidentyfikowano później jako aktywnie transkrybowane regiony chromatyny zawierające sekwencje genowe kodujące białka HSP. Obecnie wiadomo, że geny *HSP* występują w genomach wszystkich organizmów oraz wykazują wysoki poziom podobieństwa nawet pomiędzy gatunkami znacznie oddalonymi ewolucyjnie. Geny te kodują białka opiekuńcze niezbędne dla podstawowego metabolizmu, które poprzez skoordynowane oddziaływania z tzw. białkami współopiekuńczymi (ang. co-chaperones), ułatwiają utrzymanie funkcjonalnej struktury białkom komórkowym będącym klientami HSP.

Geny *HSP* podzielono na kilka rodzin w oparciu o podobieństwo ich sekwencji nukleotydowej oraz wielkość molekularną kodowanych białek. Zgodnie z najnowszym podziałem, w komórkach ssaczych syntetyzowane są białka pięciu głównych rodzin HSP: HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40), HSPB (HSP27) i czaperoniny (ang. chaperonins; CCT, GroES/EL) (Kampinga i wsp., 2009). Do jednych z najliczniejszych należy wielogenowa rodzina *HSPA (HSP70)*, do której u człowieka zaliczono 13 homologicznych sekwencji genomowych (Kampinga i wsp., 2009).

Geny rodziny *HSPA* kodują białka o charakterystycznej budowie domenowej i masie około 70 kDa. Funkcje białek HSPA są plejotropowe i wyrażają się w szeroko rozumianej opiece nad innymi białkami komórkowymi. Biorą one udział w fałdowaniu nowo syntetyzowanych białek, transporcie białek pomiędzy organellami, składaniu kompleksów wielobiałkowych. HSPA, jako czynniki cytoprotekcyjne warunkują przeżycie komórek w rozmaitych warunkach stresowych, szczególnie takich, które uszkadzają strukturę innych białek komórkowych. Zapobiegają one nieodwracalnym uszkodzeniom białek będących ich klientami, w stosunku do których wykonują również działania naprawcze przywracające im prawidłową strukturę. Białka uszkodzone w sposób nieodwracalny kierują na drogę degradacji proteasomalnej. HSPA są także zaangażowane w regulację aktywności wielu białek sygnalizacyjnych, co czyni z nich ważny element systemu przekazywania sygnałów (praca pogładowa: Sherman i Gabai, 2015). Do jednych z lepiej zbadanych funkcji HSPA należy ich zdolność do hamowania procesów śmierci komórkowej (praca przeglądowa Ciocca i wsp., 2013). Ponadto, w ostatnich latach wiele uwagi poświęcono tzw. pozakomórkowym HSPA, które są aktywnie wydzielane do środowiska pozakomórkowego i pełnią funkcje na poziomie całego organizmu stymulując oraz regulując reakcje immunologiczne (praca przeglądowa: Schmid i Multhoff, 2012). Ponieważ HSPA bezpośrednio wpływają na jakość proteomu, wszelkie zmiany poziomu ich ekspresji oraz/lub ich funkcjonowania mogą wpływać na fenotyp komórek. Dowiedziono, że zmieniona ekspresja HSPA

związana jest z patogenezą bardzo wielu stanów patologicznych, w tym chorób neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych, nowotworowych (prace przeglądowe: Khalil i wsp., 2011; Ciocca i wsp., 2013; Kakkar i wsp., 2014).

Omawiając plejotropowe funkcje białek rodziny HSPA należy zauważyć, że pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego oraz wielu nakładających się ról, poszczególne białka tej rodziny posiadają odmienne, unikalne właściwości, wykazując specyficzność funkcjonalną i substratową. Czyni to z HSPA skomplikowany i dynamiczny układ, którego efekt działania w danym typie komórek będzie uzależniony od kontekstu molekularnego.

Przedmiotem cyklu publikacji, będącego podstawą mojej pracy habilitacyjnej, jest gen *HSPA2* przynależący do rodziny *HSPA* człowieka. Gen *HSPA2* sklonowano w 1994 roku (Bonnycastle i wsp., 1995). Ze względu na wysoki poziom ekspresji w komórkach spermatogenicznych oraz znaczne podobieństwo sekwencji nukleotydowej uznano GA za ortologiczny do sklonowanych wcześniej jądrowo-swoistych i kluczowych dla płodności samców genów *Hst70* szczura (Wisniewski i wsp. 1999) i *Hsp70.2* myszy (Zakeri i wsp., 1988). Jednak już pierwsze doniesienia o właściwościach ludzkiego genu *HSPA2* wskazywały na istnienie różnic pomiędzy nim a jego odpowiednikami u gryzoni. Geny *Hst70/Hsp70.2* gryzoni wykazują najwyższą aktywność w spermatocytach w stadium pachytenu (Krawczyk i wsp., 1987; Krawczyk i wsp., 1988), natomiast największy poziom produktów genu *HSPA2* człowieka wykryto w spermatydach i plemnikach (Huszar i wsp., 2000). Podczas gdy u mężczyzn efekty fenotypowe niedoboru białka HSPA2 wiązano z produkcją niefunkcjonalnych plemników (Huszar et al. 1997), u gryzoni obserwowano zablokowanie spermatogenezy na etapie różnicowania spermatocytów (Dix i wsp., 1996). Kolejna różnica związana była z poziomem transkryptów w narządach somatycznych. W przypadku gryzoni nieznaczne ilości mRNA wykrywano w narządach somatycznych tylko przy użyciu najczulszych metod detekcji (RT-PCR; Ściegłińska i wsp., 1997), natomiast transkrypt ludzkiego genu identyfikowano stosując metody o średniej/niskiej czułości (Northern blot) (Bonnycastle i wsp., 1995; Son i wsp., 1999). Nasze badania wstępne wskazywały, że geny gryzoni i człowieka mają odmienną strukturę części 5' jednostki transkrypcji, a w konsekwencji kodują transkrypty różniące się sekwencją końca 5' UTR (Ściegłińska i wsp., 2001; Piłowski i wsp., 2007).

Cel naukowy:

W momencie rozpoczęcia badań, których wyniki opisano w omawianym cyklu prac, właściwości ludzkiego genu *HSPA2* były bardzo słabo poznane. Autorzy nielicznych prac koncentrowali się wyłącznie na aspektach związanych ze znaczeniem genu dla płodności mężczyzn (Bonnycastle i wsp., 1995; Huszar i wsp., 2000). Ponieważ wyniki naszych wstępnych prac silnie sugerowały, że ekspresja ludzkiego genu *HSPA2* nie jest ograniczona do różnicujących się męskich komórek rozrodczych (Piłowski, praca magisterska, 2004; Piłowski i wsp., 2007), postanowiłam

skoncentrować się na charakteryzowaniu właściwości tego genu oraz kodowanego przezeń białka w komórkach somatycznych człowieka. Do głównych celów, które sobie postawiłam, należało scharakteryzowanie wzoru ekspresji w ludzkich komórkach i narządach, przybliżenie mechanizmów sterujących transkrypcją genu oraz wstępne określenie funkcji kodowanego białka w komórkach somatycznych.

Osiągnięte wyniki:

Ekspresji ludzkiego genu *HSPA2* w narządach somatycznych oraz zmianach nowotworowych

Nasze wstępne badania wskazywały, że gen *HSPA2* jest transkrybowany w liniach komórkowych wywodzących się z rozmaitych prawidłowych oraz patologicznie zmienionych tkanek somatycznych człowieka (Piękowski i wsp., 2007). Nie było jednak wiadomo, czy powstający mRNA ulega translacji w komórkach somatycznych. Zgodnie z ówczesnym stanem wiedzy przyjmowano, że białko HSPA2 jest produkowane w różnicujących się (spermatocyty, spermatydy) oraz zróżnicowanych (plemniki) męskich komórkach rozrodczych (Huszar i wsp., 2000). Podjęte próby wykrycia tego białka w ludzkich narządach somatycznych, nie przyniosły oczekiwanych wyników (Son i wsp., 1999), a ograniczeniem utrudniającym stwierdzenie jego obecności był brak odpowiednich przeciwciał. Dlatego też, pierwszym etapem moich prac było uzyskanie swoistego przeciwciała anti-HSPA2. Białka rodziny HSPA cechuje bardzo wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej, co utrudnia swoistą identyfikację poszczególnych przedstawicieli rodziny przy użyciu przeciwciał. Często pojawiającym się problemem są reakcje krzyżowe zachodzące pomiędzy przeciwciałem a kilkoma najbardziej podobnymi białkami (HSPA1, HSPA2, HSPA8 i HSPA6). W mojej strategii otrzymania przeciwciała pozbawionego w/w wady do produkcji króliczej poliklonalnej surowicy anti-HSPA2 jako immunogen postanowiłam wykorzystać peptyd o sekwencji unikalnej dla białka HSPA2. Kolejnym i kluczowym etapem procedury otrzymywania przeciwciała anti-HSPA2 było oczyszczenie otrzymanej surowicy metodą chromatografii powinowactwa do antygeny, którym było endogenne białko HSPA2. Strategia ta umożliwiła wyselekcjonowanie frakcji immunoglobulin skierowanych wyłącznie przeciw epitopom występującym w ludzkim białku HSPA2. Syntezę peptydu, immunizację królików oraz pozyskiwanie surowicy zleciłam komercyjnej firmie specjalizującej się w produkcji przeciwciał.

W efekcie, otrzymaliśmy przeciwciało umożliwiające swoistą detekcję HSPA2 metodą Western blot oraz technikami immunochemicznymi, które jak udowodniłam, nie reaguje krzyżowo z innymi przedstawicielami rodziny HSPA, jak również nie wykrywa antygenów o masie molekularnej innej niż 70 kDa. Opis produkcji przeciwciała oraz analizę jego swoistości przedstawiono w pracach opublikowanych w *Journal of Cellular Biochemistry* (Ściegłińska i wsp., 2008) oraz *Histochemistry and Cell Biology* (Ściegłińska i wsp., 2011). Warto zauważyć, że aktualnie w ofercie kilku komercyjnych producentów dostępne są różne przeciwciała anti-HSPA2. Wykonana przez nas ocena swoistości wybranych trzech produktów różnych producentów ujawniła, że charakteryzuje je

stosunkowo niska swoistość. Dwa produkty w ogóle nie wykazywały swoistości w kierunku HSPA2, rozpoznając dodatkowo białka HSPA1, HSPA6 i HSPA8. Trzecie z przeciwciał reagowało z białkami HSPA2 oraz HSPA6. Omówienie problemów z immunodetekcją przedstawicieli rodziny HSPA, wraz z wykazem przeciwciał zastosowanych do detekcji HSPA2 zawarłam w pracy poglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Cell Stress and Chaperones* (Ściegłińska i Krawczyk, 2015). Naszym celem było zwrócenie uwagi innych badaczy, że niedostateczna swoistość przeciwciał może powodować istotne trudności w uzyskiwaniu wiarygodnych danych o występowaniu białka HSPA2 w komórkach.

Otrzymanie narzędzia badawczego zapewniającego swoistą identyfikację białka HSPA2 pozwoliło na wykazanie, że jego zróżnicowane ilości są obecne w różnych ludzkich liniach komórkowych hodowanych *in vitro*. Obserwowane różnice dość dobrze korespondowały z poziomem kodującego je transkryptu, który oceniliśmy metodą RT-qPCR. Najwyższe ilości produktów genu *HSPA2* wykryliśmy w liniach komórek nowotworowych wywodzących się z niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *non-small cell lung carcinoma*; NSCLC). Produkty te wykryliśmy także w liniach komórek prawidłowych (nabłonek oskrzeli oraz piersi). Omawiane wyniki, opisane w pracy opublikowanej w *Journal of Cellular Biochemistry* (Ściegłińska i wsp., 2008), stały się równocześnie podstawą do badań nakierowanych na poszukiwanie białka HSPA2 w ludzkich tkankach i narządach.

Poszukując HSPA2 w narządach człowieka posłużyłam się utrwalonym w formalinie i zatopionym w parafinie materiałem tkankowym zdeponowanym na komercyjnych macierzach tkankowych (producent Tissue Array Network, USA). Wybór macierzy tkankowych do badań immunohistochemicznych pozwolił na poszukiwanie HSPA2 w znacznej liczbie narządów (21 regionów anatomicznych) pochodzących od kilku dawców (do 11 osób). Najważniejszym efektem wykonanych badań było pionierskie odkrycie, że HSPA2 występuje w niektórych narządach człowieka w sposób komórkowo-swoisty. Do najbardziej intrygujących należy obserwacja, że znaczne ilości białka znajdują się w nabłonkach wielowarstwowych oraz pseudowielowarstwowych takich jak naskórek, nabłonek przelyku, nabłonek orzęsiony oskrzeli. Wspólne dla tych nabłoneków było występowanie HSPA2 preferencyjnie w komórkach tworzących ich warstwę podstawną. Ponadto, silną akumulację HSPA2, porównywalną do tej występującej w jądrach (ang. *testes*), obserwowaliśmy w komórkach glejowych mózgu oraz mózdzku. Szczegółowy opis wyników zamieściliśmy w pracy opublikowanej w *Histochemistry and Cell Biology* (Ściegłińska i wsp., 2011). Warto zaznaczyć, że cytowana praca jest pierwszą, i jak dotychczas jedyną kompleksową analizą występowania białka HSPA2 w ludzkich narządach.

W omawianej pracy zestawiałam także wyniki detekcji homologicznych białek HSPA2 i HSPA1 w ludzkich narządach, co po raz pierwszy zobrazowało odmienną wzoru ekspresji kodujących je genów (Ściegłińska i wsp., 2011). Przykładowo, silną akumulację HSPA1 obserwowano w tkankach, w których detekcja HSPA2 dała wynik negatywny (nabłonek piersi, pęcherza moczowego oraz prostaty). Przeciwną sytuację wykryto w mózgu, mózdzku oraz jądrach. Omawiane, pionierskie spostrzeżenia skłaniają do zadania pytania o fizjologiczny sens odmiennej lokalizacji białek HSPA2 i HSPA1 w

narządach człowieka. Można założyć, że wynika ona ze zróżnicowania mechanizmów sterujących ekspresją kodujących je genów, przy czym funkcje obu białek są podobne. Jednak można też przyjąć hipotezę, że odmienna lokalizacja narządowa obrazuje różnice funkcjonalnych pomiędzy nimi. Niestety, wciąż nie wiadomo w jakim zakresie białka HSPA2 i HSPA1 pełnią podobne, a w jakim odmienne, wyspecjalizowane funkcje. Należy zaznaczyć, że wykazanie różnic w występowaniu tych białek w narządach człowieka (Ściegłińska i wsp., 2011), dostarczyło wskazówek co do wyboru modelu badawczego dla przyszłych poszukiwań, których celem będzie porównanie ich fizjologicznej roli w różnych typach prawidłowych komórek.

Wykazanie złożonego wzoru ekspresji genu *HSPA2* w komórkach ludzkich narządów skłoniło mnie do zadania pytania czy, oraz w jakim stopniu zmienia się on w stanach patologicznych. Choroby nowotworowe są obszarem intensywnych poszukiwań poświęconych znalezieniu związku pomiędzy zmienioną ekspresją genów *HSPA*, a stopniem i cechami zmian patologicznych. Nasiloną ekspresją tych genów jest zjawiskiem częstym w różnego rodzaju nowotworach złośliwych, co jak wykazano wpływa stymulująco na wzrost komórek nowotworowych oraz zmniejszenie ich wrażliwości na czynniki indukujące śmierć komórkową. W związku z tymi właściwościami, geny *HSPA* są proponowane jako możliwy cel nowych terapii przeciwnowotworowych (Schlecht i wsp., 2013, prace przeglądowe: Khalil i wsp., 2011; Guzhova i wsp., 2013). Prowadzone są także badania, których celem jest ocena możliwości wykorzystania *HSPA* jako klinicznych markerów nowotworowych (prace przeglądowe: Khalil i wsp., 2011; Kakkar i wsp., 2014).

Nasze wstępne wyniki (Ściegłińska i wsp., 2008) wskazujące, że HSPA2 może występować w guzach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), skłoniły mnie do podjęcia próby oceny występowania białka HSPA2 w różnych złośliwych zmianach nowotworowych. Metodą immunohistochemiczną przeprowadziłam detekcję białka HSPA2 w kilkuset fragmentach tkanek reprezentujących najczęstsze typy raka. Materiał ten zdeponowano na komercyjnych macierzach tkankowych (Tissue Array Network, USA). HSPA2 wykryliśmy w 26% preparatów które zaliczały się do jedenastu spośród czternastu przeanalizowanych rodzajów zmian złośliwych. HSPA2 występowało często w raku płaskonabłonkowym skóry, raku piersi oraz raku głowy i szyi. Omawiane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Anticancer Research* (Ściegłińska i wsp., 2014). Wskazują one, nawet biorąc pod uwagę ograniczenia pracy (analiza małej liczby guzów reprezentowanych przez niewielkie fragmenty tkanki); że obecność białka HSPA2 może charakteryzować różne, histologicznie odmienne typy nowotworów złośliwych. Jest to obserwacja ważna, ponieważ inni badacze wykazali, że wysoka produkcja białka w niektórych liniach hodowanych *in vitro* komórek nowotworowych (rak pęcherza moczowego – Garg i wsp., 2010b; rak szyjki macicy – Garg i wsp., 2010a) ma związek z ich zwiększoną żywotnością oraz inwazyjnością.

W pracy Ściegłińska i wsp., (2008) zademonstrowaliśmy, że wśród linii komórek nowotworowych przebadanych pod kątem obecności białka HSPA2, najwyższy jego poziom występuje w komórkach pochodzących z NSCLC. Dlatego też, w kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić,

czy istnieje zależność pomiędzy poziomem białka HSPA2 w guzach, a cechami klinicznymi pacjentów chorych na NSCLC. W badaniu wykorzystałam archiwalny materiał pooperacyjny (błoczki parafinowe), który zebrano w latach 1993-1995 w Centrum Onkologii – Instytucie, Oddział w Gliwicach we współpracy z Kliniką Torakochirurgii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrze. Analizie immunohistochemicznej poddałam materiał pochodzący od 85 chorych, u których zdiagnozowano raka płaskonabłonkowego lub gruczolakoraka płuca (odpowiednio 56 i 29 chorych). Zaobserwowaliśmy, że silny jądrowy odczyn barwienia korelował z typem histologicznym raka, stopniem zaawansowania choroby (wg. skali TNM) oraz czasem przeżycia pacjentów. Najważniejszym wynikiem było wykazanie zależności pomiędzy wysokim poziomem HSPA2 w guzie a krótszym czasem przeżycia pacjentów. Omawiane wyniki sugerujące, że akumulacja białka HSPA2 w guzie może być negatywnym czynnikiem prognostycznym, zostały włączone do pracy opublikowanej w czasopiśmie *Anticancer Research* (Ściegłńska i wsp., 2014). Należy zaznaczyć, że równoległe z tą pracą zostały opublikowane wyniki innych grup badawczych, które także wskazują na związek pomiędzy wysoką ekspresją genu *HSPA2* w guzie, a krótszym czasem przeżycia chorych na inne rodzaje nowotworów złośliwych (Zhang i wsp., 2013; Fu i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2015). Wartość wniosków wyciągniętych we wszystkich w/w pracach jest ograniczona na skutek przebadania mało licznych grup pacjentów (od 85 do 120 osób). Niemniej jednak otrzymane wyniki powinny zainspirować do zaprojektowania badań obejmujących duże, dobrze dobrane grupy chorych nakierowane na ocenę realnej wartości prognostycznej genu/białka *HSPA2*. Chciałam zaznaczyć, że moje prace w stopniu szczególnym przyczyniły się do zwrócenia uwagi badaczy na HSPA2 jako potencjalny marker nowotworowy. Przede wszystkim jako pierwsza wykazałam, że poza jądrami (*testes*), białko to znajduje się w guzach nowotworowych (Ściegłńska i wsp., 2008) oraz w narządach somatycznych (Ściegłńska i wsp., 2011). Wiadomo było jedynie, że HSPA2 występuje ono w różnego rodzaju komórkach nowotworowych (Rohde i wsp., 2005; Ściegłńska i wsp., 2008). Zaproponowałam także, że HSPA2 może mieć wartość prognostyczną w raku płuca, a dodatkowo podałam wskazówki o innych rodzajach zmian złośliwych, dla których podobne badania warto podjąć (Ściegłńska i wsp., 2014).

Mechanizmy sterujące ekspresją ludzkiego genu *HSPA2* w komórkach somatycznych

W momencie rozpoczęcia moich badań wiedza na temat mechanizmów regulujących ekspresję ludzkiego genu *HSPA2* była znikoma. Uzyskane przez nas wstępne dane wskazywały jedynie, że gen ten jest pozbawiony intronów, a jego transkrypcja inicjowana jest w pojedynczym miejscu startu (Pigłowski i wsp., 2007). Testy funkcjonalne wykazały, że fragment DNA długości około 400 pz. zlokalizowany bezpośrednio powyżej miejsca startu translacji pełni funkcje promotora zapewniając ekspresję genu wskaźnikowego w ludzkich komórkach nowotworowych (Pigłowski i wsp., 2007).

W pracy opublikowanej w *Journal of Cellular Biochemistry* (Ściegłińska i wsp., 2008) wykazaliśmy, że poziom białka HSPA2 w komórkach nowotworowych poddanych działaniu szoku termicznego nie zmienia się. Obserwacja ta była zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, w których nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genów *Hst70/Hsp70.2* w jądrach gryzoni eksponowanych na szok termiczny (Krawczyk et al. 1988; Zakeri et al. 1988), oraz została potwierdzona przez prace późniejsze (Hageman i wsp., 2011). Aby znaleźć czynniki, które mogłyby wpływać na poziom ekspresji genu *HSPA2*, wykonaliśmy analizę *in silico* sekwencji promotora (K. Krzemiń, praca magisterska; 2009). W efekcie tych działań zwróciliśmy naszą uwagę na sekwencję regulatorową HRE (ang. *Hypoxia Response Element*) zlokalizowaną w regionie poprzedzającym miejsce inicjacji transkrypcji, z którą potencjalnie mógłby oddziaływać czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *Hypoxia Inducible Factor*). W tym samym roku ukazała się też praca, której autorzy wykazali, że sekwencja HRE w promotorze genu *HSPA2* jest funkcjonalnym elementem regulatorowym, do którego w komórkach nowotworowych (HepG2, rak wątroby; HeLa, rak szyjki macicy) poddanych działaniu hipoksji wiąże się czynnik HIF-1 powodując wzrost transkrypcji (Huang i wsp., 2009). Ponadto, zaintrygowały nas także dane literaturowe sugerujące, że ostateczny efekt oddziaływań pomiędzy HIF-1 a sekwencją regulatorową HRE może być różny i zależeć od dodatkowych czynników składających się na tzw. „kontekst molekularny” (Villar i wsp., 2012). W związku z powyższym przyjęliśmy robocze założenie, że HIF-1 może wpływać na poziom ekspresji genu *HSPA2* w sposób zróżnicowany i uzależniony od typu komórek. Do weryfikacji naszej hipotezy, jako model badawczy wybraliśmy ludzkie keratynocyty naskórka oraz komórki linii HeLa (gruczolakorak szyjki macicy). Uzasadnieniem dla wyboru komórek HeLa były wyżej przytoczone wyniki opublikowane przez Huang i wsp., (2009). Natomiast keratynocyty naskórka są jedną z nielicznych populacji komórek somatycznych, w których wykryliśmy znaczne ilości białka HSPA2 (Ściegłińska i wsp., 2011). Ponadto, w komórkach tych czynnik HIF-1 jest obecny konstytutywnie, czego przyczyny można upatrywać w warunkach łagodnej hipoksji panującej w mikrośrodku naskórka (ze względu na brak unaczynienia w naskórku występuje tzw. hipoksja fizjologiczna). Ponadto, fizjologiczna rola HIF-1 w keratynocytach, poza regulowaniem odpowiedzi na dostępność tlenu, związana jest z utrzymywaniem homeostazy naskórka (Rezvani i wsp., 2011; Nys i wsp., 2011).

Wykazaliśmy, że w keratynocytach HIF-1 działa jako inhibitor transkrypcji genu *HSPA2*, podczas gdy w komórkach HeLa stymuluje jego aktywność. Wnioski te wyciągnęliśmy na podstawie wyników analizy aktywności fragmentów promotora oraz oceny poziomu endogennej ekspresji genu *HSPA2* w komórkach, w których akumulację HIF-1 uzyskano na drodze hipoksji lub poprzez nadekspresję konstytutywnie aktywnego mutantu HIF-1 α . Eksperymenty weryfikujące powyższe obserwacje wykonaliśmy stosując chemiczne aktywatory oraz inhibitory aktywności HIF-1 α , a także obniżając poziom ekspresji genu *HIF-1\alpha* na drodze mechanizmu RNAi. Te w pełni oryginalne wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* (Habryka i wsp., 2015; DŚ. – autor korespondencyjny). Naszym ważnym osiągnięciem jest

zidentyfikowanie *HSPA2* jako przedstawiciela bardzo nielicznej grupy genów, których transkrypcja może być hamowana bezpośrednio przez czynnik HIF-1 (znanych jest tylko kilka przykładów, ich wykaz znajduje się w dyskusji pracy Habryka i wsp., 2015). Oryginalną obserwacją jest także wykazanie zróżnicowanego wpływu czynnika HIF-1 na aktywność transkrypcyjną tego samego genu w różnych typach komórek. Dotychczas nie opisano mechanizmów warunkujących działanie HIF-1 jako inhibitora transkrypcji. Podobnie, nie są znane molekularne podstawy odpowiedzialne za wystąpienie przeciwnego efektu regulatorowego wywołanego przez wiązanie czynnika HIF-1 do promotora genu *HSPA2* w keratynocytach i komórkach HeLa. Zaproponowaliśmy kilka hipotez (Habryka i wsp., 2015), które będą punktem wyjścia do projektowania dalszych badań.

Zgromadziliśmy także w pełni oryginalne dane sugerujące, że czynnikiem aktywującym transkrypcję genu *HSPA2* jest stres oksydacyjny. W cytowanej powyżej pracy (Habryka i wsp., 2015) wykazaliśmy, że do silnego pobudzenia transkrypcji genu dochodzi w keratynocytach eksponowanych na hipoksję i późniejszą reoksygenację. Ponieważ wzrost transkrypcji ulegał ograniczeniu w obecności antyoksydantu, sądzimy że za obserwowany efekt odpowiada wzrost poziomu wolnych rodników, który towarzyszy reoksygenacji. Przyniesione wyniki po raz pierwszy wskazują, że natężenie ekspresji ludzkiego genu *HSPA2* zależy od poziomu, a być może także od rodzaju stresu wolnorodnikowego. Jednak poznanie mechanizmów sterujących aktywnością promotora genu *HSPA2* podczas stresu oksydacyjnego wymaga dalszych badań.

Funkcje białka HSPA2 w komórkach somatycznych

Badania, których celem było poznanie funkcji białka HSPA2, wraz z kolegami rozpoczynałam w momencie, w którym nie było jakichkolwiek informacji na ten temat. Dlatego też wstępnie założyliśmy, że zbadanie jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej pozwoli na wstępne wnioskowanie o potencjalnych funkcjach. W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Cellular Biochemistry* (Ściegłińska i wsp., 2008) zademonstrowaliśmy, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja HSPA2 jest uzależniona od temperatury panującej w środowisku komórek. HSPA2 w temperaturze fizjologicznej występuje głównie w cytoplazmie, natomiast szok termiczny prowadzi do jego przemieszczenia się do jądra komórkowego, silnej akumulacji w jąderkach oraz bardzo szybkiego nagromadzenia się w obszarze centrosomów. Wyniki te uzyskaliśmy wykrywając endogenne białko HSPA2 metodami immunocytochemicznymi oraz wizualizując białka fuzyjne HSPA2-EGFP i mRFP-HSPA2 w modyfikowanych stabilnych liniach komórkowych.

Jądrowo-cytoplazmatyczna lokalizacja białka HSPA2, która później potwierdziła się w badaniach innego zespołu badaczy (Hageman i wsp., 2011), jest również typowa dla dwóch innych lepiej scharakteryzowanych indukowalnych białek rodziny HSPA, a mianowicie HSPA1 i HSPA6 (lecz nie np. HSPA8). Wykazano, że białka te są zaangażowane w ochronę integralności aparatu podziałowego komórki przed uszkodzeniami spowodowanymi szokiem termicznym (Hut i wsp., 2005; Khalouei i

wsp., 2014a). Uważa się również, że akumulacja białek HSPA w jąderkach jest wyrazem ich ewolucyjnie konserwowanych funkcji, związanych najprawdopodobniej z zapewnieniem prawidłowej biogenezy oraz funkcjonowania rybosomów (Pelham 1984; Velichko et al. 2013). Zaproponowano również, że akumulacja HSPA6 w jądrze komórkowym może być związana z przywróceniem procesu transkrypcji, który ulega zahamowaniu w komórkach eksponowanych na stres termiczny (Khalouei i wsp., 2014b). Dlatego też na podstawie uzyskanych przez nas wyników proponujemy, że HSPA2 również może działać ochronnie w stosunku do struktur oraz procesów zachodzących na terenie jądra komórkowego oraz centrosomów (Ściegłńska i wsp., 2008).

W kolejnej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Biochemistry and Cell Biology* (Filipczak i wsp., 2012: DŚ – autor korespondencyjny) wykazaliśmy, że HSPA2 ma właściwości cytoprotekcyjne w komórkach eksponowanych na szok termiczny lub inhibitory proteasomu. Efekt ochronny nie ujawniał się gdy komórki poddano działaniu związków cytotoksycznych uszkadzających strukturę mikrotubul lub hamujących działanie topoizomerazy II, co pozwala przypuszczać, że HSPA2 wykazuje pewną selektywność działania cytoprotekcyjnego. Ponadto, nasze wyniki zasygnalizowały, że HSPA2 ma właściwości antyapoptotyczne. Wysoki poziom HSPA2 w komórkach poddanych działaniu bortezomibu (inhibitor proteasomu stosowany w leczeniu szpiczaka mnogiego) sprzyjał zahamowaniu apoptozy (wykrywanej testem TUNEL oraz poprzez ocenę poziomu kaspazy metodą Western blot). Omawiane wyniki uzyskano *in vitro* w układzie heterologicznym, w którym silną konstytutywną nadprodukcję ludzkiego białka HSPA2 wymuszono w fibroblastach chomika linii V79.

Nie ulega wątpliwości, że nasze dotychczasowe osiągnięcia w stopniu istotnym poszerzyły wiedzę o białku HSPA2 wykazując, że w komórkach somatycznych pełni ono funkcje cytoprotekcyjne i antyapoptotyczne (Filipczak i wsp., 2012). Celem naszych obecnych badań jest zidentyfikowanie funkcji HSPA2 w keratynocytach naskórka. Uzyskiwane wyniki pozwalają sądzić, że zapewnia ono zwiększone zdolności adhezyjne niezróżnicowanym keratynocytom naskórka, a jego utrata może wpływać na proces terminalnego różnicowania. Koncentrujemy się także na poznaniu biologicznej roli HSPA2 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). Wyniki kilku prac poświęconych charakteryzowaniu funkcji HSPA2 autorstwa dwóch innych zespołów badawczych wskazują, że białko to jest ważne dla zachowania żywotności, utrzymania aktywności podziałowej oraz zdolności do migracji innych typów komórek nowotworowych (Rohde i wsp., 2005; Garg i wsp., 2010a; Garg i wsp., 2010b). Nasze dotychczas uzyskane wyniki nie potwierdzają znaczenia HSPA2 jako czynnika podtrzymującego żywotność i proliferację komórek NSCLC. Wskazują one natomiast, że HSPA2 może modulować wrażliwość komórek na niektóre leki przeciwnowotworowe na drodze mechanizmu związanego ze zmianami poziomu wolnych rodników tlenowych. Nasze obecne badania realizowane są w ramach projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

W podsumowaniu chciałam zaznaczyć, że w moich pionierskich badaniach wykazałam jednoznacznie, że HSPA2, którego rolę przez lata wiązano wyłącznie z procesem spermatogenezy, jest funkcjonalnym składnikiem proteomu niektórych typów prawidłowych oraz patologicznie zmienionych

komórek somatycznych. Jednak pełniejsze poznanie właściwości HSPA2, które obejmowałoby także wykazanie ewentualnych różnic funkcjonalnych pomiędzy nim, a innymi przedstawicielami rodziny HSPA, wciąż wymaga dalszych badań.

Obszerny opis uzyskanych przez nas wyników włączyliśmy do pracy poglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Cell Stress and Chaperones* (Ściegłńska i Krawczyk, 2015). W pracy tej podsumowaliśmy aktualny stan wiedzy o właściwościach genu *HSPA2* gryzoni i człowieka. Omówiliśmy historyczne informacje dotyczące klonowania tych genów, zebraliśmy dane dotyczące ekspresji, regulacji aktywności genu oraz funkcji białka w komórkach spermatogenicznych, szeroko potraktowaliśmy aspekty związane z ekspresją i funkcją genów w komórkach somatycznych oraz komórkach rakowych.

Podsumowanie osiągniętych wyników:

Badania przedstawione w omówionym cyklu prac doświadczalnych poświęcone były charakteryzowaniu ekspresji oraz funkcji genu *HSPA2* człowieka. Do kolejnych najważniejszych osiągnięć należy wykazanie, że:

- a. białko HSPA2 poza męskimi komórkami mejoetycznymi jest obecne w niektórych populacjach komórek somatycznych człowieka. Jego szczególnie wysoki poziom wykryliśmy w komórkach glejowych mózgu i mózdzku oraz komórkach warstwy podstawnej różnych rodzajów nabłonków wielowarstwowych. Ponadto wykazałam, że w narządach człowieka białko HSPA2 wykazuje odmienną lokalizację niż wysoce homologiczne białko HSPA1.
- b. HSPA2 występuje w wielu typach złośliwych guzów nowotworowych. W niedrobnokomórkowym raku płuca wysoki poziom tego białka powiązany był z krótszym czasem przeżycia chorych, co wskazuje na HSPA2 jako na potencjalny marker prognostyczny.
- c. HSPA2 wykazuje zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowych w warunkach szoku termicznego. Obserwacje te sugerują, że w warunkach stresowych białko to może być zaangażowane w ochronę integralności oraz zachowanie funkcjonalności jądra komórkowego, jąderek oraz centrosomów.
- d. HSPA2 ma właściwości cytoprotekcyjne. Nadprodukcja białka w układzie heterologicznym chroniła komórki przed śmiercią apoptotyczną wywołaną działaniem szoku termicznego i inhibitorów proteasomu.
- e. czynnik transkrypcyjny HIF-1 może w sposób bezpośredni, zróżnicowany i uzależniony od kontekstu komórkowego, modulować poziom transkrypcji genu *HSPA2* (inhibitor w keratynocytach; aktywator w komórkach HeLa). Odkrycie to klasyfikuje *HSPA2* jako przedstawiciela nielicznej grupy genów, w stosunku do których HIF-1 działa jako negatywny

regulator transkrypcji. Ponadto wykazałam, że na poziom transkrypcji genu *HSPA2* wpływa stres oksydacyjny towarzyszący podwyższeniu stężenia tlenu w środowisku niedotlenionych komórek.

Należy zaznaczyć, że ważnym osiągnięciem, które umożliwiło otrzymanie znacznej części wyżej wymienionych oryginalnych rezultatów było otrzymanie wysoce swoistego przeciwciała anti-HSPA2. Otrzymane wyniki, poza lepszym zrozumieniem mechanizmów regulujących ekspresję oraz funkcjonowanie genów i białek rodziny HSPA, mogą również dostarczyć danych o znaczeniu aplikacyjnym. Chociaż na razie trudno precyzyjnie wymienić ich potencjalne zastosowania praktyczne, jednak można wskazać kierunki dalszych badań, które mogą zaowocować takimi osiągnięciami. Biorąc pod uwagę selektywne występowanie HSPA2 w różnych nabłonkach wielowarstwowych (naskórek, nabłonek przetyku, szyjki macicy) jako ważny kierunek poszukiwań należy zaproponować dalsze charakteryzowanie roli HSPA2 w komórkach nabłonkowych. Nasze dotychczas osiągnięte wyniki, łącznie z danymi jeszcze niepublikowanymi pokazują, że HSPA2 jest ważne dla biologii niezróżnicowanych keratynocytów. Można przypuszczać, że dalsze badania doprowadzą do postępu w dziedzinie dermatologii, szczególnie w obszarze leczenia chorób skóry związanych z zaburzeniami różnicowania keratynocytów lub tworzenia ich połączeń z błoną podstawną. Wynikami tych badań mogą zainteresować się także badacze oraz firmy działające w obszarze kosmetologii.

Większość nowotworów złośliwych stanowią raki wywodzące się z różnych typów nabłoneków. Można więc sądzić, że poznanie procesów, w których uczestniczy białko HSPA2 w komórkach prawidłowych nabłoneków, pozwoli na lepsze zrozumienie jego roli w komórkach nowotworowych. Dlatego też ważnym kierunkiem dalszych prac powinny być badania nakierowane na ocenę możliwości wykorzystania HSPA2 jako potencjalnego celu nowych terapii przeciwnowotworowych, a także ocenę jego wartości jako potencjalnego biomarkera (prognostycznego lub predykcyjnego).

Kolejnym potencjalnie istotnym zagadnieniem, które zgłębianie nie zostało dotychczas rozpoczęte, jest zbadanie roli HSPA2 w mózgu. Nasze niepublikowane wyniki wskazują, że szczególnie wysoki poziom HSPA2 występuje w oligodendrocytach (brak w astrocytach i neuronach). Obserwacja ta umożliwia postawienie pytania o rolę HSPA2, jako białka opiekuńczego, w procesie produkcji mieliny lub mielinizacji włókien nerwowych. Można również zapytać o związek pomiędzy ewentualnymi zmianami funkcji genu/białka HSPA2 a rozwojem chorób demielizacyjnych. Wykrycie takich zależności byłoby istotne dla wyjaśniania molekularnych przyczyn tych chorób oraz mogło skutkować zaproponowaniem nowych metod leczenia.

Moje najbliższe plany badawcze obejmują:

1. Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za zależne od poziomu białka HSPA2 zmiany wrażliwości komórek niedrobnokomórkowego raka płuca na leki przeciwnowotworowe (w szczególności pochodne platyny). Wykazanie zależności pomiędzy poziomem ekspresji badanego

genu a cechami fenotypowymi komórek nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich zdolność do migracji oraz adhezji.

2. Zidentyfikowanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zróżnicowany wpływ czynnika HIF-1 na aktywność transkrypcyjną genu *HSPA2* (oraz wybranych innych genów) w keratynocytach i komórkach HeLa.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Pracę badawczą rozpoczęłam w grupie prof. Zdzisława Krawczyka w Zakładzie Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach. W wyniku badań prowadzonych przez zespół wykryto, wstępnie scharakteryzowano (Krawczyk i wsp., 1987; Krawczyk i wsp., 1988) i sklonowano szczurzy jądrowo-swoisty gen *Hst70* (Wisniewski i wsp., 1990) oraz indukowalny gen *Hsp70.1* (Lisowska i wsp., 1994). Celem mojej pracy magisterskiej wykonanej w latach 1994-1995 było zbadanie, czy gen *Hst70* ulega ekspresji poza męskimi komórkami meiotycznymi. Jak wykazałam, stosując nowatorską w ówczesnym czasie metodę RT-PCR, niewielkie ilości transkryptów genu były wykrywalne w narządach somatycznych samców i samic szczurów (Ściegłińska i wsp., 1997).

W latach następnych kontynuowałam badania nad właściwościami genów *Hst70* szczura i *Hsp70.2* myszy. W pracy doktorskiej, poświęconej zbadaniu struktury jednostki transkrypcji w/w genów, udowodniłam przy pomocy metod RT-PCR i Northern blot, iż ich budowa jest identyczna. Oba geny posiadają dwa miejsca startu transkrypcji, oddalone od siebie o około 300 pz, oraz znajduje się w nich pojedynczy intron. W konsekwencji, w spermatocytach i spermatydach gryzoni syntetyzowane są dwa warianty mRNA różniące się sekwencją końca 5' UTR (Ściegłińska i wsp., 2001). W pracy doktorskiej wykonałam także badania funkcjonalne promotora genu *Hst70*, które przeprowadziłam stosując model myszy transgenicznych oraz metodę przejściowych testów transfekcyjnych. Na przełomie lat 1998-1999 odbyłam trzymiesięczny staż w laboratorium prof. Ilpo Huhtaniemi, na Uniwersytecie w Turku, w Finlandii, którego celem było otrzymanie trzech linii myszy transgenicznych, jako modelu do dalszego definiowania fragmentów promotora odpowiedzialnych za wysoka ekspresję genu *Hst70* w jądrach. Efektem tych badań było zidentyfikowanie wysoce konserwowanych ewolucyjnie sekwencji, których jednoczesna obecność zapewniała wysoką aktywność promotora w jądrach myszy transgenicznych, ale także w testach transfekcyjnych prowadzonych na szczurzych komórkach somatycznych hodowanych *in vitro* (Ściegłińska i wsp., 2001). W ramach pracy doktorskiej sklonowałam także fragmenty promotora ludzkiego genu *HSPA2* oraz przeprowadziłam ich wstępną analizę funkcjonalną w szczurzych komórkach somatycznych.

W okresie przed doktoratem brałam też udział w pracach poświęconych charakteryzowaniu struktury indukowalnych genów *Hsp70.1* i *Hsp70.2* szczura (Lisowska i wsp., 1996). Uczestniczyłam w

badaniach, których efektem była identyfikacja sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych bezpośrednio powyżej promotora szurzego genu *Hsp70.1* (Lisowska i wsp., 1997).

W omawianym okresie współpracowałam też z zespołem prof. Barbary Jarzab z Zakładu Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej z Centrum Onkologii – Instytutu, Oddział w Gliwicach, w projekcie poświęconym wdrożeniu do praktyki klinicznej metod detekcji mutacji w proteoonkogenie *RET*. Do moich zadań należało optymalizacja i implementacja metody PCR-RFLP do wykrywania mutacji w kodonie 634 protoonkogenu *RET*. Mutacje w proteoonkogenie *RET*, szczególnie te skutkujące aktywacją produktu białkowego, prowadzą do rozwoju dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy. Większość mutacji w *RET* charakteryzuje się blisko 100% penetracją, co oznacza, że stwierdzenie mutacji germlinalnej u jej nosiciela jest równoznaczne z niemal 100% pewnością rozwoju choroby. Wprowadzenie do postępowania klinicznego analizy mutacji w genie *RET* umożliwiło identyfikację nosicieli mutacji germlinalnych obciążonych ryzykiem rozwoju dziedzicznych postaci raka rdzeniastego (Wiench i wsp., 1998; Jarzab i wsp., 1999) oraz identyfikację takich mutacji u tych chorych, którym nie towarzyszyło oczywiste obciążenie rodzinne (Wiench i wsp., 2001). W szerszym ujęciu, wdrożenie do praktyki klinicznej oceny statusu *RET* przyczyniło się do opracowania obowiązującego algorytmu postępowania medycznego u chorych na raka rdzeniastego tarczycy oraz członków ich rodzin, tj. zaproponowania profilaktycznych zabiegów tyroidektomii u zdrowych nosicieli mutacji.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zainteresowania badawcze skoncentrowały się wokół nowego zagadnienia, które stało się przedmiotem mojej pracy habilitacyjnej. Przygotowałam projekt grantu, który w roku 2003 uzyskał finansowanie z Komitetu Badań Naukowych, a jego głównym celem była charakterystyka struktury genu *HSPA2* człowieka oraz wstępna ocena możliwości występowania jego produktu białkowego w komórkach somatycznych. W efekcie realizacji planowanych eksperymentów udowodniliśmy, że gen *HSPA2* człowieka ma odmienną strukturę niż ortologiczne geny gryzoni – jest bezintronowy i posiada jedno miejsce startu transkrypcji. W konsekwencji, w ludzkich komórkach syntetyzowany jest tylko jeden wariant mRNA. Zidentyfikowaliśmy także region promotorowy obejmujący około 400 par zasad zlokalizowanych bezpośrednio powyżej miejsca startu translacji (kodonu ATG), który w testach funkcjonalnych *in vitro* zapewniał ekspresję genu wskaźnikowego CAT w ludzkich komórkach nowotworowych. Wykazaliśmy także, że transkrypty *HSPA2* są obecne w liniach komórek prawidłowych oraz nowotworowych wywodzących się z różnych lokalizacji anatomicznych (Pigłowski i wsp., 2007; DŚ autor korespondencyjny). Omówione wyniki zainspirowały mnie do postawienia hipotezy, że gen *HSPA2* człowieka oraz homologiczne geny gryzoni różnią się strukturą jednostki transkrypcji, oraz także mogą znajdować się pod kontrolą innych mechanizmów regulacyjnych, posiadać odmienny wzór ekspresji oraz, być może funkcje. Prace będące efektem weryfikacji w/w hipotezy wchodzą w skład cyklu publikacji, który jest podstawą wniosku habilitacyjnego.

W okresie po doktoracie w dalszym ciągu uczestniczyłam w badaniach poświęconych poznawaniu mechanizmów warunkujących silną ekspresję genu *Hst70* szczura w spermatocytach. Najważniejszym wynikiem tych prac było wykrycie elementów regulatorowych „*cis*”, koniecznych dla zapewnienia wysokiej ekspresji genu *Hst70* w jądrach myszy transgenicznych. Są to sekwencje obecne w części 5' eksonu 1 (blok A), na łączeniu ekson 1 – intron (blok B) oraz w intronie (blok GC). Analizując wiązanie białek jądrowych do DNA metodą „*band shift assay*” wykazałam, że z sekwencją oktamerową (Oct) obecną w bloku A oddziałują czynniki transkrypcyjne o charakterze inhibitorów transkrypcji (Ściegłińska i wsp., 2004). Natomiast wiązanie czynników regulatorowych „*trans*” do sekwencji bloku GC oraz bloku B zapewnia wysoką aktywność promotora genu w jądrach myszy transgenicznych (Widłak i wsp., 2007a).

Poszukując układu doświadczalnego, który byłby mniej czasochłonną alternatywą dla modelu myszy transgenicznych, a jednocześnie dawał możliwość wiarygodnej analizy funkcjonalnej promotorów genów ulegających ekspresji w komórkach spermatogenicznych, porównaliśmy trzy różne metody badania aktywności sekwencji promotorowych (Widłak i wsp., 2003b). Zestawiliśmy wyniki uzyskane z zastosowaniem myszy transgenicznych, metody elektroportacji jąder *in vivo* oraz metody transfekcji przejściowych *in vitro*. Jako modelowy wybraliśmy promotor genu *Hst70* szczura. Byłam odpowiedzialna za zbadanie aktywności fragmentów promotora metodą transfekcji przejściowych. Osiągnięte wyniki wskazały, że jedynie model myszy transgenicznych zapewnia wiarygodną ocenę aktywności promotora genu *Hst70*, natomiast pozostałe metody posiadają spore ograniczenia i mogą nadawać się jedynie do wstępnej oceny aktywności genów hybrydowych (Widłak i wsp., 2003b).

Byłam także zaangażowana w prace realizowane przez dr hab. Wiesławę Widłak, których celem było zbadanie wpływu czynnika transkrypcyjnego HSF-1, głównego aktywatora ekspresji indukowalnych genów rodziny HSPA, na proces spermatogenezy. Nasze obserwacje wskazywały, że swoista nadprodukcja HSF-1 w jądrach myszy prowadzi do zahamowania spermatogenezy na drodze śmierci apoptotycznej spermatocytów (Widłak i wsp., 2003a). Uczestniczyłam w pracach, które zaowocowały otrzymaniem linii myszy transgenicznych, w spermatocytach których był syntetyzowany konstytutywnie aktywny mutant HSF-1. Wprowadzony transgen składał się z promotora genu *Hst70* przyłączonego do sekwencji kodującej zmutowaną formę czynnika HSF-1 (Widłak i wsp., 2003a). Możliwość detekcji białka kodowanego przez geny *Hsp70.2* gryzoni, która pojawiła się dzięki otrzymaniu przez nas poliklonalnej surowicy króliczej anti-HSPA2 (Ściegłińska i wsp., 2008), pozwoliła na wykazanie, że nadprodukcja konstytutywnie aktywnego czynnika HSF-1 prowadzi do obniżenia poziomu białka Hsp70.2/HSPA2 w spermatocytach myszy (Widłak i wsp., 2007b). Otrzymanie przeciwciała anti-HSPA2 ułatwiło także zbadanie wzoru ekspresji białka Hsp70.2/HSPA2 w tkankach myszy (Vydra i wsp., 2009). W konsekwencji możliwe było wykazanie, że wzór lokalizacji białek Hsp70.2/HSPA2 i HSPA2 w narządach myszy i człowieka jest odmienny. Szczegółowe zestawienie podobieństw i różnic zamieściliśmy w pracy poglądowej Ściegłińska i Krawczyk (2015) wchodzącej w skład cyklu prac.

Brałam także udział w projekcie dr hab. Marka Rusina, celem moich prac było zbadanie możliwości indukcji procesu makroautofagii w komórkach nowotworowych traktowanych związkami modulującymi aktywność białka p53 (nutlina-3a, aktynomycyna D) (Zajkowicz i wsp., 2015)

Uczestniczyłam także w badaniach o charakterze aplikacyjnym, których celem było wprowadzenie do praktyki klinicznej wykrywania somatycznych mutacji w protoonkogenie *K-RAS* u pacjentów z rakiem jelita grubego. W ostatnich latach osiągnięto znaczący postęp w leczeniu tej choroby wynikający między innymi z wprowadzenia do terapii leków nowej generacji (przeciwciała, inhibitory drobnocząsteczkowe) nakierowanych na hamowanie aktywności receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR. Chorzy odnoszą korzyść z terapii tymi lekami jedynie, jeśli w guzie nie występuje zmutowany wariant białka K-RAS. Naszym celem było opracowanie standardowej procedury oznaczania statusu genu *K-RAS* w DNA izolowanym z blozków parafinowych. Prace prowadzone były równocześnie w pięciu ośrodkach w Polsce, w których odbywa się leczenie chorych na raka jelita grubego. Udowodniliśmy wraz z dr hab. Markiem Rusinem, że zespół Centrum Onkologii – Instytutu, Oddziału w Gliwicach jest przygotowany do oznaczania mutacji w genie *K-RAS* metodą bezpośredniego sekwencjonowania. Wynik omawianego projektu opisano w pracy Tysarowski i wsp., (2008). W następstwie naszych działań wymieniona wyżej metoda została wdrożona do badania mutacji genu *K-RAS* u pacjentów leczonych w gliwickim oddziale Centrum Onkologii - Instytutu. Ponadto, kolekcja preparatów DNA o znanym statusie genu *K-RAS*, którą wówczas zgromadziłam, posłużyła do optymalizacji detekcji mutacji w krążącym pozakomórkowym DNA izolowanym z surowicy pacjentów (Mazurek i wsp., 2013).

Wyniki moich prac były też prezentowane na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych, co opisane jest w załączniku nr 4.

Reasumując moje osiągnięcia naukowo-badawcze, które nie wchodzą w skład cyklu badań będącego podstawą pracy habilitacyjnej, obejmują 17 prac doświadczalnych, z których 14 ukazało się w renomowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny IF = 36,616). Całkowity IF wszystkich moich prac wynosi 56,98. Liczba cytowań tych prac to 226, w tym 176 bez autocytowań (dane wg. bazy Web of Science z dnia 10.09.2015).

Szczegółowy opis mojego wkładu w przygotowanie wszystkich wyżej omówionych prac znajduje się w załącznikach nr 3 i 4.

Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, popularyzatorskich, zrealizowanych grantach, współpracy międzynarodowej itp. podałam w załączniku nr 4.

Dorota Ściegłińska
17 Gliwice, 09 października 2015

Spis literatury

- Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD (1994) Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 23:85-93.
- Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK (2013) Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* 87:19-48.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3264-3268.
- Filipczyk PT, Pigłowski W, Glowala-Kosinska M, Krawczyk Z, Scieglinska D (2012) HSPA2 overexpression protects V79 fibroblasts against bortezomib-induced apoptosis. *Biochem Cell Biol* 90:224-231.
- Fu Y, Zhao H, Li XS, Kang HR, Ma JX, Yao FF, Du N (2014) Expression of HSPA2 in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Tumour Biol* 35:11283-11287.
- Garg M, Kanojia D, Saini S, Suri S, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010a) Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells. *Cancer* 116:3785-3796.
- Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010b) Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion. *Eur J Cancer* 46:207-215.
- Guzhova IV, Shevtsov MA, Abkin SV, Pankratova KM, Margulis BA (2013) Intracellular and extracellular Hsp70 chaperone as a target for cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 29:399-408.
- Habryka A, Gogler-Piğłowska A, Sojka D, Kryj M, Krawczyk Z, Scieglinska D (2015). Cell type-dependent modulation of the gene encoding heat shock protein HSPA2 by hypoxia-inducible factor HIF-1: Down-regulation in keratinocytes and up-regulation in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1849:1155-1169.
- Hageman J, van Waarde MA, Zylicz A, Walerych D, Kampinga HH (2011) The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. *Biochem J* 435:127-142.
- Huang WJ, Xia LM, Zhu F, Huang B, Zhou C, Zhu HF, Wang B, Chen B, Lei P, Shen GX, De A (2009) Transcriptional upregulation of HSP70-2 by HIF-1 in cancer cells in response to hypoxia. *Int J Cancer* 124:298-305.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD (1997) Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 56:1020-1024.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L (2000) Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 63:925-932.
- Hut HM, Kampinga HH, Sibon OC (2005) Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell* 16:3776-3785.
- Jarząb B, Włoch J, Wiench M, Gubała E, Wygoda Z, Lange D, Fiszer-Kierzkowska A, Ściegłńska D, Lisowska K, Kula D, Krawczyk Z (1999) Wczesna diagnostyka zespołu mnogiej gruczołakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2 poprzez analizę genetyczną germinalnych mutacji protoonkogenu RET. *Endokrynol Pol* 50: 127-134.
- Kakkar V, Meister-Broekema M, Minoia M, Carra S, Kampinga HH (2014) Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Mod Mech* 7:421-434.
- Kampinga H, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009) Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins. *Cell Stress Chaperones* 14:105-111.
- Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C (2011) Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* 1816:89-104.
- Khalouei S, Chow AM, Brown IR (2014a) Stress-induced localization of HSPA6 (HSP70B') and HSPA1A (HSP70-1) proteins to centrioles in human neuronal cells. *Cell Stress Chaperones* 19:321-327.
- Khalouei S, Chow AM, Brown IR (2014b). Localization of heat shock protein HSPA6 (HSP70B') to sites of transcription in cultured differentiated human neuronal cells following thermal stress. *J Neurochem*. 131:743-754.
- Krawczyk Z, Mali P, Parvinen M (1988) Expression of a testis-specific hsp70 gene-related RNA in defined stages of rat seminiferous epithelium. *J Cell Biol* 107:1317-1323.

- Krawczyk Z, Szymik N, Wiśniewski J (1987). Expression of hsp70-related gene in developing and degenerating rat testis. *Mol Biol Rep* 12:35-41.
- Krzemień K.(2010). Klonowanie promotora genu HSPA2 oraz analiza in silico potencjalnych miejsc oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi. Praca magisterska, Politechnika Śląska Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii.
- Lisowska K, Krawczyk Z, Widłak W, Wolniczek P (1994). Isolation and structural analysis of rat heat-inducible hsp70 gene. *Acta Biochim Pol*. 41:110-112.
- Lisowska K, Loch T, Fiszer-Kierzkowska A, Sciegłińska D, Krawczyk Z (1997) Identification of a microsatellite region composed of a long homopurine/homopyrimidine tract surrounded by AT-rich sequences upstream of the rat stress-inducible hsp 70.1 gene. *Acta Biochim Pol* 44:147-152.
- Lisowska K, Sciegłińska D, Krawczyk Z (1996) Construction of cDNA library from liver RNA of heat shocked rats and DNA sequence analysis of the clone containing the 3'-end untranslated region (3'UTR) of the heat inducible gene hsp70.2. *Acta Biochim Pol* 43:313-317.
- Mazurek AM, Fiszer-Kierzkowska A, Rutkowski T, Składowski K, Pierzyna M, Sciegłińska D, Woźniak G, Głowacki G, Kawczyński R, Małusecka E (2013) Optimization of circulating cell-free DNA recovery for KRAS mutation and HPV detection in plasma. *Cancer Biomark* 13:385-394.
- Nys K, Maes H, Dudek AM, Agostinis P (2011) Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1alpha in skin carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1816:1-12.
- Pelham H. R. (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J*. 3: 3095–3100.
- Piğłowski W (2004) Analiza funkcjonalna promotora genu *HSPA2* metodą przejściowych testów transfekcyjnych. Praca magisterska, Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki i Biologii Komórki.
- Piğłowski W, Nowak R, Krawczyk Z, Sciegłinska D (2007) The structural and functional analysis of the human HSPA2 gene promoter region. *Acta Biochim Pol* 54:99-106
- Rezvani HR, Ali N, Nissen LJ, Harfouche G, de Verneuil H, Taieb A, Mazurier F (2011) HIF-1alpha in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *J Invest Dermatol* 131:1793-1805.
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 19:570-582.
- Schlecht R, Scholz SR, Dahmen H, Wegener A, Sirrenberg C, Musil D, Bomke J, Eggenweiler HM, Mayer MP, Bukau B (2013). Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS One*. 8:e78443. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8.
- Schmid TE, Multhoff G (2012) Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. *Curr Med Chem* 19:1765-1770.
- Sciegłinska D, Gogler-Piğłowska A, Butkiewicz D, Chekan M, Małusecka E, Harasim J, Habryka A, Krawczyk Z (2014) HSPA2 is expressed in human tumors and correlates with clinical features in non-small cell lung carcinoma patients. *Anticancer Res* 34:2833-2840
- Sciegłinska D, Krawczyk Z (2015) Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2 gene in rodents and humans. *Cell Stress Chaperon* 20:221-235.
- Sciegłinska D, Piğłowski W, Chekan M, Mazurek A, Krawczyk Z (2011) Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 135:337-350.
- Sciegłinska D, Piğłowski W, Mazurek A, Małusecka E, Zebracka J, Filipczak P, Krawczyk Z (2008) The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. *J Cell Biochem* 104:2193-2206.
- Sciegłinska D, Widłak W, Konopka W, Poutanen M, Rahman N, Huhtaniemi I, Krawczyk Z (2001). Structure of the 5' region of the Hst70 gene transcription unit: presence of an intron and multiple transcription initiation sites. *Biochem J*. 359:129-37.
- Sciegłinska D, Vydra N, Krawczyk Z, Widłak W (2004) Location of promoter elements necessary and sufficient to direct testis-specific expression of the Hst70/Hsp70.2 gene. *Biochem J* 379:739-47.

Ściegłińska D, Widłak W, Rusin M, Markkula M, Krawczyk Z (1997) Expression of the testis-specific HSP70-related gene (*hst70* gene) in somatic non-testicular rat tissues revealed by RT-PCR and transgenic mice analysis. *Cell Biol Int* 21:813-21.

Sherman MY, Gabai VL (2015) Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* 34:4153-4161.

Son WY, Hwang SH, Han CT, Lee JH, Kim S, Kim YC (1999) Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod* 5:1122-1126.

Tysarowski A, Fabisiewicz A, Kolasa I, Kupryjańczyk J, Ściegłińska D, Rusin M, Krawczyk Z, Woźniak A, Morzuch L, Limon J, Kowalczyk O, Chyczewski L, Wójcik P, Stachura J, Wieruszewska-Kowalczyk K, Pokrzepa M, Olszewski WP, Nowacki MP, Siedlecki JA (2008) Walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w kodonie 12 i 13 genu K-RAS przeprowadzona w pięciu ośrodkach badawczo-naukowych Polski. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 4:232-244

Velichko A. K., Markova E. N., Petrova N. V., Razin S. V. and Kantidze O. L. (2013) Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 4229-4241.

Villar D, Ortiz-Barahona A, Gómez-Maldonado L, Pescador N, Sánchez-Cabo F, Hackl H, Rodriguez BA, Trajanoski Z, Dopazo A, Huang TH, Yan PS, Del Peso L (2012). Cooperativity of stress-responsive transcription factors in core hypoxia-inducible factor binding regions. *PLoS One*. 7:e45708.

Vydra N, Winiarski B, Rak-Raszewska A, Pigłowski W, Mazurek A, Ściegłińska D, Widłak W (2009) The expression pattern of the 70-kDa heat shock protein Hspa2 in mouse tissues. *Histochem Cell Biol*. 132:319-330.

Widłak W, Vydra N, Małusecka E, Dudaladava V, Winiarski B, Ściegłińska D, Widłak P (2007b) Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes. *Genes Cells*. 12:487-499.

Widłak W, Benedyk K, Vydra N, Głowala M, Ściegłińska D, Małusecka E, Nakai A, Krawczyk Z (2003a). 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*. 50:535-541.

Widłak W, Ściegłińska D, Vydra N, Małusecka E, Krawczyk Z (2003b) In vivo electroporation of the testis versus transgenic mice model in functional studies of spermatocyte-specific *hst70* gene promoter: A comparative study. *Mol Reprod Dev* 65:382-388.

Widłak W, Vydra N, Dudaladava V, Ściegłińska D, Winiarski B, Krawczyk Z (2007a) The GC-box is critical for high level expression of the testis-specific Hsp70.2/Hst70 gene. *Acta Biochim Pol* 54:107-112.

Wienc M, Ściegłińska D, Lisowska K, Włoch J, Wygoda Z, Gubała E, Lange D, Krawczyk Z, Jarzab B (1998) Analiza genetyczna rodziny obciążonej zespołem mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2A. *Nowotwory* 48:683-691

Wienc M, Wygoda Z, Gubała E, Włoch J, Lisowska K, Krassowski J, Ściegłińska D, Fiszer-Kierzkowska A, Lange D, Kula D, Zeman M, Roskosz J, Kukulska A, Krawczyk Z, Jarzab B (2001) Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol* 19:1374-1380.

Wisniewski J, Kordula T, Krawczyk Z (1990) Isolation and nucleotide sequence analysis of rat testis-specific major heat shock (*hsp70*)-related gene. *Biochim Biophys Acta* 1048:93-99.

Zajkiewicz A, Gdowicz-Kłosok A, Krześniak M, Ściegłińska D, Rusin M (2015) Actinomycin D and nutlin-3a synergistically promote phosphorylation of p53 on serine 46 in cancer cell lines of different origin. *Cell Signal*. 27:1677-1687.

Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Hunt CR (1988) Identification and sequence analysis of a new member of the mouse HSP70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Mol Cell Biol* 8:2925-2932.

Zhang H, Chen W, Duan CJ, Zhang CF (2013) Overexpression of HSPA2 is correlated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 11:141.

Zhang H, Gao H, Liu C, Kong Y, Wang C, Zhang H (2015). Expression and clinical significance of HSPA2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diagn Pathol*. 10:13.

20 Dorota Ściegłińska
Alina, 09 października 2015 r.