

Autoreferat

1. *Imię i Nazwisko:* **Beata Kieć-Wilk**

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

dyplom lekarza medycyny- 2001rok, UJCM, Kraków
specjalista chorób wewnętrznych – 2008 rok
specjalizacja z diabetologii – 2011 rok
specjalizacja z laboratoryjnej genetyki medycznej – 2011 rok

tytuł rozprawy doktorskiej: **„Występowanie mutacji genów SERCA-2 i angiotensynogenu oraz poziomu czynników wzrostu: IGF-1, bFGF i TGFβ1 u pacjentów z przerostem lewej komory serca w przebiegu nadciśnienia tętniczego”**, UJCM, Kraków, 2006 rok

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

Studia ukończyłam w roku 2001, z wynikiem bardzo dobrym (druga lokata na roku). W tym samym roku rozpoczęłam staż podyplomowy w Szpitalu Specjalistycznym im Józefa Dietla w Krakowie. W latach 2002-2006 byłam studentką studiów doktorskich na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego. Równocześnie w Klinice Nadciśnienia i Kardiologii Szpitala Uniwersyteckiego (SU) w Krakowie odbyłam 5-letnie szkolenie specjalizacyjne zakończone egzaminem państwowym, w 2008 roku z uzyskaniem stopnia specjalisty chorób wewnętrznych. Od grudnia 2005 roku zostałam zatrudniona w Katedrze Biochemii Klinicznej UJ CM kierowanej przez Pana Prof. Jerzego Nasalskiego, początkowo na etacie techniczno-naukowym, a po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych na etacie asystenta. W tym okresie pracowałam w Pracowni, Biologii Molekularnej i Genetyki, przekształconej w roku 2011 w Zakład Nutrigenomiki i Badań Genetycznych. Od 2008 roku, po uzyskaniu specjalizacji II stopnia z zakresu chorób wewnętrznych (wolontariat na Klinice Nadciśnienia i Kardiologii SU w Krakowie) uzyskałam awans na stopień adiunkta Katedry Biochemii Klinicznej UJCM.

Od roku 2009 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chorób Metabolicznych UJ CM w Krakowie kierowanej przez Pana Prof. dr hab. Macieja Małeckiego, gdzie po dwuletnim szkoleniu specjalizacyjnym w roku 2011 zdałam z wyróżnieniem egzamin specjalizacyjny z diabetologii. Równocześnie nadal kontynuuję szkolenie i pracę z zakresu biologii molekularnej i genetyki, jestem odpowiedzialna za wykonanie analiz sekwencji i interpretację wyników u pacjentów z monogenową formą cukrzycy (MODY).

W trakcie szkoleń kilkakrotnie przebywałam, w ramach pobytów stypendialno-szkoleniowych w laboratoriach biologii molekularnej i genetyki, w wiodących ośrodkach europejskich takich jak:

- Niemcy, Instytut Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet w Ulm, 2001r - Holandia, Instytut Biochemii Klinicznej, Zakład Genetyki Leiden, 2003r.

- Dania, Katedra Biochemii Klinicznej na Uniwersytecie Południowej Danii, Odense, 2003r.

- Anglia; Zakład Naukowy Oddziału Transplantologii na Uniwersytecie w Bristolu, 2004r.

- Irlandia, Department of Nutrigenomics Dublin, 2005r.

- Wielka Brytania, Human Nutrition Research Centre, School of Clinical Medical Sciences. Molecular Biology Unit, Newcastle University, 2006r.

- Norwegia, Oslo; School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biosciences, 2007r.
- Niemcy, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics (MPI-CBG), 2008r.
- Niemcy, Instytut Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Klinikum der Universität Regensburg, 2002 oraz 2011r.

Zdobyte przeze mnie umiejętności pozwoliły na wystąpienie do Komisji Specjalizacji z Genetyki przy CMKP o uznanie mojego dorobku za równoważny z 5–cio letnim szkoleniem specjalizacyjnym. Decyzją Komisji Specjalizacyjnej, potwierdzoną przez Ministra Zdrowia RP otrzymałam zgodę na przystąpienie do egzaminu. W grudniu 2011 roku zdałam z wynikiem bardzo dobrym państwowy egzamin specjalizacyjny z zakresu Laboratoryjnej Genetyki Medycznej.

W pracy lekarskiej zajmuje się chorymi hospitalizowanymi na odcinku klinicznym oraz pracuję w Poradni Diabetologicznej Kliniki Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego, ponadto od 2011 roku powierzono mi nadzór nad programem terapeutycznym chorób ultra-rzadkich, pod moją opieką pozostają pacjenci z wrodzoną chorobą spichrzeniową mukopolisacharydozą typu II, zespół Huntera oraz z hiperamonemią wrodzoną.

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,
- b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),
- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cykl prac obejmujących zagadnienie pt.:

Wybrane aspekty epigenetyki i nutrigenomiki w procesach regulacyjnych angiogenezy

1. **Kiec-Wilk B**, Polus A, Mikołajczyk M, Mathers JC. Beta-carotene and arachidonic acid induced DNA methylation and the regulation of pro-chemotactic activity of endothelial cells and its progenitors. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58(4):757-66
2. **Kiec-Wilk B**, Razny U, Mathers JC, Dembinska-Kiec A. DNA methylation, induced by beta-carotene and arachidonic acid, plays a regulatory role in the pro-angiogenic VEGF-receptor KDR, gene, expression in endothelial cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009;. 60:49-53.
3. **Kiec-Wilk B**, Sliwa A, Mikołajczyk M, Malecki MT, Mathers JC. The CpG island methylation regulated expression of endothelial proangiogenic genes in response to β -carotene and arachidonic acid. *Nutr Cancer.* 2011;63:1053-63.
4. **Kiec-Wilk B**. Rola metylacji DNA w etiopatogenezie chorób układu krążenia. (The role of DNA methylation in etiopathology of coronary heart diseases). *Kardiolog. Pol.* 2010; 68: 202-207.
5. **Kiec-Wilk B**, Czech U, Janczarska K, Knapp A, Goralska J, Ciałowicz U, Malecki MT, Dembinska-Kiec A. Connexin 43 and metabolic effect of fatty acids in stressed endothelial cells. *Genes Nutr.* 2012;7:257-263.

Celem badań była ocena wpływu oraz mechanizmów regulacyjnych wybranych nutrientów na poszczególne etapy procesu angiogenezy (różnicowanie, proliferacja czy chemotaksja) z udziałem zarówno komórek progenitorowych (EPC) jak i zróżnicowanych komórek śródbłonka (HUVEC).

Cele szczegółowe pracy:

Ocena w badaniach *in vitro*:

1. Wpływu fizjologicznych stężeń badanych nutrientów, beta-karotenu (BC) oraz kwasu arachidonowego (AA), na różne etapy procesu angiogenezy.
2. Wpływu BC oraz AA na ekspresję genów kodujących białka uczestniczące w regulacji procesów angiogennych.
3. Mechanizmów epigenetycznych biorących udział w regulacji ekspresji genów proangiogennych.
4. Zmian poziomu białek związanych z procesami angiogennymi kodowanych przez geny KDR, Notch4, CXCL12, IL-8, Cx43.
5. Zmian funkcji mitochondriów w komórkach endotelialnych w warunkach stresu metabolicznego (inkubacja z kwasami tłuszczowymi).

Podsumowanie wyników badań

Niniejsza praca stanowi dokumentację badań prowadzonych w jednostkach Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w latach 2006-2011, dotyczących molekularnych mechanizmów regulacji pierwszych etapów angiogenezy (proliferaacja, chemotaksja, tubulogeneza) przez wybrane składniki diety o wykazanym związku z chorobą nowotworową, w fizjologicznych stężeniach. Badania te obejmowały również ocenę stanu energetycznego komórek endotelialnych w warunkach stresu komórkowego wywołanego inkubacją z wolnymi kwasami tłuszczowymi.

Dotychczas opublikowane wyniki innych grup badawczych dotyczące zmian epigenetycznych (metylacji DNA) w komórkach dotyczyły przede wszystkim komórek nowotworowych. Nowością przedstawionej pracy jest analiza zmian metylacji DNA w prawidłowych ludzkich komórkach takich jak endotelialne komórki progenitorowe (EPC) i komórki śródbłonka (HUVEC) oraz badanie jej roli w procesie fizjologicznym, jakim jest tworzenie naczyń (angiogeneza). Nowe elementy obserwacji dotyczyły też badań nad zmianą epigenetycznej regulacji ekspresji wybranych genów związanych z angiogenezą pod wpływem nutrientów będących składnikami podstawowej diety człowieka jak beta-karoten (BC), kwasy tłuszczowe (WKT), a zwłaszcza kwas arachidonowy (AA).

W moich badaniach wykazałam, że BC w zakresie stężeń fizjologicznych stwierdzanych we krwi ludzkiej, promuje chemotaksję wczesnych komórek progenitorowych śródbłonka. Obserwowanym procesom biologicznym towarzyszy zmiana w ekspresji genów ogrywających rolę w regulacji adhezji komórek i zagnieżdżania, tzw. *homingu*, ale nie aktywuje końcowych markerów różnicowania komórek śródbłonka (J Physiol Pharmacol. 2007). Dodatkowo brak wpływu BC na tubulogenezę w modelu *in vitro* 3D Matrigel potwierdza, że BC nie aktywuje zarówno różnicowania się EPC jak i nie stymuluje proliferacji komórek progenitorowych śródbłonka.

Po potwierdzeniu zmian w ekspresji genów związanych z regulacją pro-angiogennych procesów zarówno w komórkach śródbłonka HUVEC jak i w EPC analizowano jeden z mechanizmów epigenetycznych regulacji ekspresji genów – zmiany poziomu metylacji DNA (Kardiol Pol 2010). W wykonanych badaniach stwierdzono że badane linie komórkowe różnią się poziomem podstawowej metylacji ujawniając tendencję do wyższych wartości w nieodróżnionych komórkach EPC. Obserwowane różnice przemawiają za odmienną, związaną z regulacją w mechanizmie metylacji DNA, ekspresją genu w dojrzałych w stosunku do nieróżnicowanych komórkach śródbłonka. Stwierdzono również, że zmiany w poziomie globalnej metylacji DNA pod wpływem inkubacji z BC były silniej wyrażone w EPC niż w komórkach HUVEC. Jest to zgodne ze stwierdzeniem zmian ekspresji znacznie większej liczby genów po inkubacji z BC i AA w nieodróżnionych komórkach (J Physiol Pharmacol. 2007, Nutr Cancer. 2011). Nie wszystkie przedstawione zmiany osiągnęły poziom istotności statystycznej, co mogło być spowodowane np. dużą zmiennością wyników wynikającą z wpływu czynników środowiskowych na ludzki materiał genetyczny. Należy jednak podkreślić że prezentowane wyniki są jednym z pierwszych badań dotyczących zmian wartości metylacji DNA w komórkach śródbłonka pod wpływem nutrientów. Uzyskane wyniki badań na komórkach śródbłonka sugerują, że spadek globalnej metylacji DNA w zarówno w komórkach HUVEC jak i EPC, po inkubacji z BC i AA, może być odpowiedzialny za regulację wzrostu ekspresji genów, które zmieniają chemotaktyczną aktywność tych komórek (J Physiol Pharmacol. 2007).

Wyniki zmian poziomu ekspresji genów uzyskane z analizy mikromacierzy potwierdzono metodą PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Zidentyfikowano grupę 18 proangiogennych genów, gdzie obydwie metody molekularne niezależnie potwierdziły istotnie statystycznie zmiany ich ekspresji. Dalsze obserwacje nad konsekwencją zmian metylacji wysp CpG obejmowały analizę promotorów tych genów przy użyciu metody COBRA PCR. Umiarkowane wyrażone zmiany metylacji znaleziono w regionach promotorowych 8 genów, takich jak: geny integryny $\beta 3$, CXCR4, koneksyny 43, metaloproteinazy 2 (MMP-2), lamininy, Notch4, KDR czy VCAM1 po inkubacji z BC i / lub AA (J Physiol Pharmacol. 2007, J Physiol Pharmacol. 2009, Nutr Cancer. 2011).

Uzyskane wyniki nie wykazały korelacji między metylacją wysp CpG w rejonie promotora a ekspresją genu *Notch4*, odpowiedzialnym m.in za zachowaniem fenotypu komórki progenitorowej, w dobrze zróżnicowanych komórkach śródbłonka (HUVEC). Możliwym wytłumaczeniem tej

obserwacji jest ograniczenie techniczne metody COBRA PCR umożliwiające analizę jedynie wybranych wysp CpG bez możliwości analizy zmian sąsiednich skupień dwunukleotydowych w rejonie promotorowym, które mogły ulec modyfikacji, jak i innych zmian epigenetycznych. Dodatkowo ostatnie badania potwierdziły kluczową rolę hipometylacji reszt lizynowych w białkach histonów H3 (H3K4) w hamowaniu ekspresji genu *Notch4* w komórkach nowotworowych; wykazując że modyfikacja histonów bez wpływu na strukturę DNA odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji tego genu. W przedstawianych badaniach wykazano, że w komórkach progenitorowych (EPC), obniżenie metylacji promotora było związane z nasileniem ekspresji *Notch4*. Zmiany te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej, co wynikało z dużego rozrzutu wyników, wartość SD (Nutr Cancer. 2011).

Kolejnym badanym genem w komórkach endotelialnych był *KDR*, kodujący receptor dla znanego czynnika pro-angiogenego –VEGF. Zmiany w metylacji promotora genu *KDR* (hipometylacja po preinkubacji HUVEC z BC) przedstawione w niniejszym opracowaniu, były skorelowane z indukowanym przez BC nasileniem ekspresji *KDR*, potwierdzonym metodą qRT-PCR. Ponadto analiza poziomu białka VEGFR metodą hybrydyzacji białek potwierdziły zwiększenie syntezy białka KDR w komórkach HUVEC po inkubacji z BC oraz z AA (J. Physiol. Pharmacol. 2009).

Należy zauważyć, że KDR i Notch4 mają antagonistyczne działanie na proces angiogenezy. Notch4 odgrywa główną rolę w hamowaniu rozgałęziania się naczyń i nie ma znaczącego wpływu na migrację i chemotaksję, które są zależne np. od VEGF. Proces ten jest związany z regulacją poziomu integryny beta -1 w komórkach śródbłonna. Wykazano, że inkubacja z BC komórek śródbłonna powoduje znaczny wzrost w migracji EC, bez wpływu na ich proliferację. Dodatkowo, nie stwierdzono znaczącej aktywacji ekspresji genu integryny beta-1 w analizowanych liniach komórkowych. Tak więc obserwowane skutki biologiczne wydają się być związane tylko z aktywacją zależną od VEGF i nie mieć związku z procesami zależnymi od szlaku Notch4. Uzyskane dane sugerują, że nawet małe zmiany poziomu metylacji promotora *KDR* indukowane przez AA we współpracy z BC, mogą prowadzić do zmian w ekspresji genu KDR w komórkach śródbłonna, co jest ważne zarówno dla chemotaksji i różnicowania komórek oraz procesu angiogenezy (J. Physiol. Pharmacol. 2009).

W przedstawionych badaniach stwierdzono, nasilenie ekspresji genu koneksyny 43 indukowane przez BC, jak również niewielki wzrost metylacji jego promotora w komórkach EPC, które nie występowały w HUVEC (Genes Nutr. 2012). W przedstawionych obserwacjach stwierdzono że hipermetylacja badanego regionu promotora *Cx43* była związana ze znaczącą aktywacją ekspresji tego genu w EPC (Nutr Cancer. 2011, Genes Nutr. 2012). Możliwym wytłumaczeniem tego zjawiska może być występowanie bardziej skomplikowanej epigenetycznej regulacji ekspresji genu *Cx43*, która

obejmuje nie tylko modyfikację DNA, ale również histonów i innych elementów epigenetycznych, np. procesu biosyntezy mikroRNA (miRNA).

Uzyskane wyniki sugerują podobieństwo epigenetycznej regulacji ekspresji genów niezróżnicowanych komórek EPC i komórek nowotworowych. W przeprowadzonych badaniach przedstawiono wstępne dowody, że zmiany w ekspresji genów związanych z angiogenezą w komórkach śródbłonka, mogą być zależne od mechanizmów epigenetycznych, w szczególności od zmian metylacji promotora genów związanych z tym procesem. Może to wyjaśnić, przynajmniej w części, niektóre z postulowanych działań BC i AA na ryzyko kancerogenezy. Potrzeba dalszych dowodów z badań podstawowych i klinicznych, aby potwierdzić tą hipotezę.

Coraz większym zainteresowaniem cieszy się poszukiwanie mechanizmów, które pozwolą na wyjaśnienie, na poziomie komórkowym, patomechanizmu występowania objawów zespołu metabolicznego związanego z zależnym od angiogenezy rozrostem tkanki tłuszczowej, zwłaszcza brzusznej. Wykazano, że komplikacje w postaci insulinooporności, zaburzenia metabolizmu oraz powikłań sercowo-naczyniowych, są wynikiem nie tylko przeciążenia metabolicznego mitochondriów, tzw „*glucolipotoxicity*”, czy apoptozą komórek, ale również aktywacji komórkowych mechanizmów ochronnych, takich jak stres siateczki endoplazmatycznej, uszkodzenie funkcji mitochondriów czy indukcji autofagii.

W zaprezentowanym badaniu (w modelu *in vitro*) obserwowano spadek wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondriów ($\Delta\psi$) indukowanego przez $\text{TNF}\alpha$ oraz nietoksyczne, fizjologiczne stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) jak kwas palmitynowy czy olejowy. Stwierdzone zmiany są zgodne z uprzednimi raportami opisującymi WKT i $\text{TNF}\alpha$ jako silne stresory komórkowe. Omawiane wyniki wskazały na specyficzne efekty obserwowanych kwasów tłuszczowych, bowiem jedynie kwasy wielonienasycone (EPA) w tych samych warunkach zwiększały wartość $\Delta\psi$ i łagodziły negatywny wpływ $\text{TNF}\alpha$ na funkcję mitochondriów w EC (Genes Nutr. 2012). Stwierdzone u ludzi korzystne zwiększenie wartości potencjału błonowego w mitochondriach ($\Delta\psi$) wydaje się potwierdzać ochronne działanie wielonienasyconych WKT (EPA) na funkcję śródbłonka. W modelu *in vitro* obserwowano zwiększoną mitochondrialną produkcję ATP tylko w obecności EPA, ale nie AA, co może być jednym z mechanizmów korzystnego wpływu EPA na metabolizm komórek śródbłonka (Genes Nutr. 2012). Równocześnie wykazano protekcyjny wpływ translokacji/wzrostu poziomu ekspresji *Cx43* w mitochondriach na wartość potencjału błony mitochondrialnej. Wspomniane już wcześniej wyniki naszych badań wykazały, że zmiany metylacji wysp CpG promotora genu *Cx43* mogą przyczyniać się do wyjaśnienia regulacji jego ekspresji w komórkach HUVEC (Nutr Cancer. 2011, Genes Nutr. 2012). Zmiany stężenia białka *Cx43* w komórkach HUVEC wydają się być ściśle związane z rodzajem WKT działających na te komórki, ponieważ tylko nasycony PA istotnie zwiększał zawartości białka *Cx43* w mitochondriach (Genes Nutr. 2012). Ciekawą obserwacją było

narastanie poziomu Cx43 równoległe do znacznego wzrostu wartości $\Delta\psi$ błony mitochondrialnej, indukowane przez AA i EPA (Genes Nutr. 2012). Zwiększona ekspresja Cx43 wydaje się odpowiadać za poprawę międzykomórkowego transportu i normalizację funkcji mitochondriów. Należy zauważyć, że korzystny wpływ EPA wydaje się być nieobecny w warunkach stresu komórkowego (np. inkubacja z $\text{TNF}\alpha$) (Genes Nutr. 2012).

Wyniki przedstawianej pracy mogą umożliwić stworzenie nowego obszaru badań z dziedziny nutrigenomiki - epigenetycznej modyfikacji DNA przez składniki diety w neonatologii, kancerogenezie, w chorobach metabolicznych. Mogą one prowadzić do wczesnego wykrywania w przesiewowych testach diagnostycznych zagrożenia aktywacji genów odpowiedzialnych za angiogenezę w procesie powstawania powikłań cukrzycy, miażdżycy lub progresji zmian nowotworowych. Umożliwiłoby to wczesną ocenę ryzyka progresji choroby u pacjenta.

Wnioski

Badania *in vitro* przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Kwasy tłuszczowe (OA, PA, AA EPA) oraz BC w stężeniach fizjologicznych nie wpływają na różnicowanie, proliferację oraz tubulogenezę komórek progenitorowych (EPC) jak i zróżnicowanych komórkach śródbłonna (HUVEC). Badane nutrieny istotnie stymulowały natomiast chemotaksję komórek obydwu linii, co może sprzyjać angiogenezie *in vivo* (udowodniły to publikacje innych badaczy ogłoszone ostatnio).
2. W fizjologicznych stężeniach BC oraz AA regulują ekspresję genów kodujących białka kontrolujące główne etapy procesu angiogenezy – przede wszystkim migrację komórek i ich zasiedlanie (chemotaksja IL-8 czy KDR, homing CXCL12/SDF1, połączenie międzykomórkowe Cx43).
3. Istnieje podobieństwo epigenetycznej regulacji ekspresji genów niezróżnicowanych komórek EPC i komórek nowotworowych. Zmiany ekspresji genów związanych z angiogenezą w komórkach śródbłonna mogą być zależne od mechanizmów epigenetycznych, w szczególności zmian metylacji promotorów odpowiednich genów.
4. W warunkach stresu metabolicznego indukowanego inkubacją z TNF α oraz z kwasami palmitynowym i olejowym w fizjologicznych, nietoksycznych stężeniach powoduje spadek wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondriów ($\Delta\psi$) rzutujący na proces generacji ATP.
5. Zmiany stężenia białka Cx43 w komórkach HUVEC wydają się zależeć od rodzaju WKT. Inkubacja komórek śródbłonna z kwasami AA i EPA indukowała narastanie poziomu Cx43 równoległe ze znacznym wzrostem wartości $\Delta\psi$ błony mitochondrialnej. Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost wartości $\Delta\psi$ i zmiany poziomu Cx43 w HUVECs, po ich inkubacji z wybranymi wielonasyconymi WKT, promuje tzw. „hartowanie komórek”.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (~~artystycznych~~).

Przeprowadzone przeze mnie badania naukowe dotyczą patomechanizmu chorób wynikających z przeciążenia organizmu substratami energetycznymi jak i składnikami diety (nutrientami), a więc biologii molekularnej zjawisk leżących u podstaw chorób społecznych takich jak otyłość, cukrzyca, miażdżyca, choroby nowotworowe. Obejmują szeroko pojętą problematykę molekularnych mechanizmów regulujących m.in. procesy wewnątrzkomórkowe jak: równowaga energetyczna, funkcja mitochondriów, apoptoza czy autofagia, różnicowanie się komórek (preadipocytów) jak i proces angiogenezy, ważne dla przebudowy tkanki tłuszczowej.

Najnowszymi metodami biologii molekularnej (sekwencjonowanie genów, mikromacierze oligonukleotydowe używane do badań mutacji/polimorfizmu genów), badałam molekularne i genetyczne uwarunkowania zespołu metabolicznego, schorzeń kardiologicznych (jak choroba nadciśnieniowa, przerost mięśnia lewej komory, kardiomiopatia przerostowa czy *pseudoxanthoma elasticum*). W ostatnich latach wykonuję badania genetyczne monogenowych form cukrzycy oraz w ramach dwu projektów UE FW7 LIPIDOMIC-NET Nr202272, oraz BIOCLAIMS Nr. 244995 biorę udział w poszukiwaniach nowych biochemicznych/molekularnych markerów chorób indukowanych poszczególnymi frakcjami lipidów (np. przez sfingomieliny, ceramidy, gangliozydy, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe) gromadzących się w kroplach lipidowych i indukujących odczyn zapalno-immunologiczny w przebiegu chorób metabolicznych ze szczególnym uwzględnieniem patogenezy cukrzycy i jej powikłań.

Już w czasie studiów aktywnie współpracowałam z Katedrą Biochemii Klinicznej UJ CM uczestnicząc w analizie genetycznego podłoża otyłości, zespołu metabolicznego oraz kardiologicznego zespołu X. Moje zainteresowania biologią molekularną miało wpływ na temat mojej pracy doktorskiej w ramach której badałam genetyczne uwarunkowanie rozwoju przerostu mięśnia lewej komory serca w przebiegu pierwotnego nadciśnienia tętniczego. W 2002 roku w ramach 4 letnich studiów doktoranckich na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego w Katedrze Kardiologii UJCM, obroniłam z wyróżnieniem dysertację doktorską. Tytuł doktora nauk medycznych otrzymałam decyzją Rady Wydziału UJ CM 20 stycznia 2006 roku.

Uczestniczyłam w wykonaniu szeregu projektów UE FW5/6/7 Wydziału Lekarskiego UJ CM, takich jak:

1. **COST-918** – Mutation of beta 3 adrenergic receptor, UCP-1, PPAR-gamma as the risk factor for obesity and cardiovascular disorders MoU: 233/98
2. 5th Framework Programme Dietary Lipids as Risk Factors in Development. Mechanistic Issues **DLARFID** QLRT-CT-2001- 2005 00183
3. FP6-2002-2008-**FOOD 506360 NuGO** “European Nutrigenomics Organisation - Linking genomics, nutrition and health research” projekt sieć doskonałości
4. FP6-2002- 2009- **FOOD -505944 LIPGENE** “Diet genomics, and metabolic syndrome: and integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis“ projekt zintegrowany
5. FP-6-2002-**LIFESCIHEALTH-502988 SCCR** :Application and processes optimization of human stem cells for myocardium repair. Projekt UE STREP
6. **Polish Norwegian Research Grant** 2008-2010/2011: The Protective Mechanisms Against Neurodegeneration
7. FP-7 2008- w trakcie realizacji **LIPIDOMIC-NET** Lipid droplets and lamellar bodies as dynamic organelles. Translation research towards human disease
8. FP7 2009-w trakcie realizacji **BIOCLAIMS**: BIOMarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food

Projekty KBN/MNiI (Ostatnie 10 lat):

1. Badanie mechanizmów patologicznej angiogenezy w zespole metabolicznym u ludzi na modelu transgenicznych myszy. PBZ-Min-005/P04/2002 (współwykonawca)
2. Mutacje związanych z otyłością i insulinoopornością genów, czynników ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca w wyselekcjonowanej grupie rodzin Polski Południowej." 4P05D 01016,; zakończony w 2002 (współwykonawca)
3. Rola czynników aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR γ) w angiogenezie - ocena wpływu ligandów PPAR γ na rozwój retinopatii proliferacyjnej." 4P05A10817, zakończony w 2002
4. SPUB 156/E-390/SPB/COST/P-05/DWM 88/2004-2006 (współwykonawca)
5. Polska sieć doskonałości „Centrum badań komórek macierzystych – CBKM” Nr 156/E – 390/SP./MSN/P-05/DWM 565/2003-2005–(współwykonawca)
6. Wpływ aktywatorów PPAR γ na ekspresję adiponektyny i jej receptorów w procesie dojrzewania preadipocytów i komórek śródbłonna naczyń., zakończony w 2006 (współwykonawca)

Dorobek naukowy.

Mój dorobek naukowy stanowią 57 prac oryginalnych oraz 25 prac poglądowych, o łącznym **IF** wynoszącym **147,368** (1132,5 punktów KBN/MNiSW). Jestem pierwszym autorem w 9 pracach oryginalnych (bez prac oryginalnych wymienionych w paragrafie Nr 4) i w 6 poglądowych.

Jestem autorem i współautorem 17 rozdziałów w podręcznikach dla lekarzy i studentów z dziedziny biochemii klinicznej i diagnostyki, nadciśnienia tętniczego i kardiologii czy schorzeń metabolicznych. Ponadto mój dorobek uzupełnia 290 doniesień zjazdowych, w tym ponad 160 na konferencjach międzynarodowych takich towarzystw naukowych jak European Atherosclerosis Society, European Society for Clinical Investigation, International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, European Association for the Study of Diabetes, International Association for the Study of Obesity i innych.

Przed uzyskaniem **stopnia doktora nauk medycznych** byłam autorem i współautorem publikacji dotyczących molekularnych procesów regulacji angiogenezy jako czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, oraz podłoża genetycznego i biochemicznego chorób metabolicznych i kardiologicznych takich jak nadciśnienie tętnicze, kardiologiczny zespół X, choroba Tangierska, czy otyłość (łączy IF= 13,453).

W okresie **po doktoracie** (łączy IF=133,915) główny kierunek badań naukowych dotyczył molekularnych procesów regulacji angiogenezy jako czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, oraz podłoża genetycznego i biochemicznego chorób metabolicznych i obejmowały szereg tematów badawczych nad genetycznym uwarunkowaniem nadciśnienia tętniczego oraz przerostu mięśnia lewej komory serca w przebiegu nadciśnienia.

W tym cyklu prac zwracają uwagę prace dotyczące tzw. „kardiologicznego zespołu X”- objawów zwanych obecnie „kardiodiabetesy” – wykazujący niedomogę naczyń wieńcowych w przebiegu wczesnych objawów insulinooporności, co można wcześniej zdiagnozować wykonaniem doustnego testu tolerancji glukozy jak i lipidów (lipemii poposiłkowej).

Osobnym tematem były badania dotyczące mechanizmów patologicznej angiogenezy w zespole metabolicznym u ludzi, jaki na modelu zwierząt transgenicznych. Projekt prowadzono w Katedrze Biochemii Klinicznej we współpracy z Katedrą Patomorfologii UJ CM (Pan Prof. Jerzy Stachura). Wychodząc z założenia, że angiogeneza towarzyszy nie tylko rozwojowi płodu, ale i przebudowie narządów w tym i tkanki tłuszczowej, jak i towarzyszy różnego rodzaju procesom zapalnym łącznie z blaszka miażdżycową, wiele prac poświęcono temu zjawisku. Proces ten badano w hodowlach komórek śródbłonna naczyń, komórkach progenitorowych krwi pępowinowej, jak i komórkach progenitorowych tkanki tłuszczowej (tzw. *stromal vascular fraction*), jak i na modelach zwierząt transgenicznych imitujących ludzki zespół metaboliczny. Jednoznacznie udowodniono w nich związek upośledzonej angiogenezy z remodelingiem tkanki tłuszczowej i zmianom w insulinowrażliwości związanej ze zmianami poziomu wolnych kwasów tłuszczowych we krwi, poziomem adipokin.

Podgrupę tych badań stanowią prace dotyczące wplywu pewnych składników diety - tzw. nutrientów na różne etapy angiogenezy. Badania te były prowadzone w Katedrze Biochemii Klinicznej UJ CM w ramach koordynowanego projektu FW 5 UE DLARFID i kontynuowane w ramach projektu badawczego UE FW 6 NUGO. Wykazano w nich modulujący wpływ beta-karotenu na metabolizm i angiogenezę (działanie antyapoptotyczne, stymulacja chemotaksji i „tubulogenezy”- formowanie prymitywnych kapilar) przez beta-karoten, prekursor kwasu retinowego (witA) niezbędnego dla aktywacji czynnika transkrypcyjnego RXR-partnera PPARs.

Kolejnym polem badań było poszukiwanie mutacji genów związanych z otyłością i insulinoopornością, jako czynników ryzyka wystąpienia cukrzycy. Badania były realizowane we współpracy z Katedrą Biochemii Klinicznej (kierowanej przez Prof. Jerzego Naskalskiego) z zespołem Kliniki Chorób Metabolicznych (kierowanej przez Prof. Jacka Sieradzkiego). Były to pierwsze w Polsce badania nad częstością występowania typowych dla polimorfizmów genów białek będących czynnikami ryzyka wystąpienia otyłości dyslipidemii, cytokin/adipokin odczynu zapalnego, enzymów przemian lipidów i węglowodanów, insulinooporności, a w konsekwencji nadciśnienia i miażdżycy. Oprócz częstości i nowych polimorfizmów (SNPów), wykazano w nich oryginalnie charakterystyczny dla przebadanej populacji osób z Polski południowej związek polimorfizmu receptora dopaminergicznego D2 (odpowiadającego za zjawisko uzależnień) z apetytem i otyłością. Stosując bardziej bioinformatyczne metody interpretacji wyników badań genotypu z odpowiedzią metaboliczną na test obciążenia posiłkiem lipidowym lub węglowodanowym (*postprandial lipaemia, postprandial*

glycaemia) udało się wykazać związek pewnego układu (występowania) grup polimorfizmów z „wrażliwością”- podatnością na patologiczną postać przemian lipidów czy węglowodanów, mogących prowadzić do rozwoju cukrzycy, czy choroby niedokrwiennej serca. Badania te nadal kontynuowane a pionierskie dla rozwijającej się gałęzi wiedzy- *nutrigenomiki* wydają się mieć wartość predykcyjną w prewencji miażdżycy gdyż określać mogą indywidualny typ diety korzystny dla indywidualnego genomu (*personalised nutrition*).

Podgrupę w tych obserwacji stanowi cykl poświęcony badaniom, związku podłoża genetycznego – polimorfizmów genów o wykazanym w piśmiennictwie związku z genezą biochemicznych i klinicznych objawów zespołu metabolicznego (prediabetes) z markerami poposiłkowego stresu oksydacyjnego, i proaterogennej modyfikacji lipoprotein. Wykazano w nich, że w okresie poposiłkowego stresu oksydacyjnego wprawdzie znamienne wzrasta poziom albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (IMA –*ischemia modified albumin*) i proaterogenne frakcje lipoprotein we krwi, ale te zmiany nie korelują specyficznie z poszczególnymi polimorfizmami badanymi metodami biologii molekularnej o wysokiej przepustowości (mikromacierze) - projekt UE LIPGENE. Natomiast wykazano udział grup alleli wybranych genów szlaków przemian metabolicznych z badanymi zmianami markerów stresu oksydacyjnego. Potwierdza to wielogenowe podłoże poposiłkowego stresu oksydacyjnego i wyklucza preferowany w komercji paro-genowy „chip” mający określać fenotyp pacjenta jako wskazówkę do przygotowania diety zindywidualizowanej w prewencji powikłań zespołu metabolicznego.

Cykl prac z dziedziny *nutrigenomiki*- dotyczący wpływu rodzaju diety na biochemiczne i antropomorficzne zmiany objawów zespołu metabolicznego u pacjentów o ustalonym polimorfizmie genów charakteryzujących zespół metaboliczny. Cykl tych prac powstał podczas realizacji IP FW7 LIPGENE i został opublikowany w wysoko-impaktowanych czasopismach z dziedziny chorób metabolicznych i *nutrigenomiki*. W tym wielośrodkowym badaniu prowadzonym w różnych krajach Europy prześlędzono efekt trzymiesięcznego stosowania czterech rodzajów izokalorycznej diety (wysokotłuszczowa (nasycone WKT); wysokotłuszczowa (+ mononienasycone kwasy tłuszczowe, MUFA); wysokowęglowodanowa; oraz wysokowęglowodanowa + n-3 EPA/DHA: 1.8g/24h u pacjentów z zespołem metabolicznym o przebadanym genotypie (polimorfizmy genów o potwierdzonym wpływie na etiopatogenezę zespołu metabolicznego opisane w piśmiennictwie do 2008 roku). Był to projekt przeprowadzony z bardzo dużą dbałością o standaryzację i centralizację badań genetycznych, biochemicznych oraz nadzoru dietetycznego. Brały w nim udział znane ośrodki badań *nutrigenomicznych* z Danii, Holandii, Norwegii, Francji, Szwecji, Anglii, Finlandii, Włoch, Hiszpanii i Polski. W badaniach tych wykazano, że zastosowana interwencja dietetyczna nie zmienia w całej grupie pacjentów typowych objawów zespołu metabolicznego (markerów insulinooporności,

odczynu immunologiczno-zapalnego) badanych na czczo oraz przy zastosowaniu testów funkcjonalnych (OGTT, OLTT).

Badania ostatniego okresu dotyczą roli organelli komórkowych (stresu siateczki endoplazmatycznej depolaryzacji błony mitochondriów, na proces różnicowania progenitorowych komórek tkanki tłuszczowej (preadipocytów) do adipocytów w ramach realizacji projektu FW7 UE LIPIDOMIC-NET. Projekt rozpoczęty w Katedrze Biochemii Klinicznej w ramach międzynarodowego projektu FW7 Unii Europejskiej – LipGENE. Są to najnowsze badania łączące nowy typ badań typu „omiks” – transkryptomikę, lipidomikę, metabolomikę i opracowywanie metodami bioinformatycznymi w celu poznania szlaków zaangażowanych w procesy spaczonych przemian komórkowych w przypadku obciążenia komórki nadmiarem substratów (glukolipotoksyczność).

Nagrody i wyróżnienia.

Trzykrotnie, jeszcze jako studentka Wydziału Lekarskiego UJ CM, w okresie 1998-2000 roku zostałam laureatką Roczego Stypendium Naukowego Przyznawanego przez Ministerstwo Zdrowia.

W 2000 rok otrzymałam wyróżnienie prezentowanej pracy na IX Zjeździe Studentów Medycyny w Krakowie.

W 2003 rok uzyskałam 3- miesięczne stypendium naukowe „Maria Curie Fellowship”, które umożliwiło mi wyjazd szkoleniowo-naukowy do Danii.

Zarówno w roku 2005 jak i w 2006 w ramach stypendium naukowo-badawczego sponsorowanego przez Unię Europejską (NUGO Exchange Grant) realizowałam projekt badawczy na Uniwersytecie w Newcastle, Anglia.

W latach 2008 i 2011 dzięki stypendium naukowo-badawczego (LipidomicNET Exchange Grant) odbyłam wyjazdy szkoleniowe, poszerzające moje umiejętności z zakresu biologii molekularnej.

Ponadto jestem laureatką „Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia naukowe” uzyskane w 2005 roku gdzie otrzymałam naukową nagrodę zespołową.

W 2011 roku zostałam ponownie wyróżniona naukową nagrodą zespołową „Nagroda Ministra Zdrowia dla Nauczycieli Akademickich” za cykl 10 publikacji będących wynikiem realizacji projektu międzynarodowego Lipgene Diet, Genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis dietary fat modification, genotype and the metabolic syndrome (FP6 FOOD-CT-2003-505944)

Byłam głównym pomysłodawcą oraz autorem i koordynatorem projektu badawczego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych **Metylacja DNA jako mechanizm regulacji ekspresji genów komórek endotelialnych w angiogennej aktywności beta-karotenu i wybranych kwasów tłuszczowych (N401 008 31/0143)**, gdzie badałam epigenetyczne mechanizmy regulacji zmian ekspresji genów, związanych z angiogenezą, pod wpływem działania różnych czynników pokarmowych (beta karoten, wolne kwasy tłuszczowe).

Byłam również odpowiedzialna za zaplanowanie, optymalizację i przeprowadzenie badań oraz doświadczeń wykonywanych w ramach realizacji międzynarodowego projektu FP-7 2008-**LIPIDOMIC-NET** Lipid droplets and lamellar bodies as dynamic organelles. Translation research towards human disease.

Inne rodzaje aktywności naukowej.

Jestem recenzentem pism naukowych z zakresu nauko podstawowych i kardiologii: „Journal of Physiology and Pharmacology”, „Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”, „Kardiologia Polska”, a także „Przegląd Lekarski”, „Diabetologia Kliniczna”.

Kraków, dnia 19.07.2012

.....
Podpis kandydata

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie