

AUTOREFERAT

dr n. biol. Ewa Pocheć

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, listopad 2015

1. Imię i nazwisko

Ewa Pocheć

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister biologii: tytuł uzyskany w dn. 14.06.1999 na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ

praca magisterska pt. "Wpływ laktogenu łożyskowego na steroidogenezę komórek lutealnych ciała żółtego świni"

promotor: Prof. dr hab. Ewa Łucja Gregoraszczyk

recenzent: Prof. dr hab. Edward Wierchoś (wcześniej Akademia Rolnicza, obecnie Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)

Doktor nauk biologicznych: stopień uzyskany w dn. 25.11.2003 na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ

rozprawa doktorska pt. "Charakterystyka i funkcja glikanów integryny $\alpha 3 \beta 1$ w wybranych liniach komórkowych pęcherza moczowego i czerniaka"

promotor: Prof. dr hab. Anna Lityńska

recenzenci: Prof. dr hab. Elwira Lisowska (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im L. Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Wrocław), Prof. dr hab. Jerzy Kościelak (Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Polska Akademia Nauk, Warszawa)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.10.1999 – 25.11.2003: doktorantka w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ

1.02.2004 – 31.01.2007: asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów (wcześniej Zakładzie Fizjologii Zwierząt) Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ

od 1.02.2017: adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ

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.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Glikozylacja integryn jako istotny element zmian patologicznych

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa):

Impact factor (IF) podano wg Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania pracy, punkty MNiSW wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (lista A) opublikowanego w dniu 31.12.2014; liczbę cytowań wg Web of Science (dane z dnia 19.11.2015).

1. **Pocheć E.**, Janik M., Hoja-Łukowicz D., Link-Lenczowski P., Przybyło M., Lityńska A. (2013) Expression of integrins $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ and GlcNAc $\beta 1,6$ glycan branching influences metastatic melanoma cell migration on fibronectin. *Eur J Cell Biol* 92(12):355-62.

IF: 3.699

punkty MNiSW: 25

liczba cytacji: 5, bez autocytacji: 3

2. **Pocheć E.**, Bubka M., Rydlewska M., Janik M., Pokrywka M., Lityńska A. (2015a) Aberrant glycosylation of $\alpha v\beta 3$ integrin is associated with melanoma progression. *Anticancer Res* 35(4):2093-103.

IF: 1.826

punkty MNiSW: 20

liczba cytacji: 1, bez autocytacji: 0

3. **Pocheć E.**, Ząbczyńska M., Bubka M., Homa J., Lityńska A. (2015b) $\beta 1,6$ -branched complex-type N-glycans affect FAK signaling in metastatic melanoma cells. *Cancer Invest* doi: 10.3109/07357907.2015.1102928.

IF: 2.218

punkty MNiSW: 20

liczba cytacji: 0, bez autocytacji: 0

4. **Pocheć E.**, Rydlewska M., Przybyło M., Lityńska A. (2015c) Diverse expression of N-acetylglucosaminyltransferase V and complex-type $\beta 1,6$ -branched N-glycans in uveal and cutaneous melanoma cells. *Acta Biochim Pol* 62(2):323-8.

IF: 1.153

punkty MNiSW: 15

liczba cytacji: 0, bez autocytacji: 0

5. **Pocheć E.**, Bocian K., Ząbczyńska M., Korczak-Kowalska G., Lityńska A. (2015d) Immunosuppressive drugs affect high-mannose/hybrid N-glycans on human allostimulated leukocytes. *Anal Cell Pathol* (2015): 324980.

IF: 0.846

punkty MNiSW: 15

liczba cytacji: 0, bez autocytacji: 0

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **9.742**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (2014): **95**

Liczba cytowań: **6**, w tym bez autocytacji **3**

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

Zaburzenia w oddziaływaniach komórek z otaczającą je macierzą pozakomórkową są przyczyną procesów patologicznych zachodzących w organizmie, co w efekcie prowadzi do rozwoju różnych chorób. W oddziaływaniach komórek z białkami macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) pośredniczą transbłonowe białka adhezyjne, spośród których kluczowe dla wielu procesów komórkowych są heterodimeryczne białka – integryny. Ich funkcja "integracji" wnętrza komórki ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym regulowana jest przez N-glikany [Gu i Taniguchi, 2004; Janik i in. 2010]. Domena zewnątrzkomórkowa obydwu podjednostek integryn określanych symbolami α i β jest obficie N-glikozylowana. Ubytek masy cząsteczkowej integryn po deglikozylacji N-glikozydazą F wskazuje, że komponenta cukrowa stanowi znaczącą część całej glikoproteiny [Pocheć i in., 2003; Pocheć i in., 2015a], co wynika z obecności kilkunastu miejsc N-glikozylacji w podjednostce α i kilku w podjednostce β . Duża zawartość części cukrowej sprawia, że oligosacharydy w istotny sposób wpływają na aktywność integryn. Chociaż regulacja funkcji integryn przez ich składnik oligosacharydowy jest przedmiotem zainteresowania różnych grup badawczych, ciągle jeszcze wiele pytań w tej kwestii pozostaje bez odpowiedzi. Moje badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były pierwszymi w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów Instytutu Zoologii UJ, które podejmowały problematykę glikozylacji integryn. Ich celem była charakterystyka N-glikozylacji integryny $\alpha\beta 1$, jednej z kluczowych integryn kojarzonych z rozwojem nowotworów. Modelem badawczym były linie komórkowe dwóch nowotworów: pęcherza moczowego i czerniaka. Uzyskane wyniki wykazały, że glikozylacja integryny $\alpha\beta 1$ zmienia się w procesie nowotworzenia obydwu typów nowotworów, co wpływa na oddziaływanie tego receptora z białkami macierzy pozakomórkowej [Lityńska i in., 2002; Pocheć i in., 2003; Pocheć i in., 2006]. Wyniki spotkały się z zainteresowaniem środowiska naukowego, o czym świadczy duża liczba cytowań ww. prac (Załącznik 3, pkt II.F). Badania stanowiące podstawę prezentowanego osiągnięcia naukowego są kontynuacją tematyki, którą zajmowałam się w ramach swojego doktoratu. **Celem badań stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe była charakterystyka strukturalna i funkcjonalna glikozylacji integryn w warunkach patologicznych.** Materiałem badawczym były linie komórkowe ludzkiego czerniaka pochodzące z różnych etapów rozwoju choroby i różniące się pochodzeniem (czerniak skóry i oka) oraz ludzkie leukocyty poddane stymulacji allogenicznej w warunkach *in vitro*. Badania na nowotworowych liniach komórkowych rozszerzono o hodowlę pierwotne MLR (ang. *mixed leukocyte reaction*) stanowiące model reakcji immunologicznej w odpowiedzi na obce antygeny, z którą w warunkach *in vivo* mamy do czynienia po transplantacjach narządów.

Zasadnicza część prezentowanych badań odnosi się do patologii nowotworów. Jako model posłużyły komórki czerniaka, jednego z najbardziej agresywnych nowotworów. Nabycie zdolności do tworzenia przerzutów przez komórki czerniaka czyni go praktycznie nieuleczalnym, dlatego dokładne poznanie zmian zachodzących na etapie przejścia z fazy wzrostu wertykalnego (VGP, ang. *vertical growth phase*) do fazy metastatycznej jest niezwykle istotne w poszukiwaniu sposobów na zahamowanie procesu tworzenia przerzutów. Wielokrotnie wykazywano, że nabycie zdolności do

migracji wiąże się ze zmianą ekspresji integryn na powierzchni komórek nowotworowych [Kuphal i in., 2005; Huttenlocher i Horwitz, 2011]. Ekspresja integryn zależy od etapu rozwoju nowotworu, co jest konsekwencją zmiany mikrośrodowiska komórki nowotworowej i profilu białek ECM, z którymi migrująca komórka ma kontakt [Hood i Cheresch, 2002]. Natomiast moje badania, jako jedno z niewielu prowadzonych na komórkach czerniaka ludzkiego, miały na celu pokazać, czy temu procesowi towarzyszą zmiany glikozylacji integryn. Do badań posłużyły linie komórkowe czerniaka skóry reprezentujące dwa ostatnie etapy rozwoju nowotworu. Komórki linii WM793 wyprowadzono z guza pierwotnego wczesnej fazy VGP a linię WM1205Lu uzyskano z przerzutu do płuc. Komórki obydwu linii pochodzą od tego samego pacjenta, co eliminuje wpływ tła genetycznego na uzyskane wyniki [Cornil i in., 1991]. Pierwszy etap badań dotyczył określenia glikozylacji receptorów $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ oraz roli glikozylacji tych integryn w migracji komórek czerniaka. Przeprowadzone badania wykazały, że udział $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ w migracji komórek czerniaka zależy od etapu rozwoju nowotworu. Zahamowanie migracji po fibronektynie (FN) w obecności przeciwciał anty- $\alpha 3\beta 1$ i anty- $\alpha 5\beta 1$ obserwowano tylko w przypadku linii metastatycznej. Przyczyn stwierdzonych różnic szukano w glikozylacji tych białek. Jedną z najlepiej udokumentowanych zmian glikozylacji, która towarzyszy procesowi nowotworzenia, jest zwiększenie liczby rozgałęzień N-glikanów kompleksowych, w szczególności anten wiązanych $\beta 1,6$ do rdzenia oligosacharydowego [Pocheć i in., 2003; Lau i Dennis, 2008]. Precypitacja z użyciem lektyny PHA-L (*Phaseolus vulgaris* lectin), która specyficznie rozpoznaje glikany $\beta 1,6$ -rozgałęzione oraz zastosowanie inhibitora glikozylacji swainsoniny, który hamuje syntezę glikanów kompleksowych, w tym o antenach wiązanych $\beta 1,6$, wykazały większą zawartość tych struktur w podjednostkach α integryn $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ komórek czerniaka linii metastatycznej w porównaniu z komórkami pierwotnymi z fazy wzrostu VGP. Stwierdzono, że obserwowane różnice glikozylacji wynikają ze zmienionej ekspresji genu *MGAT-5*, kodującego enzym N-acetyloglukozaminylotransferazę V (GnT-V) katalizujący syntezę tych struktur N-glikanów. Potencjał metastatyczny linii WM1205Lu był związany ze wzrostem ekspresji tego enzymu na poziomie genu i białka. Podsumowując: przeprowadzone badania wykazały korelację złośliwości czerniaka ze wzrostem glikozylacji $\beta 1,6$. Stwierdzono, że zmiany te dotyczą integryn $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ oraz są istotne w migracji wyłącznie komórek metastatycznych czerniaka po FN. Uzyskane wyniki zamieszczono w pracy **Pocheć i in., 2013** (pkt 4.2, poz. 1).

Dotychczasowe badania wykazywały udział różnych integryn w progresji czerniaka, spośród których obok receptorów $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$, największe znaczenie ma integryna $\alpha v\beta 3$ [Felding-Habermann i in., 2002]. Ekspresja tego receptora adhezyjnego wykazuje ścisły związek z potencjałem metastatycznym komórek czerniaka [Seftor i in., 1992; Kuphal i in., 2005], dlatego inhibitory $\alpha v\beta 3$ testowane są jako potencjalne leki w terapii przeciwnowotworowej [Desgrosellier i Cheresch, 2010]. Glikozylacja integryny $\alpha v\beta 3$, w przeciwieństwie do profilu jej ekspresji, jest słabo poznana. Po raz pierwszy charakterystyka składu oligosacharydowego $\alpha v\beta 3$ została wykonana przez nasz Zespół w komórkach czerniaka pochodzących z przerzutów [Kremser i in., 2008]. Natomiast celem badań będących częścią mojego osiągnięcia naukowego było określenie zmian glikozylacji $\alpha v\beta 3$ na etapie nabywania zdolności do metastazy przez komórki czerniaka i ocena roli glikozylacji $\alpha v\beta 3$ w migracji. Badania przeprowadzono na tym samym modelu, jak w przypadku opisanych wcześniej badań nad glikozylacją receptorów $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$. Porównanie wyników dla linii pierwotnej WM793 i metastatycznej

WM1205Lu pozwala na ocenę zmian w komórkach, które nabyły zdolność do tworzenia przerzutów. Precypitacja lektyną PHA-L oraz zastosowanie swainsoniny nie wykazały różnic w glikozylacji $\beta 1,6$ integryny $\alpha v\beta 3$, w przeciwieństwie do receptorów $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$. Może to być uwarunkowane odmienną funkcją $\alpha v\beta 3$ i etapem w progresji czerniaka, na którym działają badane integryny. Zastosowanie lektyn o innej specyficy i trawienie glikozydazami pokazały, że struktury wielomannozowe oraz kompleksowe z N-acetyloglukozaminą (GlcNAc) przedzielającą występowały obficie na obydwu podjednostkach integryny komórek pierwotnych linii WM793. Stwierdzono, że w trakcie nabycia zdolności do tworzenia przerzutów zmianie ulega również sialilacja integryny $\alpha v\beta 3$; maleje zawartość kwasów siałowych wiązanych $\alpha 2,6$ w komórkach metastatycznych na korzyść kwasów siałowych $\alpha 2,3$. Test gojenia ran wykazał udział integryny $\alpha v\beta 3$ w migracji po witronektynie (VN) tylko w przypadku komórek metastatycznych, co potwierdza dane literaturowe wskazujące na istotną rolę tego białka na etapie tworzenia przerzutów [Seftor i in., 1992; Kuphal i in., 2005]. W migrację komórek metastatycznych w odróżnieniu od pierwotnych zaangażowane były również sialowane glikany kompleksowe z rozgałęzieniami $\beta 1,6$, co stwierdzono stosując lektyny PHA-L, SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) i MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) w teście gojenia ran po VN. Podsumowując: przeprowadzone badania wykazały, że nabycie potencjału metastatycznego przez komórki czerniaka związane jest ze zmianą glikozylacji integryny $\alpha v\beta 3$. Glikozylacja białek adhezyjnych komórek metastatycznych, w tym integryny $\alpha v\beta 3$ będącej głównym receptorem VN, wpływa na oddziaływania komórek z tym białkiem ECM. Wyniki tej części badań zamieszczono w pracy **Pocheć i in., 2015a** (pkt 4.2, poz. 2).

Oddziaływanie integryn z białkami macierzy pozakomórkowej uruchamia wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, z których najwięcej uwagi naukowców zajmujących się biologią nowotworów przykuwa szlak kinazy ognisk przylegania (FAK, ang. *focal adhesion kinase*). Ekspresja i aktywność kinazy FAK ulega zwiększeniu w przebiegu wielu nowotworów, co prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek i sprzyja kancerogenezie [Guo i Giancotti, 2004; Golubovskaya i in., 2009; Zhao i Guan., 2009]. Kolejny etap moich badań miał odpowiedzieć na pytanie, czy glikozylacja integryn wpływa na sygnalizację wewnątrzkomórkową z udziałem kinazy FAK. Do testów wybrano $\alpha v\beta 3$, która w przeciwieństwie do innych integryn, nie była dotychczas badana pod kątem udziału jej glikozylacji w regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Model badawczy stanowiły metastatyczne komórki czerniaka skóry linii A375 oraz WM266-4. Wybór linii komórkowych podyktowany był wynikami wcześniejszych badań prowadzonych w naszym zespole. W komórkach linii A375 wśród białek PHA-L-pozytywnych izolowanych metodą chromatografii powinowactwa lektynowego zidentyfikowano integrynę $\alpha v\beta 3$ [Pocheć et al., 2003; Ochwat i in., 2004]. Natomiast w przypadku linii WM266-4 w projekcie realizowanym przez Bubka i in. (2014) uzyskano klon stabilnie transfekowanych komórek z nadekspresją GnT-V, który stanowił dobry model do badania wpływu N-glikanów kompleksowych $\beta 1,6$ -rozgałęzionych na wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów. Aktywację szlaku FAK oceniano w teście fosforylacji kinazy w komórkach adherujących do VN metodą immunodetekcji po Western blotingu oraz immunofluorescencji w mikroskopie konfokalnym. Uzyskane wyniki wskazują na udział glikozylacji integryny $\alpha v\beta 3$ w aktywacji szlaku kinazy FAK. Obserwowano różnice w poziomie fosforylacji FAK w komórkach o zmienionej glikozylacji. Zahamowanie syntezy struktur

kompleksowych, w tym $\beta 1,6$ -rozgałęzionych, przez swainsoninę powodowało spadek fosforylacji FAK na Tyr397 w obydwu liniach komórkowych czerniaka. Natomiast nadekspresja oligosacharydów $\beta 1,6$ -rozgałęzionych w komórkach WM266-4 zwiększała pulę kinazy fosforylowanej. Analiza podwójnego barwienia komórek czerniaka na obecność integryny $\alpha\beta 3$ i kinazy FAK w mikroskopie konfokalnym wykazała kolokalizację obydwu białek w ogniskach przylegania, co potwierdziło, że fosforylacja FAK jest następstwem kontaktu komórek z VN za pośrednictwem tej integryny. Metodą lektynoprecypitacji stwierdzono, że obydwie podjednostki integryny $\alpha\beta 3$ cechują się zwiększoną zawartością struktur $\beta 1,6$ -rozgałęzionych w komórkach WM266-4 z nadekspesją GnT-V. Natomiast metodą cytometrii przepływowej wykazano, że ekspresja integryny $\alpha\beta 3$ nie ulegała zmianie ani w obecności swainsoniny, ani w komórkach transfekowanych cDNA dla *MGAT-5*, zatem obserwowane zmiany poziomu fosforylacji kinazy FAK są efektem zmian w glikozylacji receptora VN. Następstwem aktywacji szlaków sygnałowych jest ekspresja genów, które regulują szereg procesów komórkowych, w tym migrację istotną w kontekście tworzenia przerzutów nowotworowych. Dlatego w kolejnym etapie oceniono udział integryny $\alpha\beta 3$ i glikanów $\beta 1,6$ -rozgałęzionych w migracji komórek po VN w teście gojenia ran. Wyniki wskazują, że zawartość struktur $\beta 1,6$ -rozgałęzionych koreluje z większą zdolnością do poruszania się komórek po VN. Jednocześnie obserwowano, że zastosowanie przeciwciał anti- $\alpha\beta 3$ osłabia migrację, potwierdzając jej udział w oddziaływaniu komórek czerniaka z VN podczas przemieszczania się komórek. Uzyskane wyniki po raz pierwszy pokazały zależność aktywacji szlaku kinazy FAK od $\beta 1,6$ -glikozylacji integryny $\alpha\beta 3$ oraz konsekwencje zmiany glikozylacji $\alpha\beta 3$ w migracji komórek czerniaka po VN. Ta część badań została zawarta w pracy **Pocheć i in., 2015b** (pkt 4.2, poz. 3).

Wyniki badań opublikowane w *European Journal of Cell Biology*, *Anticancer Research* i *Cancer Investigation* (pkt 4.2, poz. 1-3) stanowiące część osiągnięcia naukowego, zostały uzyskane w ramach kierowanego przez mnie projektu pt. "Wpływ zahamowania syntezy struktur $\beta(1,6)$ rozgałęzionych N-glikanów na właściwości adhezyjne i inwazyjność komórek czerniaka. Ich rola w modulacji szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału." finansowanego ze środków MNiSW (N N301 55 2338). Uzyskane wyniki mogą być istotne w poszukiwaniach markerów oligosacharydowych progresji czerniaka, co w połączeniu z wiedzą o zmianach ekspresji integryn może mieć w przyszłości wartość diagnostyczną.

Kolejny etap moich badań zrealizowałam uczestnicząc w projekcie pt. "Wpływ glikozylacji białek adhezyjnych na oddziaływanie komórek czerniaka ocznego ze śródbłonkiem" finansowanym ze środków MNiSW (N N303 55 2338). Badania dotyczyły różnic w glikozylacji komórek czerniaka skóry i oka. Naszym celem było określenie poziomu ekspresji dwóch glikozylotransferaz, N-acetyloglukozaminylotransferazy III (GnT-III) kodowanej u ludzi przez gen *MGAT-3* i GnT-V oraz produktów ich działania, odpowiednio N-glikanów kompleksowych z GlcNAc przedzielającą oraz N-glikanów kompleksowych GlcNAc $\beta 1,6$ -rozgałęzionych. Ekspresja i aktywność obydwu enzymów oraz ich oligosacharydowych produktów zmienia się w rozwoju nowotworów. Obecność N-glikanów z rozgałęzieniami $\beta 1,6$ sprzyja progresji choroby nowotworowej [Dennis i in., 1987], natomiast struktury z GlcNAc przedzielającą wykazują działanie supresyjne na wzrost i rozwój nowotworów [Zhao i in., 2006]. Biologia czerniaka oka i skóry, mimo wspólnego pochodzenia obydwu typów nowotworów z

melanocytów, wykazuje zasadnicze różnice, m.in. w etapach progresji choroby. W rozwoju czerniaków skóry wyróżnia się dobrze zdefiniowane fazy, w przeciwieństwie do czerniaka oka [Seftor i in., 1999; Chudnovsky i in., 2005]. Przyczyny tych różnic są jeszcze słabo poznane. Nasze badania przeprowadzone na liniach komórkowych ludzkiego czerniaka skóry (FM-55-P, IGR-39) i oka (92-1, mel-202) wykazały, że komórki te istotnie różnią się zawartością struktur kompleksowych β 1,6 rozgałęzionych. Nie stwierdzono natomiast zależności ekspresji struktur z GlcNAc przedzielającą, enzymu GnT-III ani genu *MGAT-III* od pochodzenia czerniaka. Stosując do detekcji oligosacharydów lektynę PHA-L w metodzie lektynoblotingu oraz lektynofluorescencji w mikroskopie fluorescencyjnym stwierdzono, że komórki czerniaka oka charakteryzują się istotnie większą glikozylacją β 1,6 w porównaniu do czerniaka skóry. Przyczyną różnic w zawartości tych struktur był odmienny poziom enzymu GnT-V w badanych komórkach wynikający z różnej ekspresji genu *MGAT-5*. Komórki czerniaka skóry linii FM-55-P i IGR-39 adherują mocniej do FN [Przybyło i in., 2008], VN [Janik i in., 2014], kolagenu i lamininy [Laidler i in., 2006] oraz migrują wolniej po FN [Przybyło i in., 2008] w porównaniu do czerniaka oka linii 92-1 i mel-202. Obserwowane wcześniej różnice w adhezji i migracji czerniaków o różnym pochodzeniu znajdują uzasadnienie w odmiennej zawartości struktur kompleksowych β 1,6-rozgałęzionych stwierdzonej w obecnych badaniach stanowiących część prezentowanego osiągnięcia naukowego [Pocheć i in., 2015c; pkt 4.2, poz. 4]. Istotne różnice w powierzchniowym poziomie struktur β 1,6-rozgałęzionych N-glikanów potwierdzone metodą lektynofluorescencji w mikroskopie konfokalnym wskazują, że substratami dla GnT-V są m.in. białka adhezyjne. Obecność struktur β 1,6-rozgałęzionych na podjednostkach integrzyn α 3, α 5, α v i β 1 wykazano metodą precypitacji lektyną PHA-L [Przybyło i in., 2008], ale nie obserwowano korelacji glikozylacji integrzyn z pochodzeniem czerniaka, co może wynikać ze znaczących różnic w ich ekspresji określonych metodą cytometrii przepływowej, które uniemożliwiają ilościowe porównanie glikozylacji. Podsumowując: różna zawartość N-glikanów kompleksowych β 1,6-rozgałęzionych stanowi ważny przyczynek do odmiennych właściwości adhezyjnych i migracyjnych czerniaka oka i skóry [Pocheć i in., 2015c; pkt 4.2, poz. 4].

Moje zainteresowania naukowe obejmują również glikozylację integrzyn w odpowiedzi immunologicznej. Oddziaływania za pośrednictwem integrzyn odgrywają bardzo ważną rolę podczas kontaktu komórek układu odpornościowego [Evans i in., 2009], gdyż biorą udział w tworzeniu synapsy immunologicznej umożliwiającej kontakt zaktwowanych leukocytów [Sims i Dustin, 2002] oraz w migracji leukocytów z krwi do tkanek, w tym przechodzeniu przez ścianę naczyń krwionośnych [Rose i in., 2007]. Ostatnia praca cyklu publikacji, będącego podstawą postępowania habilitacyjnego, dotyczy glikozylacji podjednostek β 1 i β 3 integrzyn leukocytów [Pocheć i in., 2015d; pkt 4.2, poz. 5]. Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Immunologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Modelem doświadczalnym była mieszana hodowla ludzkich leukocytów (MLR). Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) wyizolowane z krwi dwóch zdrowych dawców i hodowane *in vitro* stanowiły model stymulacji allogenicznej. Niezgodność antygenowa leukocytów dawców wywoływała wzajemną odpowiedź immunologiczną. Celem badań było określenie glikozylacji komórek w warunkach immunosupresji wywołanej podaniem rapamycyny (Rapa) i cyklosporyny A (CsA), leków standardowo stosowanych w

leczeniu po przeszczepach organów. Analiza lektynowa wykazała zmiany glikozylacji leukocytów traktowanych Rapa, a także łącznie CsA i Rapa. Zmiany dotyczyły zawartości struktur wielomannozowych N-glikanów, co stwierdzono w reakcji z lektyną GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin). Metodą spektrometrii mas wśród białek których glikozylacja uległa zmianie, zidentyfikowano integryny z rodziny $\beta 1$ i $\beta 3$. Wynik zweryfikowano metodą immunoblotingu po trawieniu endoglikozydazą H (Endo H) oraz po precypitacji lektyną GNA. W oparciu o uzyskane wyniki stwierdzono, że zawartość struktur wielomannozowych N-glikanów w cząsteczkach integryn nie zmieniła się, a obserwowane zwiększenie intensywności prążka w lektynoblotingu wynika ze zwiększonej ekspresji tych integryn w obecności CsA i Rapa. Nie zmienia to jednak faktu, że zawartość tych glikanów w leukocytach w stanie immunosupresji zwiększała się znacząco. Metodą cytometrii przepływowej, stosując znakowaną fluorescencyjnie lektynę GNA, potwierdzono zwiększenie liczby struktur wielomannozowych N-glikanów na powierzchni leukocytów traktowanych CsA i Rapa. Nasuwa się pytanie, jakie znaczenie funkcjonalne mogą mieć obserwowane zmiany glikozylacji. Wyniki badań Muchmore i in. (1990) wskazują, że struktury wielomannozowe mogą hamować odpowiedź limfocytów T na obce antygeny w hodowli MLR. Przeprowadzone przez nas badania dowodzą, że jednym z efektów działania leków immunosupresyjnych, dotychczas nie opisywanym, są zmiany glikozylacji leukocytów, które obejmują m.in. integryny z rodziny $\beta 1$ i $\beta 3$. Rola integryn i ich glikozylacji w odpowiedzi immunologicznej była intensywnie badana przez różne grupy naukowców, natomiast ocena wpływu immunosupresji na glikozylację integryn leukocytów została wykazana przez nas po raz pierwszy. Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do kolejnych badań, m.in. oceny funkcjonalnej obserwowanych zmian.

Podsumowując całość badań będących podstawą osiągnięcia naukowego, uzyskane wyniki dostarczyły dowodów, że glikozylacja integryn jest istotna w warunkach patologicznych, zarówno w progresji nowotworów, jak również w odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że:

w progresji ludzkiego czerniaka:

- (1) nabyciu zdolności metastatycznych towarzyszą zmiany glikozylacji $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$; zawartość N-glikanów kompleksowych $\beta 1,6$ -rozgałęzionych ulega zwiększeniu w cząsteczkach integryn $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$, natomiast przebudowa składu oligosacharydowego integryny $\alpha v\beta 3$ dotyczy zwiększonej sialilacji $\alpha 2,3$ w miejsce $\alpha 2,6$ i zmniejszonej zawartości struktur wielomannozowych i kompleksowych z GlcNAc przedzielającą;
- (2) glikozylacja integryn wpływa na migrację metastatycznych komórek czerniaka w przeciwieństwie do komórek guzów pierwotnych; zwiększona $\beta 1,6$ -glikozylacja integryn $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ sprzyja migracji komórek metastatycznych po FN, a w przypadku integryny $\alpha v\beta 3$, zarówno obecność N-glikanów kompleksowych $\beta 1,6$ -rozgałęzionych jak również ich sialilacja są istotne w migracji komórek metastatycznych po VN;
- (3) $\beta 1,6$ -rozgałęzione N-glikany integryny $\alpha v\beta 3$ modulują aktywność wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego z udziałem kinazy FAK, co wpływa na migrację komórek czerniaka po VN;

(4) komórki czerniaka ocznego charakteryzuje większa zawartość β 1,6-rozgałęzionych N-glikanów kompleksowych w porównaniu do czerniaka skórniego, z czego wynika ich słabsza adhezja do białek ECM i większa zdolność do migracji;

w odpowiedzi immunologicznej:

(5) w warunkach immunosupresji ulega zmianie powierzchniowa glikozylacja leukocytów stymulowanych allogenicznie w hodowli MLR;

(6) wśród białek o zwiększonej zawartości struktur wielomannozowych N-glikanów w warunkach immunosupresji zidentyfikowano integryny z rodziny β 1 i β 3.

Wyniki badań uzyskane dla komórek czerniaka, stanowiące opisane osiągnięcie naukowe, mogą mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne. Ze względu na ekspresję zmienioną w procesie nowotworzenia, integryny (np. α v β 3) już są markerami prognostycznymi pozwalającymi na ocenę zaawansowania rozwoju nowotworu i rokowania o przebiegu choroby nowotworowej. Coraz więcej wyników badań, w tym również uzyskanych przez nasz zespół, pokazuje, że nie tylko zmiany ekspresji integryn korelują z rozwojem nowotworów, ale również ich zmieniona glikozylacja. Co więcej, konsekwencje funkcjonalne zmian glikozylacji są nie mniej ważne, niż zmiana repertuaru integryn. Chociaż wykorzystanie diagnostyczne uzyskanych wyników wymaga ich potwierdzenia na materiale klinicznym, stworzenie nowych testów diagnostycznych uwzględniających glikozylację receptorów adhezyjnych, w tym integryn wydaje się być kwestią przyszłości. Uwzględnienie zmienionej glikozylacji białek daje nowe możliwości do zapewnienia skutecznej terapii poprzez indywidualizację leczenia.

Literatura

1. Bubka M, Link-Lenczowski P, Janik M, Pocheć E, Lityńska A. (2014) Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in human melanoma cells. Implications for MCAM N-glycosylation. *Biochimie* 103:37-49.
2. Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel RS. (1991) Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14):6028-32.
3. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. (2005) Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 115(4):813-24.
4. Dennis JW, Laferté S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. (1987) Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236(4801):582-5.
5. Desgrosellier JS, Cheresh DA. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* (1):9-22.
6. Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. (2009) Integrins in immunity. *J Cell Sci* 122(Pt 2):215-25.
7. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. (2002) Involvement of tumor cell integrin α v β 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19(5):427-36.
8. Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG. (2009) Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol* 24(4):503-10.
9. Gu J, Taniguchi N. (2004) Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* 21(1-2):9-15.
10. Guo W, Giancotti FG. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10):816-26.
11. Huttenlocher A, Horwitz AR. (2011) Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(9):a005074.

12. Hood JD, Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91-100.
13. Janik ME, Lityńska A, Przybyło M. (2014) Studies on primary uveal and cutaneous melanoma cell interaction with vitronectin. *Cell Biol Int* 38(8):942-52.
14. Janik ME, Lityńska A, Vereecken P. (2010) Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1800(6):545-55.
15. Kremser ME, Przybyło M, Hoja-Łukowicz D, Pocheć E, Amoresano A, Carpentieri A, Bubka M, Lityńska A. (2008) Characterisation of alpha3beta1 and alpha(v)beta3 integrin N-oligosaccharides in metastatic melanoma WM9 and WM239 cell lines. *Biochim Biophys Acta (Gen Sub)* 1780(12):1421-31.
16. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. (2005) Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24(2):195-222.
17. Laidler P, Lityńska A, Hoja-Łukowicz D, Łabedz M, Przybyło M, Ciołczyk-Wierzbicka D, Pocheć E, Trebacz E, Kremser E. (2006) Characterization of glycosylation and adherent properties of melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 55(1):112-8.
18. Lau KS, Dennis JW. (2008) N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology*. 18(10):750-60.
19. Lityńska A., Pocheć E., Hoja-Łukowicz D., Kremser E., Laidler P., Amoresano A., Monti Ch. (2002) The structure of the oligosaccharides of $\alpha 3 \beta 1$ integrin from human ureter epithelium (HCV29) cell line. *Acta Biochim Pol* 49(2):491-500.
20. Muchmore AV, Sathymoorthy N, Decker J, Sherblom AP. (1990) Evidence that specific high-mannose oligosaccharides can directly inhibit antigen-driven T-cell responses. *J Leukoc Biol* 48(5):457-64.
21. Ochwat D, Hoja-Łukowicz D, Lityńska A. (2004) N-glycoproteins bearing beta1-6 branched oligosaccharides from the A375 human melanoma cell line analysed by tandem mass spectrometry. *Melanoma Res* 14(6):479-85.
22. Pocheć E., Lityńska A., Amoresano A., Casbarra A. (2003) Glycosylation profile of integrin $\alpha 3 \beta 1$ changes with melanoma progression. *Biochim Biophys Acta (Molec Cell Res)* 1643(1-3):113-23.
23. Pocheć E., Lityńska A., Bubka M., Amoresano A., Casbarra A. (2006) Characterization of the oligosaccharide composition of $\alpha 3 \beta 1$ from human bladder carcinoma cell line T24 and its role in adhesion and migration. *Eur J Cell Biol* 85(1):47-57.
24. Przybyło M, Pocheć E, Link-Lenczowski P, Lityńska A. (2008) Beta1-6 branching of cell surface glycoproteins may contribute to uveal melanoma progression by up-regulating cell motility. *Mol Vis* 14:625-36.
25. Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. (2007) Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 218:126-34.
26. Seftor RE, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, Hendrix MJ. (1992) Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5):1557-61.
27. Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. (1999) Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Rev* 18(3):359-75.
28. Sims TN, Dustin ML. (2002) The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* 186:100-17.
29. Zhao J, Guan JL. (2009) Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2):35-49.
30. Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, Inamori K, Isaji T, Kariya Y, Kondo A, Miyoshi E, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. (2006) N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 281(43):32122-30.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Glikobiologia, którą zajmuję się odkąd dołączyłam do zespołu Profesor Anny Lityńskiej w październiku 1999, jest dziedziną, która dotyczy praktycznie wszystkich innych działów biologii. Glikozylowane białka i lipidy obecne są w każdej tkance i każdym organizmie począwszy od jednokomórkowców a skończywszy na człowieku [Spiro, 2002; Varki, 2006]. Początkowo niedoceniana modyfikacja potranslacyjna, obecnie budzi duże zainteresowanie. Coraz częściej pojawiają się opinie, że stanowi ona przyszłość współczesnej nauki. Oligosacharydy dołączane kowalencyjnie do białek i lipidów wprowadzają dużą różnorodność w budowie tych cząsteczek, co przekłada się na ich ogromny

potencjał regulacyjny. Wszystko to sprawia, że glikobiologia daje duże możliwości prowadzenia badań we współpracy z naukowcami z innych dziedzin. Moje zainteresowania badawcze, oprócz glikobiologii nowotworów stanowiącej podstawowy temat badań Zakładu Biochemii Glikokoniugatów UJ, obejmują również glikoimmunologię.

Badania nad glikobiologią czerniaka prowadzę od początku studiów doktoranckich. W ramach pracy doktorskiej zajmowałam się analizą glikozylacji integryny $\alpha 3 \beta 1$. Krótki opis efektów tych badań zamieściłam powyżej (pkt 4.3). Po uzyskaniu stopnia doktora w 2003 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów UJ. W latach 2003 – 2004 uczestniczyłam w projekcie europejskim "European Searchable Tumor Cell Lines Data Bank" (ESTDAB, QLRT-CT-2001-01325), a następnie w latach 2004 – 2007 w kolejnym projekcie finansowanym ze środków UE "European Network for the Identification and International Validation of Antigens and Biomarkers in Cancer and their Application in Tumour Immunology" (ENACT, LSH-2002-2.2.0-8). Badania obydwu projektów, realizowane we współpracy z Katedrą Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum UJ, miały na celu poszukiwanie markerów cukrowych zmienionych nowotworowo w komórkach czerniaka ludzkiego. Scharakteryzowano pod tym kątem ponad 100 linii komórkowych czerniaka z różnych etapów rozwoju choroby oraz o różnym pochodzeniu (czerniak skóry i oka). Z uzyskanych wyników przygotowano trzy prace badawcze: Hoja-Łukowicz i in. (2006), Laidler i in. (2006), Hoja-Łukowicz i in. (2009) oraz jedną przeglądową Lityńska i in. (2008), których jestem współautorką (Załącznik 3, pkt II A, poz. 7, 14 oraz pkt II.D, poz. 1, 2).

W latach 2007 – 2008 prowadziłam badania we współpracy z Profesorem Fedorem Berditchewski (University of Birmingham, United Kingdom) dotyczące oddziaływań tetraspaniny CD151 z integryną $\alpha 3 \beta 1$. W badaniach tych wykazano, że CD151 odgrywa istotną rolę w regulacji potranslacyjnej modyfikacji integryny $\alpha 3 \beta 1$ oraz że zmiany glikozylacji integryny są istotne w migracji komórek nowotworu piersi linii MDA-MB-231 zależnej od tetraspaniny. Efektem tej współpracy jest publikacja Baldwin i in. (2008) (Załącznik 3, pkt II.A, poz. 13).

Od 2007 roku jestem zatrudniona na etacie adiunkta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów UJ. W latach 2008 – 2011 kierowałam projektem finansowanym ze środków MNiSW, w ramach którego powstały trzy prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (pkt 4.2, poz. 1-3). W latach 2010 – 2013 byłam wykonawcą w projekcie "Wpływ glikozylacji białek adhezyjnych na oddziaływanie komórek czerniaka ocznego ze śródbłonkiem" (N N303 55 2338) finansowanym ze środków MNiSW. Z wyników badań, w których uczestniczyłam, powstała praca eksperymentalna wchodząca w skład osiągnięcia naukowego, będącego podstawą postępowania habilitacyjnego (pkt 4.2, poz. 4).

Od kilku lat temat znaczenia zmian glikozylacji w układzie odpornościowym jest ważną częścią mojej pracy naukowej. Oprócz analiz, których celem była ocena zmian glikozylacji integryn w warunkach immunosupresji realizowanych we współpracy z Zakładem Immunologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (opisanych w pkt 4.3), od marca 2014 roku prowadzę badania zmierzające do określenia zmian w glikozylacji białek surowicy, w tym immunoglobulin klasy G (IgG) oraz leukocytów u chorych z przewlekłym limfocytarnym zapaleniem tarczycy (chorobą Hashimoto).

Materiałem do badań jest ludzka surowica i komórki PBMC pozyskane od pacjentów Kliniki Endokrynologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz osób zdrowych odpowiednio dobranych pod względem płci i wieku. Badania są prowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej działającej przy Collegium Medicum UJ w ramach dwóch prac doktorskich realizowanych w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów UJ. Wyniki pierwszej części badań wskazują na zmiany fukozytacji białek leukocytów w przebiegu przewlekłego limfocytarnego zapalenia tarczycy. W kolejnym etapie analizujemy glikozylację IgG stosując metodę ultrasprawną chromatografii cieczowej (UPLC) i metodę lektynową. Analizy metodą UPLC wykonujemy w Laboratorium Glikobiologicznym Genos w Zagrzebiu (Chorwacja) kierowanym przez Prof. Gordana Lauca. Laboratorium Genos specjalizuje się w glikomice białek surowicy, szczególnie glikozylacji IgG i ma bogate doświadczenie w ocenie zmian zachodzących w chorobach autoimmunizacyjnych. Dużą część badań wykonałam podczas miesięcznego stażu w tym ośrodku we wrześniu 2014 roku. Glikozylacja pozostałych białek surowicy analizowana jest w ramach drugiego doktoratu dzięki współpracy z doktorem Pawłem Link-Lenczowskim z Zakładu Fizjologii Medycznej Wydziału Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum UJ.

W latach 2011 – 2014 brałam udział w projekcie kierowanym przez dr Agnieszkę Mazur-Białą (Wydział Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum UJ) pt. "Ryboflawina jako immunomodulator – wpływ niedoboru i wzbogacenia ryboflawiną na wczesne rozpoznanie patogenów i rozwój reakcji zapalnej (badania *in vitro* i *in vivo*)" (UMO-2011/01/D/NZ6/02704). Badania wykazały, że ryboflawina jako istotny czynnik diety wywiera modulujący wpływ na funkcjonowanie makrofagów oraz przebieg reakcji zapalnej. Ponadto stwierdzono przeciwwzapalne działanie ryboflawiny w dawkach farmakologicznych, jak również słaby przeciwwzapalny efekt stężeń obserwowanych przy stosowaniu doustnej suplementacji tej witaminy. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w *Arch Immunol Ther Exp* [Mazur-Biała i Pocheć, 2015] (Załącznik 3, pkt II.A, poz. 20). Kontynuacją tych badań jest kolejny projekt dr Mazur-Biały pt. "Interakcje makrofag/adipocyt w stanie niedoboru i wzbogacenia ryboflawiną – badania w kontekście rozwoju oporności insulinowej", w którym również uczestniczę. Badania mają na celu określenie wpływu ryboflawiny na poziom aktywacji dojrzałych adipocytów oraz ich interakcje z makrofagami w kontekście rozwoju oporności insulinowej.

W latach 2010 – 2012 uczestniczyłam w badaniach zaplanowanych przez dr Joannę Homa (Zakład Immunologii Ewolucyjnej Wydziału BiNoZ UJ) dotyczących efektu apoptotycznego płynów celomatycznych wybranych gatunków dżdżownic na komórki czerniaka. Badania wykazały podatność komórek czerniaka na apoptozę indukowaną czynnikami obecnymi w płynach celomatycznych dżdżownic. Obserwowany efekt apoptotyczny zależał zarówno od składu płynu celomatycznego danego gatunku dżdżownicy i sezonu, w którym gromadzono płyny (wiosenno-letni vs. jesienno-zimowy), jak również od etapu rozwoju czerniaka wybranych linii komórkowych. Publikacja przeglądowa z tej tematyki zawierająca wstępne wyniki przeprowadzonych badań została przyjęta do druku i ukaże się w styczniu 2016 [Matejko S., Pocheć E., Homa J. (2016) Dżdżownice jako źródło biologicznie aktywnych cząsteczek – właściwości przeciwnowotworowe białek dżdżownic. *Kosmos*].

Dzięki współpracy z dr hab. Małgorzatą Kotulą-Balak z Zakładu Endokrynologii Wydziału BiNoZ UJ brałam udział w badaniach mających na celu określenie efektu działania oktylofenolu (OP, ang.

octylphenol) na funkcjonowanie komórek męskiego układu rozrodczego, w tym również na ich glikozylację. Badania prowadzone na linii komórkowej MA-10 wykazały wpływ OP na morfologię i steroidogenezę komórek Leydiga, zależny od dawki i czasu działania tego ksenoestrogenu. W kolejnych badaniach stwierdzono, że OP zmienia profil glikozylacji plemników nornicy rudej oraz poziom wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Efektem tych badań są dwie prace opublikowane w *Toxicology In Vitro* przez Kotula-Balak i in. (2011, 2015) (Załącznik 3, pkt II.A, poz. 16, 19).

W październiku 2013 odbyłam miesięczny staż w laboratorium kierowanym przez Profesora Jianguo Gu (Division of Regulative Glycobiology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japonia) (Załącznik 3, pkt III.L). Efektem mojego stażu było nawiązanie współpracy z zespołem Profesora Jianguo Gu. W maju 2015 Profesor Gu gościł w Zakładzie Biochemii Glikokoniuatów z wykładami dla studentów Wydziału BiNoZ UJ. Ze względu na wspólne zainteresowania badawcze obejmujące glikobiologię nowotworów wizyta Prof. Gu była również okazją do dyskusji wyników i przygotowania planów wspólnych badań (Załącznik 3, pkt III.I).

Moje doświadczenie w zakresie glikobiologii nowotworów i glikoendokrynologii udokumentowane dorobkiem naukowym sprawiło, że dwukrotnie recenzowałam prace z zakresu glikobiologii dla czasopism z listy JCR: w 2009 roku dla *Theriogenology* (IF 1.798) oraz okresie listopad 2014 – maj 2015 dla *Human Reproduction* (IF 4.569) (Załącznik 3, pkt III.P). Przygotowałam również recenzję grantu badawczego dla Swiss National Science Foundation (Szwajcaria, Berno) w 2006 (Załącznik 3, pkt III.O).

W uznaniu szczególnych osiągnięć w pracy naukowej trzykrotnie byłam nagradzana przez JM Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego. W 2005 roku uzyskałam nagrodę zespołową II stopnia, a w 2010 roku nagrodę zespołową III stopnia. Byłam również laureatką stypendium Rektorskiego Funduszu Stypendialnego w roku akademickim 2005/06 (Załącznik 3, pkt II.J).

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 25 publikacji w anglojęzycznych czasopismach specjalistycznych z listy Journal Citation Reports (JCR) i 3 inne prace oraz 57 doniesień na konferencjach międzynarodowych (10) i krajowych (47). Sumaryczny IF moich publikacji wg bazy JCR zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi **61.89**, suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z 31.12.2014 wynosi **639**, a indeks Hirscha wg Web of Science **11** (dane z 19.11.2015). Prace wchodzące w skład mojego dorobku w latach 2000 – 2015 cytowane były łącznie **319** razy, w tym **259** razy nie wliczając autocytowań (dane z 19.11.2015). Zgodnie z analizą bibliograficzną mojego dorobku przygotowaną przez Bibliotekę Medyczną Collegium Medicum UJ w dn. 16.11.2015 (Załącznik nr 5) łączna punktacja IF wg bazy JCR zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi **61.817**, suma punktów KBN/MNiSW zgodnie z rokiem ukazania się publikacji – **486**, suma punktów Index Copernicus (IC) zgodnie z rokiem ukazania się publikacji – **131.63**, współczynnik Hirscha wg Web of Science Core Collection – **12**, łączna liczba cytowań wg Web of Science Core Collection 1945-2015 – **341**.

Regularnie uczestniczyłam w szkoleniach, kursach i warsztatach uzupełniających moje umiejętności metodyczne. W roku akademickim 2007/08 wzięłam udział w kursie dydaktycznym "Ars Docendi" organizowanym przez UJ. W roku 2012 ukończyłam studia podyplomowe na kierunku "Menedżer Badań Naukowych i Prac Rozwojowych" prowadzone przez Fundację Ośrodków Wspomagania Rozwoju Gospodarczego "OIC Poland" oraz Wyższą Szkołę Ekonomii i Innowacji w Lublinie (Załącznik 3, pkt III.Q).

Jestem członkiem dwóch towarzystw naukowych: od 2005 roku Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki (PTBK) oraz od 2011 roku Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (PTBioch). W latach 2011 – 2015 pełniłam funkcję sekretarza Oddziału Krakowskiego PTBK (Załącznik 3, pkt III.H). Wielokrotnie uczestniczyłam w konferencjach naukowych organizowanych przez obydwa Towarzystwa prezentując wyniki badań (Załącznik 3, pkt III.B), w tym trzykrotnie w postaci referatu ustnego (Załącznik 3, pkt II.K).

W ramach działalności organizacyjnej na Uniwersytecie Jagiellońskim pełniłam funkcję sekretarza Instytutowej Komisji Wyborczej ds. wyboru niesamodzielných pracowników do Rady Instytutu Zoologii UJ (maj 2012) oraz członka Komisji Egzaminacyjnej ds. egzaminu wstępnego na kierunek Biologia przeprowadzonego przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ na rok akademicki 2013/2014 na pierwszy rok stacjonarnych studiów drugiego stopnia (lipiec i wrzesień 2013) (Załącznik 3, pkt III.Q).

Mam bogate doświadczenie w zakresie popularyzacji nauki, wielokrotnie uczestniczyłam w pokazach i zajęciach organizowanych w ramach Festiwalu Nauki (2008, 2009, 2010), Małopolskiej Nocy Naukowców (2012, 2013), Małopolskiej Nocy Biologów (2013, 2014), Dnia Otwartego UJ (2013), Uniwersytetu Bliżej Was (2014) oraz zajęciach praktycznych dla uczniów szkół z Krakowa (2010, 2011, 2012, 2014), Raciborza (2014), Radziszowa (2014) i Trzebuni (2015). W każdym przypadku byłam odpowiedzialna za organizację i koordynację zajęć w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów IZ UJ (Załącznik 3, pkt III.I).

Do moich obowiązków oprócz pracy naukowej należy również działalność dydaktyczna. W latach 2003 – 2005 prowadziłam ćwiczenia w ramach kursu Fizjologia zwierząt, w latach 2002 – 2005 prowadziłam zajęcia w ramach kursu Fizjologiczne Techniki Badań. Od 2005 roku prowadzę ćwiczenia i wykłady z kursu Biochemia dla studentów kierunków Biologia i Neurobiologia Wydziału BiNoZ UJ. W roku 2005 uczestniczyłam w organizacji zajęć praktycznych kursu Biochemia, przygotowując instrukcje i prezentacje multimedialne do trzech tematów oraz odczynniki i sale ćwiczeniowe (Załącznik 3, pkt III.I). W latach 2007 – 2015 wypromowałam 13 magistrów biologii i 18 licencjatów. Dwie kolejne prace magisterskie i jedna licencjacka są w trakcie realizacji (Załącznik 3, pkt III.J). Pod moją opieką naukową pracują również dwie doktorantki Zakładu Biochemii Glikokoniugatów (Załącznik 3, pkt III.K). We współpracy ze studentami przygotowałam 3 prace popularno-naukowe. Pierwsza z nich dotycząca roli glikozylacji w układzie odpornościowym ukazała się w *Postęпах Biochemii* w drugim kwartale tego roku [Ząbczyńska i Pocheć, 2015] (Załącznik 3, pkt II.D, poz. 3). Praca przeglądowa opisująca przełom w badaniach naukowych, jaki stanowiło wyprowadzenie pierwszej ludzkiej linii komórkowej HeLa, została przyjęta do druku i będzie opublikowana w styczniu 2016 [Harańczyk N., Pocheć E. (2016) Odkrycie komórek HeLa początkiem rewolucji w badaniach *in vitro*. *Kosmos*]. Na etapie

recenzji w *Postęпах Biologii Komórki* jest manuskrypt pracy na temat roli glikozylacji w aktywacji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) przygotowany przez Ząbczyńska M., Opiola K. i Pocheć E.

Moje doświadczenie dydaktyczne obejmuje również opiekę nad trzema stażystkami. W 2005 roku pracowałam z Magdaleną Tomalą, studentką V roku Gottfried Wilhelm Leibniz Universität w Hanowerze, a w 2012 roku z Oliwią Michalik z Uniwersytetu Gdańskiego i mgr Anną Kozłowską z Zakładu Antropologii Instytutu Zoologii UJ. Celem stażu dwóch pierwszych studentek w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów była nauka metod stosowanych w biochemii i glikobiologii. Natomiast mgr Anna Kozłowska realizowała z moją pomocą część badań w ramach pracy doktorskiej. Stosując metodę immunoblotingu z detekcją chemiluminescencyjną identyfikowała grupy krwi w ludzkim materiale kopalnym z różnych okresów historycznych (Załącznik 3, pkt III.I).

Informacje o pozostałych osiągnięciach naukowych i dydaktycznych, nie uwzględnionych powyżej, przedstawiono w „Wykazie opublikowanych prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” (Załącznik nr 3).

Literatura

Spiro RG. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12(4):43R-56R.

Varki A. (2006) Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell* 126(5):841-5.

Kraków, dnia 19.11.2015


.....
podpis