**AUTORETERAT**

**Dr n. biol. Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**

Katedra Biochemii Lekarskiej

Wydział Lekarski

Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kraków, marzec 2019

1. **Imię i Nazwisko.**

Dorota Ciołczyk-Wierzbicka

 Urodziłam się w Krakowie, z którym to miastem związane jest moje życie zawodowe.

 Moje zainteresowania naukami przyrodniczymi rozpoczęły się jeszcze w szkole podstawowej byłam laureatką - zajęłam I miejsce w Olimpiadzie Biologicznej. Następnie ukończyłam z wyróżnieniem V Licem Ogólnokształcące im. Augusta Witkowskiego w Krakowie klasę o profilu matematyczno-fizycznym i rozpoczęłam studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Od drugiego roku studiów podjęłam również dodatkową specjalizację w zakresie chemii biologicznej między innym zajęcia z zakresu: biochemii, biofizyki, chemii leków, toksykologii, biologii komórki – kurs podstawowy, biologii komórki nowotworowej, genetyki i farmakologii.

 Pracę magisterską wykonywałam pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. med. Aldony Dembińskiej-Kieć w Katedrze Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii i otrzymaniu specjalności z zakresu: Chemia Biologiczna, podjęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, z którym to miejscem związana jest moja praca zawodowa.

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

**Magister chemii -** tytuł uzyskany w roku 1997 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Tytuł pracy magisterskiej: „Wyznaczanie fenotypów Apolipoproteiny E metodą immunoblottingu.”

Promotor: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska–Kieć – Katedra Biochemii Klinicznej Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Recenzent: Prof. dr hab. Patrycja Dynarowicz – Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**Specjalność z zakresu Chemia Biologiczna -** uzyskana w 1997 roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,

**Doktor nauk biologicznych** – stopień uzyskany w roku 2003 na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Glikozylacja N-kadheryny w liniach komórkowych czerniaka”.

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Laidler – Katedra Biochemii Lekarskiej Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Recenzent: Prof. dr hab. Anna Lityńska - Instytut Zoologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Recenzent: Prof. dr hab. Maciej Ugorski – Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

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

**1997 - 1998** – stanowisko asystenta stażysty w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie,

**1998 - 2005** – stanowisko asystenta w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie,

**2005** - do chwili obecnej stanowisko adiunkta w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

1. **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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**
2. **tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

„Rola N-kadheryny w procesach związanych z inwazją nowotworową, hamowanie szlaków sygnalizacyjnych z udziałem siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych w komórkach czerniaka, w celu poszukiwania potencjalnych miejsc dla terapii celowanej”.

**b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),**

1. **Dorota Ciolczyk-Wierzbicka**, Dorota Gil, Piotr Laidler.

The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. Curr. Med. Chem. 2012: Vol. 19, nr 1, s. 145-151,

Impact Factor ISI: 4.070, MNiSW: 40.000

1. **Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Piotr Laidler.

The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down.

Med. Oncol. 2018 : Vol. 35, nr 1 art. no. 42, s. 1-9,

Impact Factor ISI: 2.920, MNiSW: 20.000

1. **Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Dorota Gil, Piotr Laidler.

Treatment of melanoma with selected inhibitors of signaling kinases effectively reduces proliferation and induces expression of cell cycle inhibitors. Med. Oncol. 2018: Vol. 35, nr 1 art. no. 7, s. 1-9,

Impact Factor ISI: 2.920, MNiSW: 20.000

Sumaryczny Impact Factor prac wchodzących w skład osiągniecia naukowego: **9.91**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **80.000**

Kopie powyższych prac - *załącznik nr 7*

Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim - *załącznik nr 5*

1. **omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

 Badania będące podstawą prezentowanego osiągniecia naukowego, które stanowią mój indywidulany wkład w rozwój nauki, dotyczą hamowania inwazji komórek czerniaka poprzez stosowanie kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych oraz ich potencjalnego wykorzystania w terapii celowanej czerniaka ludzkiego.

 Czerniak (łac. *melanoma malignum*), to jeden z najbardziej złośliwych, heterogennych i odpornych na terapię typów nowotworu, powstały w wyniku transformacji nowotworowej komórek barwnikowych – melanocytów [Skowronek et al. 1998].

 Od kilkudziesięciu lat na świecie obserwuje się dynamiczny wzrost zachorowalności na czerniaka, dotyczy to szczególnie osób w wieku pomiędzy 30 a 50 rokiem życia.  Zachorowalność na czerniaka wzrasta średnio o 5% rocznie, a co 10 lat liczba nowych przypadków ulega podwojeniu [Krajowy Rejestr Nowotworów]. Wzrost przypadków czerniaka dotyczy przede wszystkim rasy białej, a z największą częstotliwością występuje wśród osób rasy kaukaskiej - szczególnie narażonych na promieniowanie słoneczne [Skowronek et al. 1998]. Rocznie na świecie notuje się ponad 100 000 zachorowań, przy czym najwyższą zachorowalność notuje się w Australii i Nowej Zelandii, w bogatych krajach europejskich (Szwajcaria, Norwegia, Szwecja) oraz w Stanach Zjednoczonych [Krajowy Rejestr Nowotworów].

 Leczenie tego nowotworu powoduje wiele problemów, ze względu na fakt, iż czerniak jest chorobą heterogenną, odporną na standardową chemioterapię, a tylko niektóre podgrupy pacjentów reagują na terapie ogólnoustrojowe [Schadendorf et al. 2015].

 W wyniku transformacji nowotworowej zaburzeniu ulegają szlaki przekazywania sygnału komórkowego, w których uczestniczą kinazy białkowe szlaków: PI3K/AKT, MAPK (B-RAF, MEK, ERK), mTOR oraz β-katenina, co wpływa na procesy życiowe komórki i odgrywa istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej [Yang et al. 2017, Li et al. 2018]. Nasila się bowiem proliferacja, komórki nabierają cech inwazyjnych i zdolności do migracji, a hamowaniu ulega proces apoptozy [Pfeffer et al. 2018].

 W oparciu o badania The Cancer Genome Atlas Research Network [2015] powstała klasyfikacja wraz z protokołem postępowania dla terapii celowanej czerniaka skóry. Wyróżniono cztery podtypy czerniaka na podstawie mutacji w genach BRAF, RAS, NF1 i Triple Wild Type, dla których to podtypów stosuje się odpowiednie kombinacje inhibitorów szlaków sygnalizacyjnych: B-RAF, MEK/ERK, PI3K/AKT oraz mTOR [Webeer et al. 2017, Conciatori et al. 2018].

 Badania nad skutecznym modelem terapii tego nowotworu są ciągle prowadzone. Obiecujący wydaje się rozwój terapii celowanej skierowanej bezpośrednio przeciw onkogenom lub skupionej na hamowaniu aktywowanych w wyniku transformacji nowotworowej szlaków sygnalizacyjnych [Conciatori et al. 2018, Sathe et al. 2018]. Poszukiwanie efektywnej strategii terapeutycznej dla czerniaka skupia się na identyfikacji nowych potencjalnych miejsc do terapii celowanej.

 **Celem moich badań było zarówno zrozumienie mechanizmu funkcjonowania szlaku sygnalizacyjnego na osi N-kadheryna - kinazy białkowe - β-katenina, jak i ocena potencjalnych możliwości w zmniejszeniu potencjału inwazyjnego komórek czerniaka poprzez zastosowanie siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych.**

 Na początku moich badań, był to temat całkiem nowy, pierwsze doniesienia o roli N-kadheryny w procesie nowotworowym zaczęły się dopiero pojawiać w literaturze. Zachęcona tematem podjęłam prace nad interferencyjnym RNA (RNAi), potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genu N-kadheryny. We współpracy z Prof. dr hab. Elizą Wyszko i Prof. dr hab. Janem Barciszewskim z Instytutu Chemii Bionieorganicznej PAN w Poznaniu, zaprojektowano kilkanaście potencjalnych sekwencji siRNA dla genu N-kadheryny, z których przebadałam 9 sekwencji i wybrałam jedną, której efektywność działania była wyższa od komercyjnych sekwencji firmy Ambion,

 Prezentowany cykl prac dotyczy roli N-kadheryny w przebiegu procesu nowotworowego, jej wpływu na proces proliferacji, regulację cyklu komórkowego, szlaki przekazywania sygnału komórkowego oraz procesy związane z inwazyjnością komórkową. Zajmuje się tematyką hamowania aktywności procesu nowotworowego w komórkach czerniaka przy zastosowaniu kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych.

1. **Dorota Ciolczyk-Wierzbicka**, Dorota Gil, Piotr Laidler.

The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. Curr. Med. Chem. 2012: Vol. 19, nr 1, s. 145-151,

Impact Factor ISI: 4.070, MNiSW: 40.000

 Pierwsza z prezentowanych prac dotyczy roli N-kadheryny w procesach związanych z proliferacją, cyklem komórkowym oraz jej wpływem na szlaki przekazywania sygnału: PI3K/AKT, ERK kinazy i β-kateniny w komórkach czerniaka ludzkiego.

 Badania prowadzono na czterech liniach komórkowych czerniaka: pierwotnych o wertykalnej fazie wzrostu WM793 i WM115 oraz pochodzących z przerzutu do płuc (u myszy) Lu1205 i skóry (u ludzi) WM266-4. Badanie proliferacji komórek czerniaka przeprowadzono na poziomie syntezy DNA, za pomocą testu inkorporacji BrdU jak i podziałów komórkowych - test barwienia fioletem krystalicznym. Ekspresję białek sygnalizacyjnych szlaków: PI3K/AKT, MEK/ERK, β-kateniny oraz cyklu komórkowego, przeprowadzono za pomocą techniki western blot z wykorzystaniem wolnych i ufosforylowanych form przeciwciał. Wyciszanie genu N-kadheryny przeprowadzono za pomocą sekwencji siRNA otrzymanej w procesie transkrypcji *in vitro,* w oparciu o wybraną i przetestowaną sekwencję targetową (siRNACDH#1) oraz z wykorzystaniem komercyjnej sekwencji siRNA dla genu N-kadheryny (siRNACDH#2) i niespecyficznej kontrolnej sekwencji siRNA firmy Ambion. Efektywność wyciszania genu N-kadheryny sprawdzono na poziomie mRNA i białka, a wyniki poddano obróbce densytometrycznej. Stosowane stężenia siRNA dla N-kadheryny oraz inhibitory kinaz białkowych: (1) PI3K kinazy — LY294002 (20 μM), (2) ERK1/2 kinazy — U0126 (10 μM) nie wykazywały efektu cytotoksyczności zarówno pojedynczo jak i w stosowanych kombinacjach.

 Uzyskane wyniki potwierdzają że wyciszanie genu N-kadheryny:

1. W sposób efektywny, na poziomie powyżej 90% obniża ekspresję N-kadheryny w komórkach czerniaka.
2. Wpływa na regulację szlaków sygnalizacyjnych PI3K/AKT, ERK kinazy oraz β-kateniny, poprzez hamowanie ekspresji ufosforylowanych form białek: pAKT (S473), pERK1/2 (T202 / Y204) w komórkach czerniaka.
3. Wpływa na regulację cyklu komórkowego w komórkach czerniaka, hamując ekspresję: cykliny D1 i D3 oraz kinaz zależnych od cykliny 4 i 6 (CDK4, CDK6) przy jednoczesnym wzroście ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego: p21, p27, p15 i p16.
4. W sposób statystycznie istotny (na poziomie 0.001-0.00001) zmniejsza o 50-70% proliferację komórek czerniaka zarówno na poziomie syntezy DNA jak i podziałów komórkowych.

 Uzyskane wyniki wskazują, że N-kadheryna uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego w fazie G1 oraz w szlakach przekazywania sygnału komórkowego PI3K/AKT, MEK/ERK kinazy i β-kateniny. Ekspresja N-kadheryny znacząco przyczynia się do zwiększenia potencjału inwazyjnego komórek czerniaka. Natomiast wyciszanie genu N-kadheryny hamuje wzrost komórek w fazie G1 i wejście w fazę S, co ma ogromne znaczenie ze względu na możliwe przyszłe zastosowanie w leczeniu tego nowotworu.

2. **Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Piotr Laidler.

The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down.

Med. Oncol. 2018 : Vol. 35, nr 1 art. no. 42, s. 1-9,

Impact Factor ISI: 2.920, MNiSW: 20.000

 Druga z prezentowanych prac, stanowi kontynuację badań. Dotyczy roli N-kadheryny w procesach związanych z migracją i inwazją komórkową oraz aktywnością metaloproteinazy: MMP-2 i MMP-9 w komórkach czerniaka ludzkiego.

 Migracja i inwazja komórkowa jest kluczowym czynnikiem wpływającym na progresję nowotworową. N-kadheryna odgrywa zasadniczą rolę w procesie inwazji komórkowej raka piersi, prostaty, żołądka, jelita grubego i czerniaka [Hazan et al. 2004, Hulit et al. 2007, Wang et al. 2016].

 W prezentowanej pracy do badań wykorzystano cztery linie komórkowe czerniaka: pierwotne o wertykalnej fazie wzrostu WM793 i WM115 oraz pochodzące z przerzutu do płuc (u myszy) Lu1205 i skóry (u ludzi) WM266-4.

 Badanie inwazyjności komórek czerniaka *in vitro* (jako zdolność migracji komórek przez matriżel w komorze Boydena) prowadzono w oparciu o test BD BioCoat™ FluoroBlok Invasion System - natomiast określenie aktywności metaloproteinazy: 2 i 9 przeprowadzano w oparciu o technikę zymogram. Z kolei ekspresję metalloproteinaz na poziomie białka wyznaczono w oparciu o technikę western blot. Uzyskane dane poddawano obróbce densytometrycznej. Wspominane wcześniej wyciszanie genu N-kadheryny przeprowadzono za pomocą sekwencji siRNA otrzymanej w wyniku transkrypcji *in vitro,* w oparciu o wybraną i przetestowaną sekwencję targetową (siRNACDH#1) i niespecyficznej kontrolnej sekwencji siRNA firmy Ambion. Stosowane stężenia siRNA dla N-kadheryny oraz inhibitów kinaz białkowych: (1) PI3K kinazy — LY294002 (20 μM), (2) ERK1/2 kinazy — U0126 (10 μM), (3) mTOR kinazy — ewerolimus (5 nM) nie wykazywały efektu cytotoksyczności zarówno pojedynczo jak i w stosowanych kombinacjach.

 Uzyskane wyniki potwierdzają że wyciszanie genu N-kadheryny:

1. Hamuje inwazyjność komórek czerniaka o około 20-25% (p<0.00005).
2. Zastosowanie pojedynczych inhibitorów kinaz białkowych: U0126 (ERK1/2) lub ewerolimus (mTOR) zmniejsza inwazyjność komórek czerniaka o 21-25% (p<0.005), natomiast LY294002 (PI3K) o około 15% (p<0.005).
3. Zastosowanie kombinacji inhibitorów U0126 (ERK1/2) i LY294002 (PI3K) hamuje inwazyjność na poziomie 25% (p<0.005).
4. Najwyższy efekt spadku inwazyjności komórek czerniaka: o 38% (p<0.00005) zaobserwowano po zastosowaniu kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitora U126 (ERK1/2), a nieco niższy, bo o około 32% (p<0.00005) dla kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitora ewerolimus (mTOR).
5. Stwierdzono że, siRNA dla N-kadheryny wyraźnie hamuje ekspresję MMP-2 i MMP-9 w komórkach czerniaka, dla czasu 48 godzin zaobserwowano najwyższy spadek ekspresji MMP-2 dla linii Lu1205 i WM793 (odpowiednio o 47% i 40%), a dla drugiej metaloproteinazy - MMP-9 dla linii Lu1205 i WM793 zaobserwowano spadki odpowiednio o 62% i 52%.
6. Największy spadek aktywności MMP-2 i MMP-9 uzyskano po zastosowaniu kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitora LY294002 (PI3K), który dla czasu 48h wynosił około 60-70%. Dla krótszego czasu (24h) najlepsze efekty dawała kombinacja siRNA dla N-kadheryny i inhibitora U0126 (ERK1/2) - spadek o około 50-65%.
7. Zastosowanie kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitora ewerolimus (mTOR) dawało podobne rezultaty, bez względu na czas inkubacji, obserwowano spadek o około 50-60%.

 Szczególnie obiecujące wydają się być wyniki dotyczące zmniejszenia inwazyjności komórek czerniaka po zastosowaniu kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitora mTOR kinazy – ewerolimus, który jest lekiem stosowanym w terapii immunosupresyjnej po przeszczepieniu narządów [Macdonald 2007]. W ostatnich latach bardzo intensywnie prowadzone są badania na temat możliwości wykorzystania inhibitorów szlaku - mTOR kinazy w terapii nowotworowej [Lin et al. 2016, Li et al. 2018].

3. **Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Dorota Gil, Piotr Laidler.

Treatment of melanoma with selected inhibitors of signaling kinases effectively reduces proliferation and induces expression of cell cycle inhibitors. Med. Oncol. 2018: Vol. 35, nr 1 art. no. 7, s. 1-9,

Impact Factor ISI: 2.920, MNiSW: 20.000

 Trzecia z prezentowanych prac, podejmuje temat dotyczący roli wybranych kombinacji inhibitorów kinaz białkowych, ze szczególnym uwzględnieniem inhibitorów kinazy mTOR, w hamowaniu procesu proliferacji komórkowej, jak i wpływie tych kombinacji na poziom białek cyklu komórkowego w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego.

 Szlaki przekazywania sygnału są wzajemnie ze sobą powiązane; często hamowanie jednego szlaku powoduje aktywacje innej drogi sygnalizacyjnej. Podstawą dla udanej terapii, jest identyfikacja właściwego szlaku sygnalizacyjnego i skuteczne zahamowanie danego procesu np. proliferacji czy zdolności komórek nowotworowych do przeżycia [Conciatori et al. 2018, Sathe et al. 2018].

 Najbardziej pożądane w terapii nowotworowej są selektywne inhibitory kinaz białkowych możliwe do zastosowania w bardzo niskich stężeniach, charakteryzujące się niską toksycznością dla organizmu. Obiecujące wydaje się równoczesne hamowanie szlaku PI3K kinazy i MEK kinazy lub szlaku BRAF/MEK i mTOR. Obecnie bardzo intensywnie prowadzone są badania na temat możliwości wykorzystania inhibitorów mTOR – ewerolimus i rapamycyny - w terapii nowotworowej [Lin et al.2016, Li et al. 2018]. Inhibitory te są dopuszczonymi lekami i wykazują małą toksyczność dla organizmu [Conciatori et al. 2018].

 Celem prezentowanej pracy było poznanie wpływu wybranych inhibitorów kinaz białkowych szlaku mTOR, PI3K/AKT, MEK oraz B-RAF, na proliferacje i ekspresje białek regulatorowych cyklu komórkowego w komórkach czerniaka.

 Badania prowadzono w oparciu o wybrane inhibitory kinaz białkowych: ERK1/2 kinazy - U0126, PI3K kinazy - LY294002, mTOR kinazy rapamycynę i ewerolimus, B-RAF kinazy - GDC-0879 i GSK3β kinazy - CHIR-99021. Proliferację komórkową wyznaczano za pomocą testu ELISA – BrdU dla czasu 48-72h, a do określenia ekspresji kluczowych białek cyklu komórkowego: cykliny D1 i D3, kinaz zależnych od cykliny 4 i 6 (CDK4, CDK6) oraz białek p16, p21, p27 będących inhibitorami cyklu komórkowego zastosowano technikę western blot. Badania prowadzono w oparciu o komórki czerniaka pochodzące z fazy pierwotnej WM793 (VGP) i przerzutu do płuc u myszy - Lu1205. Stosowane stężenia inhibitorów kinaz białkowych: (1) PI3K inhibitor—LY294002 (20 μM), (2) ERK1/2 inhibitor—U0126 (10 μM), (3) mTOR inhibitory—rapamycyna i ewerolimus (5 nM), (4) B-RAF inhibitor—GDC-0879 (2 μM) i (5) GSK-3β inhibitor—CHIR-99021 (2 μM) oraz ich kombinacje nie wykazywały efektu cytotoksyczności.

 Uzyskane wyniki wskazują że:

1. Inhibitor GSK-3β kinazy — CHIR-99021 nie wpływał na obniżenie poziomu proliferacji w badanych liniach komórkowych czerniaka.
2. Zastosowanie wszystkich pozostałych inhibitorów kinaz białkowych powodowało bardzo istotnie, wyraźniejsze dla linii komórkowej pochodzącej z ogniska przerzutowego - Lu1205, obniżenie poziomu proliferacji o 12–34% (p < 0.0005) dla czasu 48h, oraz do około 50% dla inhibitorów mTOR kinazy: ewerolimus (p < 0.0005), rapamycyny (p < 0.0005), PI3K kinazy - LY294002 (p < 0.005) - dla dłuższego czasu 72h.
3. Zastosowanie wspomnianych kombinacji inhibitorów kinaz białkowych dawało zdecydowanie lepsze rezultaty niż te które otrzymywano dla stosowania pojedynczych inhibitorów. Podobnie jak w przypadku stosowania pojedynczych inhibitorów, efekt był zdecydowanie wyraźniejszy dla dłuższego czasu inkubacji i dla linii Lu1205.
4. Zastosowanie kombinacji inhibitorów ERK1/2 kinazy U126 lub B-RAF kinazy - GDC-0879 wraz z inhibitorem mTOR kinazy – ewerolimus powodowało spadek proliferacji komórek czerniaka o około 60% (p < 0.0005). Natomiast najlepszy rezultat - 62% (p < 0.0005) zahamowania proliferacji otrzymano dla linii - Lu1205 (72h) dla kombinacji inhibitora PI3K kinazy — LY294002 i mTOR inhibitor — ewerolimus.
5. W badanych liniach komórkowych czerniaka, stwierdzono wyraźnie wyższy poziom cykliny D3 i kinazy zależnej od cyklin - CDK6 niż cykliny D1 i CDK4. Ekspresja tych białek była też dużo wyższa dla linii pochodzącej z ogniska przerzutowego Lu1205 niż dla linii pierwotnej WM793.
6. Zaobserwowano także wyraźną zależność pomiędzy wpływem na obniżenie poziomu ekspresji danej cykliny, a rodzajem szlaku sygnalizacyjnego jaki hamuje dany inhibitor.
7. Najskuteczniejsze w obniżaniu poziomu cykliny D3 i kinazy zależnej od cyklin - CDK6 były inhibitory kinazy mTOR: rapamycyna i ewerolimus obniżając poziom badanych białek o około 60–75% w odniesieniu do komórek kontrolnych oraz inhibitor PI3K kinazy - LY294002 (~ 60–70%).
8. Natomiast stosowanie inhibitorów szlaku ERK1/2-U126 oraz B-RAF-GDC-0879 powodowało spadek ekspresji cykliny D1 i kinazy zależnej od cyklin - CDK4 o około 50–70% w stosunku do kontroli.
9. Spadkowi poziomu cyklin D1, D3 oraz kinaz zależnych od cyklin CDK4, CDK6 towarzyszył jednoczesny wzrost poziomu białek będących inhibitorami cyklu komórkowego: p16, p21 i p27. Wzrost ten był różny dla stosowanych inhibitorów kinaz białkowych; najwyższy o około 70% - dla inhibitorów kinazy mTOR: rapamycyny i ewerolimus, nieco niższy, bo o około 60% dla inhibitora B-RAF - GDC-0879.
10. Najbardziej efektywną kombinacja kinaz białkowych w hamowaniu jednoczesnej ekspresji obu cyklin D1 i D3 i kinaz zależnych od cyklin CDK4, CDK6 przy równoczesnym wzroście poziomu białek będących inhibitorami cyklu komórkowego, okazała się kombinacja inhibitora mTOR kinazy - ewerolimus - wraz z inhibitorami szlaku MAP kinazy, ERK1/2 - U126 czy B-RAF - GDC-0879.
11. W hamowaniu poziomu cykliny D3 i CDK6 najlepszy rezultat (60–80%) otrzymano przy jednoczesnym hamowaniu szlaku mTOR i PI3K, natomiast dla cykliny D1 i CDK4 najskuteczniejsze okazało się hamowanie szlaków PI3K i MAP kinazy.

 Znaczący spadek ekspresji wybranych cyklin: D1, D3 i kinaz zależnych od cyklin (CDK4, CDK6) występujący z równoległym wzrostem ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego, a w konsekwencji powodujący znaczące zmniejszenie proliferacji komórek czerniaka po zastosowaniu kombinacji inhibitorów kinaz białkowych, wyraźnie wykazały kluczową rolę transdukcji sygnałowej AKT, MEK/ERK i mTOR w progresji czerniaka.

**Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują te szlaki jako ważny cel w leczeniu czerniaka.**

**Zrozumienie czerniaka na poziomie molekularnym i określenie jego nowych celów molekularnych konieczne jest dla poprawy strategii terapeutycznych.**

1. **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).**

**Praca naukowo-badawcza**

 W mojej pracy naukowej zajmowałam się głównie tematyką dotyczącą badań struktury białek adhezyjnych poprzez ich funkcję i udział w szlakach sygnalizacyjnych do potencjalnego ich wykorzystania w terapii celowanej czerniaka.

 Efektem moich badań prowadzonych w ramach pracy magisterskiej w Katedrze Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Aldony Dembińskiej–Kieć było powstanie publikacji: [Kwaśniak et al.1999] - opis *w załączniku nr 4*, której jestem współautorem.

 Następnie w roku 1997, rozpoczęłam pracę w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w zespole Prof. dr hab. Piotra Laidlera. Moje początkowe zainteresowania naukowe obejmowały badania struktury komponenty cukrowej, głównie białek adhezyjnych związanych z procesem nowotworzenia. Prace te były prowadzone we współpracy z pracownią Prof. dr hab. Anny Lityńskiej z Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W wyniku tej współpracy powstały prace dotyczące analizy lektynowej komponenty cukrowej w liniach komórkowych czerniaka jak również ekspresji integryn w liniach komórkowych czerniaka i nowotworu pęcherza moczowego, których jestem współautorem [Laidler et al. 2000], [Lityńska et al. 2001] - *opis w załączniku nr 4*. W wyniku kolejnej współpracy z Prof. MD Jonasem Berquistem z Uppsala University w Szwecji, odnośnie możliwości prowadzenia analiz techniką MALDI MS, określono strukturę N-glikanów arylosulfatazy A co przedstawiono w publikacji, której jestem drugim autorem [Hoja-Łukowicz et al. 2000] - opis w *załączniku nr 4*.

 Dalsze moje zainteresowania naukowe skupiły się na roli N-kadheryny, białka adhezyjnego będącego glikoproteiną, a szczególnie na jej profilu glikozylacji w przebiegu procesu nowotworowego w komórkach czerniaka. W momencie podjęcia przeze mnie tego zagadnienia w literaturze dopiero zaczęły się pojawiać pierwsze doniesienia literaturowe o roli N-kadheryny w procesie nowotworzenia. Określenie profilu glikozylacji metodą lektynową opisuje praca:

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Dorota Gil, Dorota Hoja-Łukowicz, Anna Lityńska, Piotr Laidler. Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cell lines. Acta Biochim. Pol.: 2002:

Vol. 49, nr 4, s. 991-998.

 Moja rozprawa doktorska opisuje aspekt glikozylacji N-kadheryny w liniach komórkowych czerniaka.

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Piotr Laidler promotor. Glikozylacja N-kadheryny w liniach komórkowych czerniaka: rozprawa doktorska. Adres wydawniczy: Kraków: CM UJ, 2003,

Uniwersytet Jagielloński. Collegium Medicum. Wydział Lekarski.

 W wyniku realizacji projektu badań własnych, jako kierownik tematu „Analiza glikanów kadheryn i integrin w liniach komórkowych czerniaka za pomocą techniki MALDI MS”- 2000-2004 i we współpracy z Dr Angelą Amoresano (Department of Organic Chemistry and Biochemistry, School of Biotechnological Sciences, Federico II University of Naples, Naples, Italy) powstała praca opisująca miedzy innymi analizy profilu N-glikanów N-kadheryny w liniach komórkowych czerniaka:

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Angela Amoresano, Annarita Casbarra, Dorota Hoja-Łukowicz, Anna Lityńska, Piotr Laidler. The structure of the oligosaccharides of N-cadherin from human melanoma cell lines. Glycoconj. J.: 2004 : Vol. 20, nr 7/8, s. 483-492.

oraz praca odnośnie profili glikozylacji N-kadheryny w liniach komórkowych nowotworu pęcherza moczowego, której jestem współautorem [Hoja-Łukowicz et al. 2007] - opis w *załączniku nr 4*.

 W latach 2002- 2004 uczestniczyłam w charakterze głównego wykonawcy w projekcie

**FP5 EU „The European Searchable Tumour Line Database (ESTDAB)”.**

W ramach całego wieloośrodkowego projektu, wyznaczono ekspresję na poziomie genomowej i powierzchniowej antygenu HLA, scharakteryzowano również ekspresję wielu antygenów powierzchniowych, markerów apoptotycznych, antygenów nowotworowych i białek macierzy pozakomórkowej. Przeprowadzono też testy wydzielania cytokin i zidentyfikowano polimorfizmy w genach cytokin, jak również zidentyfikowano glikany na powierzchni komórki i oznaczono ekspresję glikozylotransferaz.

 W wyniku realizacji tego projektu powstała ogólnodostępna baza danych linii komórkowych czerniaka, pochodzących z rożnych jego stadiów rozwoju oraz różnych tkanek. Materiał badawczy został scharakteryzowany dla ponad 250 istotnych immunologicznie markerów przez konsorcjum europejskich naukowców które stanowią obecnie część bazy Immuno-Polymorphism Database (IPD) na stronie Europejskiego Instytutu Bioinformatyki (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab>).

 Praca w projekcie ESTDAB to doświadczenie z prawie 200 liniami komórkowymi czerniaka. Dotyczyła zarówno hodowli komórkowej jak i opracowania metody analizy glikozylotransferaz: FUT1, FUT4, SIAT3, SIAT4C i MGAT-5, opisanych w pracy:

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Marek Bodzioch, Dorota Gil, Danuta Żmudzińska, Aldona Dembińska-Kieć, Piotr Laidler. Expression of fucosyltransferases contributes to melanoma invasive phenotype. Med. Chem.: 2007 : Vol. 3, nr 5, s. 418-424.

 Oprócz badania ekspresji na poziomie RT-PCR glikozylotransferaz zajmowałam się także badaniem adhezji komórek czerniaka do odpowiednich podłoży: lamininy, colagenu i fibronektyny.

 W następnych latach: 2005-2008 uczestniczyłam jako główny wykonawca w projekcie

**FP6 EU** “**European Network for the identification and validation of Antigens and biomarkers in Cancer and their application in clinical Tumour immunology (ENACT)”.**

 Wieloośrodkowy projekt ENACT miał na celu zidentyfikowanie markerów odpowiedzi i antygenów nowotworowych, związanych z rakiem jajnika, prostaty i progresją czerniaka oraz opornością na immunoterapię. Zastosowano tu biologiczne, immunologiczne, biochemiczne i molekularne technologie biologii komórkowej. Rezultaty badań przyczynią się do opracowania szczepionek "następnej generacji", jak również zapewnią lepsze zrozumienie podstawowych mechanizmów biologicznych leżących u podstaw prezentacji i rozpoznawania antygenu w komórkach nowotworowych oraz zidentyfikowanie biomarkerów nowotworowych wiążących się z progresją nowotworu i opornością na immunoterapię.

 Moja praca w projekcie ENACT dotyczyła głównie poszukiwania markerów cukrowych zmienionych w wyniku procesu nowotworowego w komórkach czerniaka ludzkiego. Z uzyskanych wyników przygotowano pracę - których jestem współautorem: [Laidler et al. 2006, Hoja-Łukowicz et al. 2006, Lityńska et al. 2008] - opis w *załączniku nr 4*.

 Praca w ramach projektów ESTDAB i ENACT pozwoliła na nawiązanie współpracy i zdobywanie doświadczeń w ramach spotkań roboczych z naukowcami z innych ośrodków uczestniczących w projekcie miedzy innymi: The Nottingham Trent University – Nottingham, Wielka Brytania, Eberhard-Karls-Universität Tübingiem – Tubingiem, Niemcy, German Cancer Research Center – Heidelberg, Niemcy, Karolinska Institutet – Sztokholm, Szwecja, Fundacion Virgen De Las Nieves – Granada, Hiszpania.

 Kolejnym etapem w moich zainteresowaniach naukowych było podjęcie tematów badawczych dotyczących roli białek adhezyjnych, a szczególnie N-kadheryny w procesach związanych z przekazywaniem sygnału komórkowego, jak również z procesami związanymi z transformacją nowotworową komórki takimi jak: proliferacja, inwazja komórkowa czy apoptoza.

 Uczestniczyłam także w wielu szkoleniach krajowych i zagranicznych, głównie z tematyki: hodowli komórkowej, glikobiologii, biologii molekularnej, microRNA, siRNA i RNAi, inżynierii genetycznej, qPCR, klonowania, sekwencjonowania, edycji genomu metodą CRISPR szczegółowo opisane w dalszej części autoreferatu.

 W wyniku realizacji projektów badań własnych jako kierownik tematów: ‘Potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów związanych z transformacją nowotworową w komórkach czerniaka ludzkiego w procesie RNAi” - 2005-2006, „Badanie roli N-kadheryny w procesach związanych z inwazją nowotworową czerniaka ludzkiego” – 2007-2009, „Hamowanie szlaków sygnalizacyjnych z udziałem kadheryn za pomocą inhibitorów kinaz białkowych oraz techniki siRNA w komórkach czerniaka” - 2010-2012 oraz „Hamowanie inwazji komórek czerniaka poprzez stosowanie kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych” – 2012-2015 powstał cykl prac prezentowany w ramach osiągniecia naukowego [Ciołczyk-Wierzbicka et al. 2012, Ciołczyk-Wierzbicka et al. 2018a, Ciołczyk-Wierzbicka et al. 2018b], których szczegółowy opis znajduje się w poprzednim punkcie autoreferatu.

 W oparciu o badania roli w transformacji nowotworowej glikoproteomów linii komórkowych nowotworu prostaty wrażliwych i niewrażliwych na działanie androgenów powstała praca, której jestem drugim autorem [Drabik et al. 2014] - opis w *załączniku nr 4*.

 Zagadnienia dotyczące roli sygnalizacji komórkowej a w szczególności kinazy związanej z integryną (ILK) w przejściu epitelialno-mezenchymalnym (EMT), prezentują prace, których jestem drugim autorem [Gil et al. 2011, 2016] - opis w *załączniku nr 4*.

 Podjęta tematyka w cyklu prac [Wierzbicki et al. 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2012c, 2014] - opis w *załączniku nr 4*, których jestem współautorem, odnośnie roli troponin w uszkodzeniu mięśnia sercowego u pacjentów po przeszczepieniu serca, skłoniła mnie do prowadzenia zajęć dydaktycznych na 6 roku studiów dla kierunku lekarskiego odnośnie metabolizmu kardiomiocyta i reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego. Ta współpraca zainteresowała mnie badaniami dotyczącymi wykorzystania w terapii antynowotworowej inhibitorów kinazy mTOR - rapamycyny i ewerolimus, które to leki są od wielu lat stosowane w leczeniu immunosupresyjnym po transplantacji narządów [Macdonald 2007]. Inhibitor mTOR everolimus (RAD001) jest doustnym, niedawno zatwierdzonym przez US-FDA w skojarzeniu z eksemestanem, lekiem w terapii raka piersi [Lin et al. 2016]. Hamuje on proliferację komórek raka piersi opornego na inhibitory aromatazy poprzez obniżenie ekspresji receptora estrogenowego, a także poprzez indukowanie autofagii [Kim et al. 2017, Conciatori et al. 2018]. Wykazano również rolę ewerolimus w skutecznym hamowaniu wzrostu komórek raka pęcherza moczowego i chłoniaka oraz w specyficznych subpopulacjach gruczolakoraka rurkowego i nowotworu trzustki [Ji et al. 20117, Woo et al. 2017]. Temat zastosowania inhibitorów kinazy mTOR w terapii antynowotworowej podjęto w pracy:

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Karol Wierzbicki, Piotr Przybyłowski, Piotr Laidler.

Inhibitory mTOR w terapii antynowotworowej.

Forum Transplantologiczne. 2013: Vol. 1, nr 3, s. 7-12.

 Kinaza mTOR integruje wiele szlaków sygnalizacyjnych komórki, w tym szlak: insulinowy, związany z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 i 2, a także szlak mitogenów [Watanable et al. 2011, Paquette et al. 2018]. Deregulacja szlaku kinazy mTOR może być czynnikiem patogenezy różnych chorób człowieka, a zwłaszcza nowotworów. Deregulacja elementów szlaku sygnalizacyjnego mTOR opisywano dla wielu typów nowotworów, a szczególnie dla czerniaka, w którym zmiany te miały znaczący wpływ na progresje nowotworu. Dlatego szlak sygnalizacyjny mTOR jest atrakcyjnym celem dla terapii antynowotworowych.

 Z kolei tematykę znaczenia dihydrotestosteronu w progresji nowotworowej pęcherza moczowego i roli sygnalizacji z udziałem kinazy mTOR podejmuje praca, której jestem współautorem [Gil et al. przesłana do czasopisma Human Cell 2019] - opis w *załączniku nr 4*.

 W wyniku realizacji projektów badań własnych jako kierownik tematów: „Wykorzystanie inhibitorów mTOR i PI3K/AKT do hamowania proliferacji i aktywacji apoptozy w komórkach czerniaka” 2016-2018 oraz „Zastosowanie podwójnych inhibitorów kompleksu mTORC1 i mTORC2 w hamowaniu potencjału nowotworowego komórek czerniaka w zależności od ich statusu mutacji w genie BRAF, PTEN i N-RAS” 2019-2020 przygotowano prace:

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka**, Marta Zarzycka, Dorota Gil, Piotr Laidler

mTOR inhibitor Everolimus - induced apoptosis in melanoma cells.

Journal of Cell Communication and Signaling 2019, DOI: 10.1007/s12079-019-00510-0,

**Dorota Ciołczyk-Wierzbicka,** Dorota Gil, Marta Zarzycka, Piotr Laidler

mTOR inhibitor Everolimus- reduced melanoma cells invasiveness. Praca przesłana do czasopisma: Human Cell

**Podsumowanie najważniejszych osiągnięć**

 Obiecujące wyniki badań własnych [Ciołczyk-Wierzbicka 2018a, Ciołczyk-Wierzbicka 2018b] oraz dane z literatury [Kim et al. 2017, Li et al. 2018] sugerują, iż inhibitory kinazy mTOR (ewerolimus, rapamycyna) mają znaczący wpływ na regulację cyklu komórkowego, hamowanie proliferacji i inwazyjności komórek czerniaka [Ciołczyk-Wierzbicka 2018a, Ciołczyk-Wierzbicka 2018b], a także hamują ekspresję białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, jak również indukują apoptozę i autofagię [Ciołczyk-Wierzbicka 2019].

 Nanomolowe stężenie inhibitora mTOR ewerolimus w połączeniu z inhibitorem kinazy MAP (AS-703026) lub szlaku kinazy AKT (MK2206) jest wystarczające do wywołania procesu apoptozy i zmniejszenia proliferacji jak również inwazyjności w komórkach czerniaka. Wynik ten wydaje się bardzo obiecujący miedzy innymi ze względu na zastosowane bardzo niskie stężenia inhibitorów.

 Możliwe korzyści wynikające z terapii opartej na inhibitorach mTOR zależą od genetycznego statusu mutacji w genie PTEN i B-RAF. Prace w oparciu o badania dotyczące aberracji molekularnej przewidujące odpowiedź na ewerolimus i rapaanalogi sugerują, że utrata funkcji, aberracja w genie PTEN jest związana z powodzeniem terapii, podczas gdy niezmutowany gen B-RAF może być odpowiedzialny za mechanizm lekooporności [Weeber et al. 2017]. Status PTEN może potencjalnie wpłynąć na wybór leczenia klinicznego i pozwolić na zmniejszenie dawek leku, zmniejszając w ten sposób toksyczność terapii w skojarzonym hamowaniu szlaków MEK/ERK i PI3K/AKT/mTOR [Weeber et al. 2017, Santhe et al. 2018]. Ograniczone działania przeciwnowotworowe inhibitorów mTOR, analogów rapamycyny, mogą być związane z indukcją sygnałowej pętli zwrotnej, dlatego jednoczesne blokowanie obu szlaków sygnałowych: PI3K, AKT i mTOR może być skuteczną strategią terapeutyczną poprzez promowanie przedłużonej defosfosforylacji AKT, S6K1 i 4E-BP1 i indukcji apoptozy [Conciatori et al. 2018, Santhe et al. 2018]. Dlatego poznanie mechanizmów związanych z zastosowaniem podwójnych inhibitorów kompleksu mTORC1 i mTORC2 w hamowaniu potencjału nowotworowego komórek czerniaka w zależności od ich statusu mutacji w genie BRAF, PTEN i N-RAS w komórkach czerniaka powinno przyczynić się do opracowania terapii opartej na kombinacji odpowiednich inhibitorów kinaz białkowych.

 **Zrozumienie mechanizmów, dzięki którym komórki otrzymują i integrują sygnały pozakomórkowe, wyzwalające kaskadę wewnątrzkomórkowych sygnałów, wpływających na wzrost komórek i ich metabolizm, jest niezbędna do rozwoju dobrze ukierunkowanych terapii antynowotworowych.**

**Dane bibliometryczne**

 Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 25 publikacji naukowych (oraz 2 publikacje przesłane do redakcji czasopism) w tym 20 publikacji w czasopismach specjalistycznych z listy Journal Citation Reports (JCR) oraz 5 innych publikacji jak również 43 doniesienia zjazdowe obejmujące prezentacje ustne i postery na konferencjach międzynarodowych (34) i krajowych (9), spośród których 19 było publikowane w czasopismach z Impact Factor.

Analizę bibliometryczną mojego dorobku według bazy JCR zgodnie z rokiem ukazania się publikacji podsumowują wskaźniki:

Sumaryczny Impact Factor - 32,662

Suma punktów MNiSW (*według wykazu czasopism naukowych z dnia 06.03.2019*) - 313

Suma punktów Index Copernicus IC -105

Liczba cytowań: - 209 (*ISI Web of Science 1999-2018 z dnia 06.03.2019*)

Liczba cytowań: - 300 (*Research Gate 25.01.2019*)

Indeks Hirscha - 8 (*wg Web of Science*)

Indeks Hirscha - 9 (*Research Gate 25.01.2019*)

Zgodnie z analizą bibliometryczną sporządzona dnia 06.03.2019 przez Bibliotekę Medyczną Colegium Medicum UJ (opis w *załączniku nr 6*).

***Literatura***

1. *Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto Ch, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, Milella M (2018) mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy Cancers 10(1):23.*
2. *Ji S, Lin W, Wang L, Ni Z, Jin F, Zha X, Fei G (2017) Combined Targeting of mTOR and Akt Using Rapamycin and MK-2206 in The Treatment of Tuberous Sclerosis Complex. J Cancer 8(4):555-562.*
3. *Kim, JO, Kim KH, Song IS, Cheon KS, Kim OH, Lee SCh, Lee SK, Kim SJ (2017) Potentiation of the anticancer effects of everolimus using a dual mTORC1/2 inhibitor in hepatocellular carcinoma cells. Oncotarget 8(2):2936-2948*
4. *Krajowy Rejestr Nowotworów Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii Warszawa 02-034, ul. Wawelska 15* [*http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43/*](http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43/)
5. *Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease (2012) Cell 13,149(2):274–293.*
6. *Li X, Dai D, Chen B, Tang H, Xie X, Wei W (2018) Efficacy of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors for the treatment of advanced solid cancers: A literature-based meta-analysis of 46 randomised control trials. PLoS One 13(2):e0192464. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0192464.*
7. *Lin T, Leung C, Nguyen KT, Figlin RA (2016) Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in solid tumors. Clinical Pharmacist 8. http://doi.org/10.1211/CP.2016.20200813.*
8. *Macdonald AS. Use of mTOR inhibitors in human organ transplantation. Expert Rev Clin Immunol. 2007 May;3(3):423-36. doi: 10.1586/1744666X.3.3.423.*
9. *Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob, JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas*

*A, Roesch A, Hauschild A. Melanoma. Nat Rev Dis Prim. 2015;1:1–20.*

1. *Skowronek J., Mackiewicz, Żygulska-Mach A. Czerniak złośliwy- podręcznik dla lekarzy i studentów. Wydawca i rok wydania: 'TERMEDIA WYDAWNICTWA MEDYCZNE' 1998*
2. *Paquette M, EI-Houjeiri L, Pause A (2018) mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. Cancers (Basel). Jan; 10(1):18.*
3. *Pfeffer CM, Singh ATK (2018) Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. Int J Mol Sci. 19(2). pii: E448.*
4. *Sathe A, Chalaud G, Oppolzer I, Wong KY, Busch M, Schmid SC, Tong Z, Retz M, Gschwend JE, Schulz WA, Nawroth R (2018a) Parallel PI3K, AKT and mTOR inhibition is required to control feedback loops that limit tumor therapy. PLOS ONE 3(1):e0190854.*
5. *Watanabe R, Wei L, Huang J (2011) mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets. J Nucl Med 52(4):497-500*
6. *Weeber F, Cirkel GA, Hoogstraat M, Bins S, Hooijdonk Ch, Ooft S, Werkhoven E, Willems SM, Stralen M, Veldhuis WB, Besselink NJM, Horlings HM, Steeghs N, Jonge MJ, Langenberg MHG, Wessels LFA, Cuppen EP, Schellens JH, Sleijfer S, Lolkema MP, Voest EE (2017) Predicting clinical benefit from everolimus in patients with advanced solid tumors, the CPCT-03 study. Oncotarget 8(33):55582-55592.*
7. *Woo SU, Sangai T, Akcakanat A, Chen H, Wei C, Meric-Bernstam F (2017) Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway is synergistic in breast cancer. Oncogenesis 6(10):e385.*
8. *Yang F, Gao J-Y, Chen H, Du Z-H, Zhang X-Q, Gao W (2017) Targeted inhibition of the phosphoinositide 3-kinase impairs cell proliferation, survival, and invasion in colon cancer. OncoTargets and therapy10:4413-4422.*

**Projekty badawcze, kierownik tematu:**

* **2000-2004, WŁ/133/P/L statutowe UJCM-kierownik tematu**

Analiza glikanów kadheryn i integryn w liniach komórkowych czerniaka za pomocą techniki MALDI MS.

* **2005-2006, WŁ/255/P/L statutowe UJCM-kierownik tematu**

Potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów związanych z transformacją nowotworową w komórkach czerniaka ludzkiego w procesie RNAi.

* **2007-2009, K/ZDS/000454 statutowe UJCM – kierownik tematu**

Badanie roli N-kadheryny w procesach związanych z inwazją nowotworową czerniaka ludzkiego.

* **2010-2012 K/ZDS/1470 statutowe UJCM-kierownik tematu**

Hamowanie szlaków sygnalizacyjnych z udziałem kadheryn za pomocą inhibitorów kinaz białkowych oraz techniki siRNA w komórkach czerniaka.

* **2012-2015, K/ZDS/003782 statutowe UJCM – kierownik tematu**

Hamowanie inwazji komórek czerniaka poprzez stosowanie kombinacji siRNA dla N-kadheryny i inhibitorów kinaz białkowych

* **2016-2018, K/ZDS/006458 statutowe UJCM – kierownik tematu**

Wykorzystanie inhibitorów mTOR i PI3K/AKT do hamowania proliferacji i aktywacji apoptozy w komórkach czerniaka

* **2019-2020, statutowe UJCM – kierownik tematu (złożony wniosek)**

Zastosowanie podwójnych inhibitorów kompleksu mTORC1 i mTORC2 w hamowaniu potencjału nowotworowego komórek czerniaka w zależności od ich statusu mutacji w genie BRAF, PTEN i N-RAS .

 **Projekty międzynarodowe - główny wykonawca:**

* **2002-2004 ESTDAB –NAS: FP5 EU QLRI-CT-2001-01325**

European Searchable Tumour Cell Lines Data Bank ESTDAB

**http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/**

* **2005-2008, FP6 EU ENACT LSH-CT-2004-503306**

European Network for the identification and validation of Antigens and biomarkers in cancer and their application in Clinical Tumour Immunology ENACT FP6 EU

**Współprace naukowe:**

* Uppsala University Dept. of Physical and Analytical ChemistryAnalytical Chemistry P.O. Box 599 SE-751 24 Uppsala Sweden w zakresie badań biostrukturalnych
* Department of Organic Chemistry and Biochemistry, School of Biotechnological Sciences, Federico II University of Naples, Naples, Italy w zakresie badań biostrukturalnych
* Department of Microbiology and Immunology Brody School of Medicine East Carolina University USA w zakresie badań z wiązanych z sygnalizacją komórkową
* The Nottingham Trent University - Nottingham Wielka Brytania w zakresie realizacji projektów międzynarodowych ESTDAB I ENACT
* Eberhard-Karls-Universität Tübingiem - Tubingiem Niemcy w zakresie realizacji projektów międzynarodowych ESTDAB I ENACT
* German Cancer Research Center - Heidelberg Niemcy w zakresie realizacji projektów miedzynarodowych ESTDAB I ENACT
* Karolinska Institutet - Sztokholm Szwecja w zakresie realizacji projektów międzynarodowych ESTDAB I ENACT
* Fundacion Virgen De Las Nieves - Granada Hiszpania w zakresie realizacji projektów międzynarodowych ESTDAB I ENACT
* Chair of Clinical Biochemistry Jagiellonian University Medical College, Kraków Polska w zakresie badań biologii molekularnej
* Institute of Zoology, Department of Animal Physiology, Jagiellonian University, Kraków, Poland w zakresie badań biostrukturalnych, glikobiologii
* Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Science Z. Noskowskiego 12/14 61-704 Poznań, Poland w zakresie projektowania sekwencji siRNA
* Department of Cardiovascular Surgery and Transplantology Jagiellonian University Medical College, John Paul II Hospital, Kraków Polska

**Szkolenia krajowe i zagraniczne**

1.”Technika PCR i jej zastosowanie”, DNA-Gdańsk, Gdańsk, luty 2001

2. „siRNA projektowanie sekwencji, technika postranskrypcyjnego wyciszania genu za pomocą techniki siRNA”, Poznań, grudzień 2003

3. “Bioinformatyka”, Kraków, styczeń 2003

4. “Glycomics Challenges and Technologies” London, UK 27-29.11.2006

5. “RNAi and microRNA: Market Landscape and Emerging Opportunities”, Barcelona Spain, 21 Sep 2007

6. „Hodowle komórek ssaczych”, Kraków, Merck ,9 czerwca 2011

7. „Hodowle komórkowe. Analiza komórek”. Kraków, Merck, 29 październik 2012

8. „Sekwencjonowanie i oprogramowanie ion torrent”, Life Technologies, Kraków, 19. luty 2013

9. “Real Time PCR”, Life Technologies, Kraków 10 października 2013

10. “The Evolution of the Revolution – Semiconductor sequencing in various applications”,

Life Technologies, Kraków,06 marca 2014

11. „Technology Days, Analizę funkcjonalną genomu przy użyciu najnowszych technologii z portfolio tzw. biologii syntetycznej. CRISPR, siRNA SilencerSelect, Presicion TALs, GeneArt, miRNA Mimics & Inhibiotors”. Life Technologies, Kraków, 20 listopada 2014

12. “Hodowle komórek ATCC The Horrid History of Cell Culture, From Petri Dish to Human: Lost in Translation”, Merck, Kraków 28 maja 2015

13. “New sensitive miRNA analysis method usinq qPCR technique” Kraków, Life Technologies,

11 kwietnia 2016

14."Klonowanie to nie tylko enzymy restrykcyjne - alternatywne metody klonowania". Lab-JOT®, Gdańsk, 6 września 2017

15. Warsztaty mikrobiologiczne połączone z seminariami pt.: "Przewlekłe zapalenie zatok - nowe wyzwania diagnostyczne i terapeutyczne". MML Centrum Medyczne, Warszawa, Gdańsk 6 września 2017

16. „Narzędzia do efektywnej edycji genomu metodą CRISPR”, Biokom, Gdańsk, 8 września 2017

**Recenzje dla czasopism:**

* Glycobiology (IF- 3.664),
* British Journal of Cancer (IF- 5,922),
* Cancer Immunology and Immunotherapy (IF- 4.846),
* Proteomics (IF- 4.041),
* Tumor Biology (IF- 3.650),
* Medical Chemistry (IF- 2.631)

**Udział w przygotowaniu konferencji naukowych:**

* XXVI Sympozjum Peptydowe 1-4.09.2001 Kraków
* 6th PARNAS CONFERENCE 30.05-2.06.2007
* Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2008, 17-19.10.2008

**Charakterystyka doświadczenia i dorobku dydaktycznego**

 Działalność dydaktyczna stanowi istotny element mojej pracy zawodowej. Od początku mojej pracy zawodowej prowadziłam zajęcia dydaktyczne z zakresu chemii i biochemii dla kierunku:

* lekarskiego,
* lekarsko-dentystycznego,
* farmacji.

Przygotowywałam także pytania na ćwiczenia laboratoryjne, kolokwia i egzaminy końcowe. Prowadziłam także zajęcia zintegrowane z biochemii dla kierunku lekarskiego „Metabolizm kardiomiocyta”. Brałam również udział w przygotowywaniu materiałów dydaktycznych oraz eliminacjach studentów do konkursu z biochemii „Superhelisa”.

 Obecnie moja działalność dydaktyczna skupia się głównie na pracy ze studentami kierunku lekarskiego w ramach kursu *Biochemia z elementami chemii UJCM*.

 **Jestem także koordynatorem kursu *„Chemia” dla kierunku Weterynaria* w ramach Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR.**

 Zostało mi powierzone rozpoczęcie i przygotowanie kursu dla przedmiotu chemia dla powstałego w 2012 roku nowego kierunku - Kierunek Weterynaria w ramach studiów międzywydziałowych UJ-UR.

 Samodzielne opracowałam i przygotowałam cykl wykładów, seminariów i ćwiczeń laboratoryjnych. Zajęłam się również nadzorowaniem przebiegu kursu, sprawdzeniem części doświadczalnej, przygotowaniem instrukcji do ćwiczeń oraz opracowaniem Sylabusa dla kursu.

 Corocznie prowadzę także cykl wykładów, przygotowuję i przeprowadzam egzamin testowy dla przedmiotu chemia (trzy terminy egzaminu).

 Jako członek Rady Kierunku Weterynaria w Ośrodku Studiów Weterynaryjnych UJ-UR

(2013-2016) brałam udział w przygotowywaniu programu kształcenia dla kierunku Weterynaria.

 Prowadzę również zajęcia seminaryjne i laboratoryjne w języku angielskim w ramach kursów Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJCM, dla studentów kierunku lekarskiego:

* 1-6 course Biochemistry with Chemistry,
* 2-6 course Biochemistry with Chemistry,
* M-1 course Biochemistry with Chemistry

oraz dla kierunku lekarsko-dentystycznego:

* 1-5 course Biochemistry with Chemistry.

 W ramach prowadzonych zajęć brałam udział w przygotowywaniu instrukcji do ćwiczeń laboratoryjnych i układałam pytania do seminariów i ćwiczeń laboratoryjnych.

 Od kilku lat prowadzę kurs przygotowawczy w języku angielskim dla studentów kierunku lekarskiego Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJCM, dla którego to kursu opracowałam pierwszą z czterech części:

* Preliminary course in Chemistry for 1-6.

**Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego**

 W ramach działalności dydaktycznej prowadziłam również opiekę nad studentami kierunku lekarskiego z Koła Naukowego w zakresie szkolenia odnośnie technik hodowli komórkowej, biologii molekularnej i proteomiki.

 Sprawowałam także opiekę nad

* doktorantką UJCM - opis w *załączniku nr 4*, w zakresie szkolenia odnośnie technik analiz białek, nadzorowałam i uczestniczyłam w wykonaniu części doświadczeń w ramach pracy doktorskiej oraz
* magistrantką UJ - opis w *załączniku nr 4* w zakresie: szkolenia z technik hodowli komórkowej, technik biologii molekularnej i komórkowej oraz analiz białek. Uczestniczyłam także w seminariach magisterskich i przygotowaniu magistrantki do prezentacji w ramach tych zajęć oraz dokonywałam korekty jej pracy magisterskiej.

