

**Załącznik 2A**

**Autoreferat**

**Dr n. biol. Halina Jurkowska**

**Katedra Biochemii Lekarskiej**

**Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum**

**Kraków 2018**

## AUTOREFERAT

### SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Imię i Nazwisko.....                                                                                                                                                                                                                        | 3  |
| 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ <del>artystyczne</del> – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....                                                                                           | 3  |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ <del>artystycznych</del> .....                                                                                                                                            | 4  |
| 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)..... | 4  |
| 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/ <del>artystycznego</del> .....                                                                                                                                                                               | 4  |
| 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....                                                                                                          | 4  |
| 4.3. Omówienie celu naukowego/ <del>artystycznego</del> ww. <del>pracy/prac</del> i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....                                                                                 | 5  |
| 4.3.1. Cel naukowy ww. prac stanowiących temat osiągnięcia naukowego.....                                                                                                                                                                      | 5  |
| 4.3.2. Wprowadzenie.....                                                                                                                                                                                                                       | 6  |
| 4.3.3. Opis wyników zawartych w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe.....                                                                                                                                                               | 7  |
| 4.3.4. Wnioski.....                                                                                                                                                                                                                            | 13 |
| 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych ( <del>artystycznych</del> ).....                                                                                                                                                        | 15 |
| 5.1. Realizowane projekty badawcze.....                                                                                                                                                                                                        | 15 |
| 5.2. Współpraca z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.....                                                                                                                                                                           | 16 |
| 5.3. Zdobyte umiejętności metodyczne w pracy laboratoryjnej.....                                                                                                                                                                               | 16 |
| 5.4. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych.....                                                                                                                                                                   | 17 |
| 5.5. Tematyka badań obejmująca zagadnienia dotyczące pracy doktorskiej.....                                                                                                                                                                    | 20 |
| 5.6. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.....                                                                                                                                                                       | 22 |
| 5.7. Podsumowanie całego dorobku naukowego.....                                                                                                                                                                                                | 27 |
| 5.8. Recenzowane prace.....                                                                                                                                                                                                                    | 28 |
| 5.9. Działalność dydaktyczna.....                                                                                                                                                                                                              | 28 |
| 5.10. Inne rodzaje aktywności naukowej.....                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| 5.11. Przynależność do organizacji Towarzystw Naukowych.....                                                                                                                                                                                   | 29 |

**1. Imię i Nazwisko**

Halina Jurkowska

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

**20 listopada 2008 r – dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii:**  
Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.

Tytuł pracy doktorskiej: „Wpływ desulfuracyjnych przemian cysteiny na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek mózgu”.

Promotor: Prof. dr hab. Maria Wróbel.

**1995 – 2000 r Studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.**

**12 czerwca 2000 r – dyplom z wyróżnieniem magistra biologii ze specjalnością biologia molekularna.**

Tytuł pracy magisterskiej: Wpływ taksolu na żywotność i proliferację ludzkich komórek nowotworowych: A549 i U373”. Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Klein.

**1998 – 2000 r – Studium Pedagogiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego.**

Dyplom uzyskania kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczycielskiej w zakresie biologii i chemii.

**1990 – 1994 r – II Liceum Ogólnokształcącego w Rabce-Zdroju.**

W 1994 r zdałam egzamin maturalny i otrzymałam z wyróżnieniem świadectwo dojrzałości.

**1981 – 1990 r - Szkoła Podstawowa w Zalesiu.**

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

**1 listopada 2000 – 30 września 2011 r – Asystent naukowo-dydaktyczny –**  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Biochemii Lekarskiej, Zakład Biochemii Ogólnej.

**1 października 2011 r – do chwili obecnej – Adiunkt -** Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Katedra Biochemii Lekarskiej, Zakład Biochemii Ogólnej.

**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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

**Modulacja tlenowych i beztlenowych przemian L-cysteiny w hodowlach komórkowych.**

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl trzech prac oryginalnych, które powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

**Sumaryczny Impact Factor prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 9.008, a punktacja MNiSW 80** (zgodnie z analizą bibliometryczną (Załącznik 4A) przygotowaną przez Bibliotekę Medyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z dnia 24 września 2018r.).

Mój indywidualny wkład autorski w powstanie każdej z prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego znajduje się w *Załączniku 3 (pkt.I.B)*, a oświadczenia wszystkich współautorów o ich indywidualnym wkładzie autorskim w te prace w *Załączniku 6*.

- 1. Jurkowska H, Stipanuk MH, Hirschberger LL, Roman HB. (2015) Propargylglycine inhibits hypotaurine/taurine synthesis and elevates cystathionine and homocysteine concentrations in primary mouse hepatocytes. Amino Acids 47(6):1215-1223.**

autor korespondencyjny: **Halina Jurkowska**

**IF: 3.196; Punktacja MNiSW: 30**



2. **Jurkowska H**, Wróbel M, Kaczor-Kamińska M, Jasek-Gajda E (2017) A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity. *Amino Acids*, 49(11): 1855-1866.

autor korespondencyjny: **Halina Jurkowska**

**IF: 2.906; Punkcja MNiSW: 25**

3. **Jurkowska H**, Wróbel M, Szlęzak D, Jasek-Gajda E (2018) New aspects of antiproliferative activity of 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, a natural H<sub>2</sub>S-donor. *Amino Acids*, 50(6): 699-709.

autor korespondencyjny: **Halina Jurkowska**

**IF: 2.906; Punkcja MNiSW: 25**

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

**4.3.1. Cel naukowy ww. prac stanowiących temat osiągnięcia naukowego**

**Celem badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie:**

- czy i w jaki sposób zmienia się zarówno tlenowy jak i beztlenowy metabolizm L-cysteiny w komórkach, w odpowiedzi na dostarczanie związków zawierających siarkę (naturalnych donorów siarki, oraz metioniny i homocysteiny), a także propargylglicyny (inhibitora  $\gamma$ -cystationazy, enzymu uczestniczącego w metabolizmie L-cysteiny);
- czy zmiany te skorelowane są ze zmianami stanu redox i proliferacji komórek oraz jakie mechanizmy są z tym związane.

**Celem szczegółowym było określenie:**

- a) wpływu propargylglicyny (PPG) na tlenowe przemiany L-cysteiny w hodowli pierwotnych wild-type hepatocytów (Cdo1<sup>+/+</sup>) – czy propargylglicyna może mieć wpływ na poziom hipotauryny i tauryny (**Publikacja 1, pkt 4.2**),
- b) wpływu propargylglicyny oraz propargylglicyny jednocześnie w obecności prekursorów L-cysteiny (PPG+homocysteina; PPG+metionina) na poziom hipotauryny i tauryny oraz poziom cystationiny, homocysteiny i glutationu w hodowli pierwotnych wild-type hepatocytów (Cdo1<sup>+/+</sup>) i hepatocytów pozbawionych genu dioksygenazy cysteinowej (Cdo1<sup>-/-</sup>) (**Publikacja 1, pkt 4.2**),

- c) wpływu trisiarczku diallilu - naturalnego donora siarki sulfanowej (składnik ekstraktu czosnku), na intensywność desulfuracyjnych przemian L-cysteiny i proliferację (w tym na zmianę poziomu białka Bcl-2) ludzkich komórek nowotworowych, w których poziom związków zawierających siarkę sulfanową jest obniżony (**Publikacja 2, pkt 4.2**),
- d) wpływu izotiocyjanianu 4-hydroksybenzylu - naturalnego donora  $H_2S$  (związek otrzymywany z gorczycy białej), na intensywność desulfuracyjnych przemian L-cysteiny i proliferację (w tym na zmianę poziomu białek cyklu komórkowego i białka Bcl-2, oraz mitochondrialny potencjał błonowy i stres oksydacyjny) ludzkich komórek nowotworowych mających obniżony poziom związków zawierających siarkę sulfanową (**Publikacja 3, pkt 4.2**).

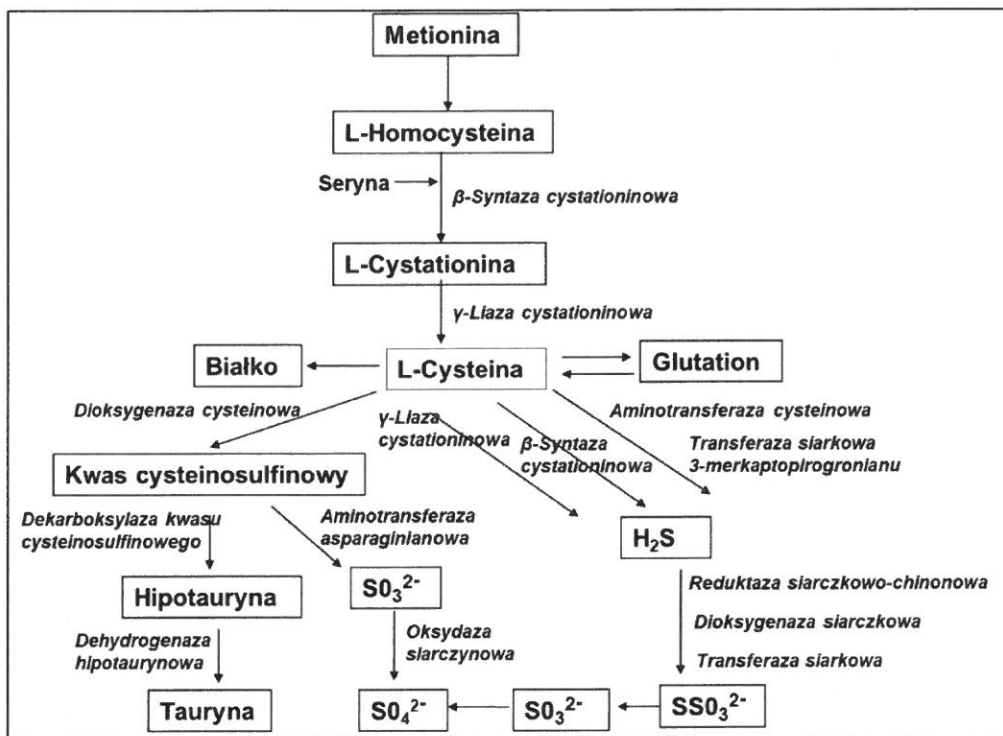
#### 4.3.2. Wprowadzenie

L-cysteina wykorzystywana jest do syntezy glutationu, białek oraz metabolizowana jest w tlenowym i beztlenowym (desulfuracyjnym) szlaku przemian (Rysunek 1). **Tlenowe przemiany L-cysteiny** w komórkach zależne są od aktywności dioksygenazy cysteinowej (Cdo1) i prowadzą do powstania hipotauryny, tauryny lub siarczanu. Z kolei **beztlenowe przemiany L-cysteiny** są w komórkach źródłem siarkowodoru ( $H_2S$ ) oraz związków zawierających siarkę sulfanową (atomy siarki na 0 lub -1 stopniu utlenienia). W przemianach tych uczestniczą enzymy: transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu (MPST, EC 2.8.1.2), rodanaza (TST, transferaza siarkowa tiosiarczanu, EC 2.8.1.1),  $\gamma$ -cystationaza (CTH,  $\gamma$ -liaza cystationinowa, EC 4.4.1.1) oraz  $\beta$ -syntaza cystationinowa (CBS, EC 4.2.1.22).

W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszą się badania dotyczące roli  $H_2S$  oraz siarki sulfanowej w diagnostyce wielu chorób, w tym chorób nowotworowych, kardiologicznych czy neurodegeneracyjnych. Wydaje się, że kontrola komórkowego stężenia L-cysteiny może mieć ważne znaczenie dla właściwej regulacji poziomu  $H_2S$  i tiosiarczanu (produkt utleniania  $H_2S$ ) oraz siarki sulfanowej w komórkach.

**Rysunek 1. Metabolizm L-cysteiny.**

(Rysunek wg **Publikacji 1** zawartej w przedstawionym cyklu prac w pkt 4.2).



#### 4.3.3. Opis wyników zawartych w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

##### a) Publikacja 1:

Jurkowska H, Stipanuk MH, Hirschberger LL, Roman HB. (2015) Propargylglycine inhibits hypotaurine/taurine synthesis and elevates cystathionine and homocysteine concentrations in primary mouse hepatocytes. *Amino Acids* 47(6):1215-1223.

W pracy tej, badania prowadzono w pierwotnych hepatocytach izolowanych z myszy (samce) pozbawionych enzymu zaangażowanego w tlenowy szlak przemian L-cysteiny - dioksygenazy cysteinowej ( $Cdo1^{-/-}$ ) i wild-type ( $Cdo1^{+/+}$ ) hepatocytach oraz w ich mediach hodowlanych.

Badano efekt propargylglicyny (PPG, inhibitor  $\gamma$ -cystationazy- CTH) na syntezę hipotauryny i tauryny (produktów tlenowego szlaku przemian), poziom cystationiny oraz całkowity poziom homocysteiny i glutationu w hepatocytach obu genotypów myszy (Rysunek 2). Dodawano również do medium hodowlanego hepatocytów ( $Cdo1^{+/+}$  i  $Cdo1^{-/-}$ ) homocysteinę i metioninę, związki mogące mieć wpływ na regulację przemian L-cysteiny.

W pierwotnych hepatocytach izolowanych z myszy pozbawionych genu dioksygenazy cysteinowej (Cdo1<sup>-/-</sup>), intensywność przekształcania L-cysteiny na drodze tlenowej jest ograniczona (stwierdzono obniżenie poziomu hipotauryny i tauryny w Cdo1<sup>-/-</sup> hepatocytach w porównaniu do Cdo1<sup>+/+</sup>). Co ciekawe, wykazano również, że w hodowli wild-type Cdo1<sup>+/+</sup> hepatocytów dochodzi do akumulacji hipotauryny.

Co jest interesujące, wykazano, że w wild-type Cdo1<sup>+/+</sup> hepatocytach, propargylglicyna (2 mM), znana dotychczas jako inhibitor  $\gamma$ -cystationazy, wyraźnie wpływa na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu produktów tlenowego szlaku przemian – hipotauryny i tauryny. Podobny hamujący efekt PPG na poziom hipotauryny i tauryny zaobserwowano jednocześnie w medium wild-type Cdo1<sup>+/+</sup> hepatocytów hodowanych przez 24 i 48 h (Rysunek 2).

**A zatem, zaobserwowane obniżenie syntezy hipotauryny/tauryny w obecności propargylglicyny w wild-type hepatocytach może sugerować, że propargylglicyna hamuje także enzym uczestniczący bezpośrednio w syntezie hipotauryny – dekarboksylazę kwasu cysteiniosulfonowego (CSAD).** CSAD, podobnie jak  $\gamma$ -cystationaza, jest bowiem enzymem zależnym od fosforanu pirydoksalu.

Wykazano także, że PPG wpływa jednocześnie na wyraźne zwiększenie poziomu cystationiny zarówno w wild-type Cdo1<sup>+/+</sup>, jak i Cdo1<sup>-/-</sup> hepatocytach oraz w ich mediach hodowlanych. Co więcej, poziom homocysteiny był również podwyższony w obecności PPG (Rysunek 2).

Gromadzenie się cystationiny (produktu reakcji katalizowanej przez  $\beta$ -syntazę cystationinową oraz substratu dla  $\gamma$ -cystationazy) świadczy o blokowaniu aktywności CTH przez propargylglicynę. Na skutek wzrostu stężenia cystationiny rośnie też zatem, w badanych komórkach oraz w ich mediach hodowlanych, poziom homocysteiny będącej substratem dla  $\beta$ -syntazy cystationinowej, która katalizuje reakcje: (1) Seryna+Homocysteina→Cystationina+H<sub>2</sub>O; (2) Cysteina+Homocysteina→Cystationina+H<sub>2</sub>S.

Wykazano ponadto, że hodowanie komórek w obecności PPG oraz dodanej do medium jednocześnie homocysteiny (0.2 mM HCys+2mM PPG) i metioniny (0.5 mM Met+2mM PPG), ma dodatkowy wpływ na wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cystationiny oraz homocysteiny w wild-type Cdo1<sup>+/+</sup> i Cdo1<sup>-/-</sup> hepatocytach (Rysunek 2).

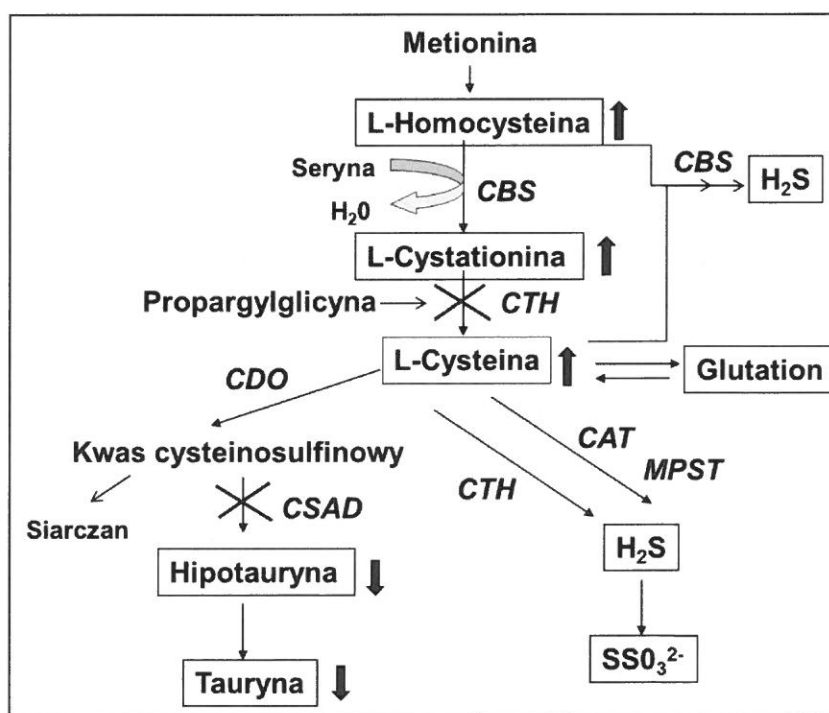
Wydaje się zatem, że **propargylglicyna poprzez zwiększanie poziomu cystationiny i homocysteiny (w następstwie hamowania aktywności  $\gamma$ -cystationazy) może nasilać w badanych komórkach reakcje desulfuracji katalizowane przez  $\beta$ -syntazę cystationinową.**

Stwierdzono, że propargylglicyna nie wpływa na poziom całkowitego glutationu w hepatocytach izolowanych z obu genotypów myszy oraz w mediach hodowlanych. Wykazano natomiast, że 0.5 mM metionina i 0.2 mM homocysteina (jako prekursor L-cysteiny) wpływają na wzrost poziomu całkowitego glutationu, ale tylko w wild-type  $Cdo1^{+/+}$  hepatocytach hodowanych w obecności PPG. Stwierdzono także, że wraz z czasem trwania hodowli (24 i 48 h) poziom całkowitego glutationu w medium hodowlanych jest coraz wyższy.

Badania przeprowadzone w tej pracy są też interesujące z tego względu, że dotychczas brak jest danych literaturowych pokazujących jak zmienia się poziom związków tiolowych i cystationiny, jednocześnie i w komórkach i w ich mediach hodowlanych, co pozwala na głębsze zrozumienie zagadnień dotyczących regulacji metabolizmu L-cysteiny.

**Rysunek 2. Wpływ propargylglicyny na syntezę hipotauryny/tauryny i desulfuracyjne przemiany L-cysteiny w pierwotnych wild-type  $Cdo1^{+/+}$  hepatocytach.** (Rysunek wg *Publikacji 1* zawartej w przedstawionym cyklu prac w pkt 4.2).

*CDO* dioksygenaza cysteinowa, *CSAD* dekarboksylaza kwasu cysteinosulfonowego, *CTH*  $\gamma$ -cystationaza ( $\gamma$ -liaza cystationinowa), *CBS*  $\beta$ -syntaza cystationinowa, *CAT* aminotransferaza cysteinowa, *MPST* transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu.



**b) Publikacja 2:**

**Jurkowska H, Wróbel M, Kaczor-Kamińska M, Jasek-Gajda E (2017) A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity. Amino Acids, 49(11): 1855-1866.**

W pracy tej, badania prowadzono w hodowli ludzkich komórek nowotworowych: U87MG (astrocytoma) i SH-SY5Y (neuroblastoma). Zbadano jak w obecności trisiarczku diallilu (DATS, naturalny donor siarki sulfanowej, składnik ekstraktu czosnku) regulowane są w tych komórkach przemiany desulfuracyjne L-cysteiny: poziom siarki sulfanowej, aktywność transferaz siarkowych (MPST,  $\gamma$ -cystationazy, rodanazy), jak zmienia się poziom cystationiny i niebiałkowych tioli (zredukowanego - GSH i utlenionego – GSSG glutationu, L-cysteiny, L-cystyny), oraz proliferacja komórek i poziom białka Bcl-2.

Wykazano, że w **obecności trisiarczku diallilu hamowana jest proliferacja zarówno komórek U87MG, jak i SH-SY5Y**. Co jest interesujące, badania z użyciem cytometrii przepływowej wykazały, że te antyproliferacyjne właściwości DATS skorelowane są ze zwiększeniem się liczby komórek mających nieaktywną formę antyapoptotycznego białka Bcl-2. W komórkach U87MG stwierdzono, że DATS nasila desulfuracyjne przemiany L-cysteiny poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu siarki sulfanowej i jednocześnie zwiększenie aktywności MPST i rodanazy, enzymów zaangażowanych odpowiednio w wytwarzanie i przenoszenie siarki sulfanowej (Rysunek 3). **Uzyskane przez nas wyniki po raz pierwszy wskazują na to, że trisiarczek diallilu może funkcjonować jak donor atomu siarki sulfanowej przenoszonej przez siarkotransferazy na grupy tiolowe –SH reszt cysteinowych białka Bcl-2 (proces S-sulfuracji,  $-SH \rightarrow -SSH$ ) i w ten sposób obniżać ilość aktywnej formy białka Bcl-2 w komórkach.**

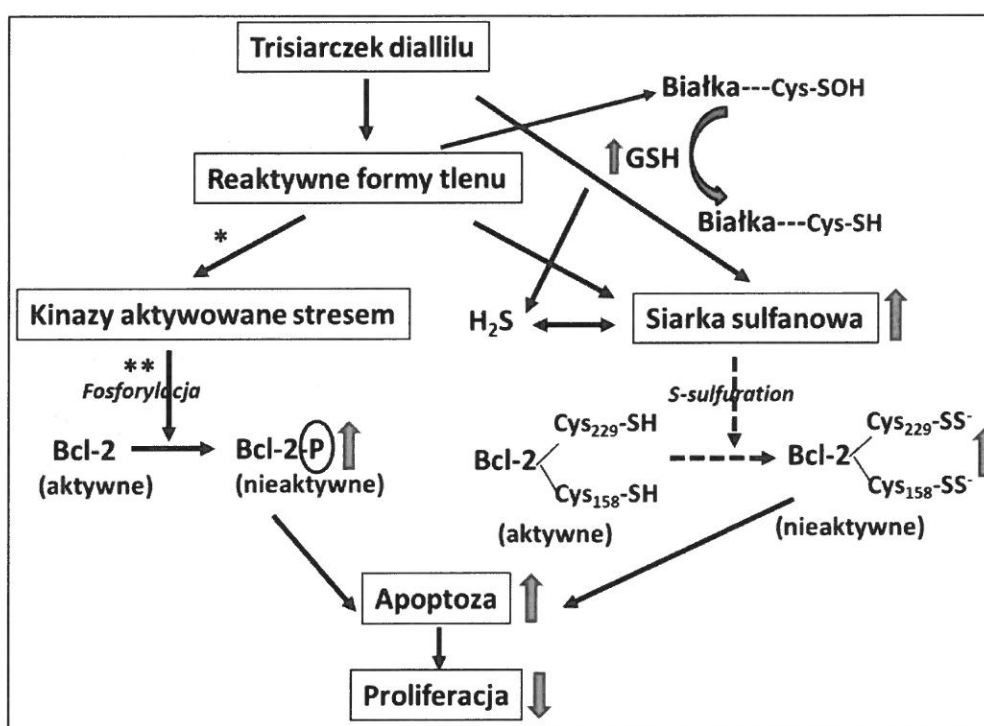
Z kolei w komórkach SH-SY5Y wykazano, że poziom L-cysteiny jest znikomy. Obserwowana przez nas inaktywacja białka Bcl-2 w komórkach SH-SY5Y może być zatem związana ze wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) (tworzenie się ROS zostało potwierdzone przez Das i wsp., 2007: *Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. Cancer 110:1083-1095*) i w tym następstwie aktywacją kinaz (aktywacja ta została potwierdzona przez Xiao i wsp. 2004: *Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. Oncogene 23:5594–5606*) fosforylujących a tym samym inaktywujących białko Bcl-2 (Rysunek 3).

Co więcej, na podstawie uzyskanych wyników możemy powiedzieć, że **trisiarczek diallilu wykazuje nie tylko antyproliferacyjne, ale może mieć także antyoksydacyjne**

**działanie na komórki nowotworowe**, o czym świadczy zwiększenie się aktywności rodanazy i MPST (enzymów, którym przypisywany jest udział także w procesach antyoksydacyjnych) oraz wzrost poziomu cystationiny (prekursora L-cysteiny) i GSH w komórkach.

**Rysunek 3. Mechanizmy hamowania proliferacji komórek nowotworowych U87MG i SH-SY5Y w obecności trisiarczku diallilu.** (Rysunek wg *Publikacji 2* zawartej w przedstawionym cyklu prac w pkt 4.2).

\*szlak oznaczony tym symbolem dotyczy reakcji opisanych w pracy Das i wsp.(2007), oraz \*\* w pracy Xiao i wsp. (2004). Linie przerywane przedstawiają sugerowany mechanizm reakcji.



### c) Publikacja 3:

Jurkowska H, Wróbel M, Szlęzak D, Jasek-Gajda E (2018) New aspects of antiproliferative activity of 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, a natural H<sub>2</sub>S-donor. *Amino Acids*, 50(6): 699-709.

W pracy tej, badania prowadzono w hodowli ludzkich komórek nowotworowych: U87MG (astrocytoma) i SH-SY5Y (neuroblastoma). Zbadano jak w obecności izotiocyanianu 4-hydroksybenzylu (HBITC) regulowana jest produkcja H<sub>2</sub>S i tiosiarczku, jak zmienia się poziom białka MPST i rodanazy, jaki to ma wpływ na stres oksydacyjny i proliferację komórek,



oraz związany z tym poziom białek cyklu komórkowego (p53, p21) i białka Bcl-2, a także potencjał transbłonowy mitochondriów.

**W pracy tej wykazano po raz pierwszy, że izotiocyjanian 4-hydroksybenzylu (HBITC), naturalny roślinny donor  $H_2S$  otrzymywany z nasion gorczycy białej (*Sinapis alba*), ma hamujący wpływ na proliferację ludzkich komórek nowotworowych U87MG i SH-SY5Y (Rysunek 4).**

Wykazano, że antyproliferacyjne działanie HBITC skorelowane jest ze zwiększeniem się poziomu tiosiarczanu uwalnianego do mediów hodowlanych w przypadku obu badanych linii komórkowych U87MG i SH-SY5Y. Wydaje się zatem, że **tiosiarczan, jako produkt utleniania  $H_2S$ , a z drugiej strony jako donator siarki sulfanowej, może mieć istotne znaczenie w mechanizmach, które prowadzą do obniżenia proliferacji badanych komórek nowotworowych.**

Wykazano, że zarówno w U87MG, jak i SH-SY5Y komórkach, HBITC wpływa na obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego oraz zmniejszenie się liczby komórek mających aktywną formę antyapoptotycznego białka Bcl-2 (**możliwa inaktywacja białka Bcl-2 na drodze S-sulfuracji lub w następstwie stresu oksydacyjnego**).

Wykazano, że w komórkach SH-SY5Y (ale nie w komórkach U87MG), HBITC wpływa na obniżenie poziom mitochondrialnej rodanazy i transferazy siarkowej 3-merkaptopirogronianu (MPST), co w konsekwencji prowadzi do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w tych komórkach. W komórkach SH-SY5Y stwierdzono także zmiany w poziomie białek cyklu komórkowego (p53 i p21). **Co jest interesujące, HBITC wpływa na obniżenie poziomu białka p53 w komórkach SH-SY5Y. Jest możliwe, że grupy tiolowe –SH znajdujące się na powierzchni białka p53 mogą być modyfikowane przez stres oksydacyjny, jaki jest indukowany w komórkach SH-SY5Y hodowanych w obecności HBITC, co prowadzi do spadku poziomu białka p53. Jest też możliwe, że inaktywacja białka p53 w komórkach SH-SY5Y może być związana z procesem S-sulfuracji grup tiolowych białka p53 przy jednocześnie zwiększonym poziomie  $H_2S$  i tiosiarczanu. Interesujące jest również to, że w komórkach SH-SY5Y, HBITC wpływa z kolei na wzrost poziomu białka p21. Jest możliwe, że indukcja białka p21 w komórkach SH-SY5Y odbywa się poprzez mechanizmy niezależne od białka p53.**

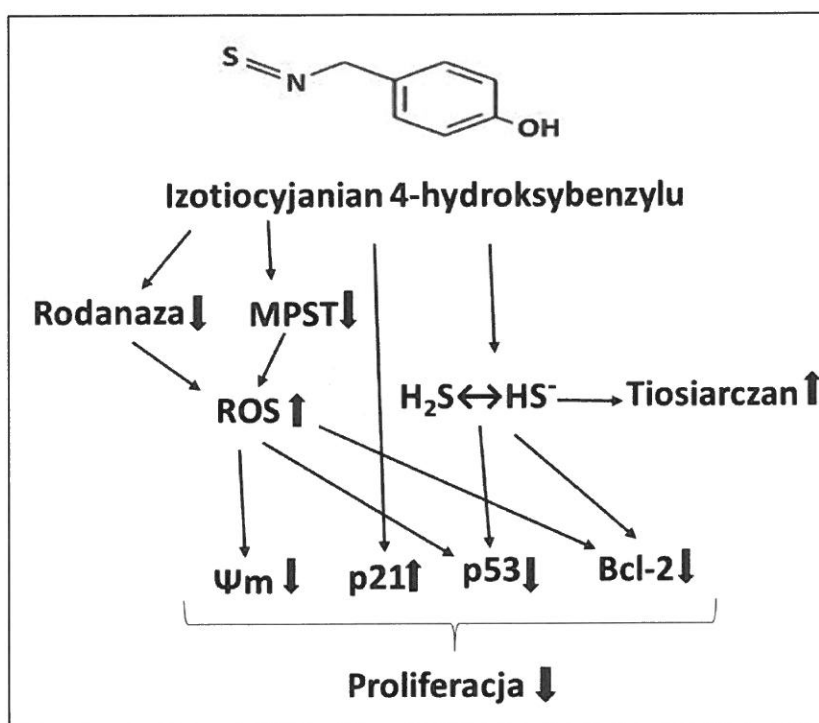
Opisane powyżej zmiany poziomu rodanazy i MPST, poziomu reaktywnych form tlenu i białek cyklu komórkowego zachodzące pod wpływem HBITC stwierdzono jedynie w komórkach SH-SY5Y. Może to być związane z tym, że jak wynika z naszych wcześniejszych badań, komórki SH-SY5Y mają niższy poziom GSH niż komórki U87MG (co zostało



przedstawione w **Publikacji 2** wchodzącej w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe (*Publikacja 2: Jurkowska i wsp. 2017 A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity. Amino Acids 49:1855–1866*). Z danych literaturowych wiadomo też, że komórki SH-SY5Y mają niższe mitochondrialne zdolności metaboliczne w porównaniu do komórek U87MG (Kim i wsp. 2015 *High-capacity glycolytic and mitochondrial oxidative metabolisms mediate the growth ability of glioblastoma. Int J Oncol 47:1009-1016*).

#### Rysunek 4. Antyproliferacyjne właściwości izotiocyjanianu 4-hydroksybenzylu

(Rysunek wg *Publikacji 3* zawartej w przedstawionym cyklu prac w pkt 4.2).



#### 4.3.4. Wnioski

Badania przeprowadzone w ramach przedstawionego tematu osiągnięcia naukowego: „Modulacja tlenowych i beztlenowych przemian L-cysteiny w hodowlach komórkowych”, pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Propargylglycyna, jako inhibitor  $\gamma$ -cystationazy, oprócz znanego dotychczas wpływu na procesy transsulfuracji oraz poziom H<sub>2</sub>S w komórkach, wpływa również na obniżenie poziomu produktów tlenowego szlaku przemian L-cysteiny – hipotauryny i tauryny w

komórkach wild-type (Cdo1<sup>+/+</sup>) hepatocytów. Wyniki te pokazują, że propargylglicyna hamuje również dekarboksylację kwasu cysteiniosulfonowego (**Publikacja 1**).

2. Propargylglicyna, poprzez hamowanie aktywności  $\gamma$ -cystationazy, ma wpływ na zwiększenie poziomu cystationiny, a w konsekwencji tego homocysteiny, przez co może nasilać alternatywne reakcje zachodzące z udziałem  $\beta$ -syntazy cystationinowej, np. [(1) Cysteina+Homocysteina $\rightarrow$ Cystationina+H<sub>2</sub>S; (2) Cysteina+Cysteina $\rightarrow$ Lantionina+H<sub>2</sub>S] w komórkach wild-type (Cdo1<sup>+/+</sup>) hepatocytów. Jednoczesne stymulowanie komórek propargylglicyną i prekursorami L-cysteiny (metioniną lub homocysteiną) wpływa również na zwiększenie całkowitego wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu. Badania dotyczące zmiany poziomu tych metabolitów, przeprowadzone po raz pierwszy zarówno w komórkach jak i jednocześnie w ich mediach hodowlanych, umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących przemiany L-cysteiny w komórkach. (**Publikacja 1**).
3. Trisiarczek diallilu (DATS) - naturalny donator siarki sulfanowej, składnik ekstraktu czosnku, poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu siarki sulfanowej i jednocześnie zwiększenie aktywności enzymów biorących udział w powstawaniu (MPST) i przenoszeniu (rodanaza) siarki sulfanowej, wpływa na nasilenie desulfuracyjnych przemian L-cysteiny w komórkach nowotworowych U87MG (glioblastoma ludzka) (**Publikacja 2**).
4. Trisiarczek diallilu (**Publikacja 2**) oraz izotiocyjanian 4-hydroksybenzylu (HBITC, naturalny donator H<sub>2</sub>S otrzymywany z gorczycy białej) (**Publikacja 3**), mają wpływ na hamowanie proliferacji komórek nowotworowych U87MG i SH-SY5Y (neuroblastoma ludzka) co skorelowane jest ze zwiększeniem się liczby komórek mających nieaktywną formę antyapoptotycznego białka Bcl-2. Inaktywacja białka Bcl-2 w komórkach może być związana z procesem S-sulfuracji - tworzenia nadsiarczków (przemawia za tym zaobserwowany wzrost poziomu siarki sulfanowej (**Publikacja 2**) oraz tiosiarczanu (**Publikacja 3**)).
5. W komórkach nowotworowych SH-SY5Y zawierających niewielkie ilości L-cysteiny, inaktywacja białka Bcl-2 w obecności DATS (**Publikacja 2**) lub HBITC (**Publikacja 3**)

może być też związana z większym tworzeniem się reaktywnych form tlenu w tych komórkach.

6. W komórkach SH-SY5Y hodowanych w obecności HBITC, wzrost produkcji reaktywnych form tlenu lub nasiloną syntezą  $H_2S$ /tiosiarczanu, może prowadzić do inaktywacji białka p53 - możliwa jest inaktywacja grup tiolowych -SH znajdujących się na powierzchni tego białka. Interesujące jest też to, że poziom białka p21 w tych komórkach ulega jednocześnie zwiększeniu - możliwa jest zatem indukcja białka p21 w komórkach SH-SY5Y przez p53-niezależne mechanizmy (*Publikacja 3*).

Podsumowując, możemy powiedzieć, że stosowanie propargylglicyny (związek hamujący nie tylko  $\gamma$ -cystationazę, ale też tlenowe przemiany L-cysteiny), prekursorów L-cysteiny (metionina, homocysteina) oraz naturalnych donorów siarki (trisiarczek diallilu, izotiocyjanian 4-hydroksybenzylu) ma istotny wpływ na nasilenie tempa desulfuracyjnych przemian L-cysteiny w komórkach. Efekt działania tych związków jest wielokierunkowy – od zmian poziomu metabolitów (hipotauryny, tauryny, cystationiny, homocysteiny, glutationu) do wpływu na proliferację i stan oksydacyjny komórek (poprzez zmianę poziomu:  $H_2S$ , tiosiarczanu, siarki sulfanowej, transferaz siarkowych oraz białek cyklu komórkowego i białka Bcl-2). A zatem modulowanie poziomem L-cysteiny w komórkach może nieść dodatkowe możliwości terapeutyczne.

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

### 5.1. Realizowane projekty badawcze

Prowadzone przeze mnie badania realizowane były w ramach projektów naukowych:

- a) udział w realizacji 11 projektów badawczych otrzymanych z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji na działalność statutową i projekty celowe, a realizowanych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej UJ CM. W pięciu z nich byłam/jestem kierownikiem i jednocześnie głównym wykonawcą (*szczegółowy wykaz tych projektów przedstawiałam w Załączniku 3, pkt II.1, poz. 1-11*).

**b) udział w realizacji projektu otrzymanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Mobilność Plus”:**

Tytuł projektu: ‘Desulfuracyjne przemiany cysteiny w warunkach braku jej utleniania z powodu genetycznie uwarunkowanego niedoboru dioksygenazy cysteinowej. Stan zapalny a siarkowodór’ (byłam kierownikiem tego projektu oraz głównym wykonawcą).

Projekt ten realizowałam na Uniwersytecie Cornella w Ithaca (NY, USA), w latach 2012-2013, w trakcie mojego pobytu na stypendium.

**5.2. Współpraca z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.**

Realizując wymienione w *Załączniku 3 (w pkt II.I)* projekty, współpracowałam z:

a) z innymi jednostkami Collegium Medicum UJ:

- Katedrą Histologii
- Katedrą Immunologii
- Zakładem Biologii Rozwoju Człowieka
- Katedrą Patomorfologii

b) z Katedrą i Zakładem Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,

c) z ośrodkami zagranicznymi:

- Nippon Medical School, Department of Environmental Medicine, Tokio, Japonia
- University of Wisconsin, School of Pharmacy, Madison, USA

**5.3. Zdobyte umiejętności metodyczne w pracy laboratoryjnej.**

Prowadząc badania naukowe w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej UJ CM pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Marii Wróbel, oraz podczas mojego 2-letniego pobytu na Uniwersytecie Cornella, a także uczestnicząc w krajowych kursach i seminariach (*szczegółowy wykaz szkoleń przedstawiłam w Załączniku 3, pkt III.Q*) regularnie poszerzałam swoje umiejętności zarówno w zakresie posługiwania się różnymi metodami jak i dokonywania analizy i interpretacji wyników badań. Wykonywałam metody badawcze obejmujące:

a) prowadzenie hodowli komórkowych:

- hodowle ustalonych linii komórkowych,
- hodowle pierwotne: izolowanie astrocytów z kory mózgowej osesków mysich; izolowanie hepatocytów z wątroby myszy,

- b) badanie cytotoksyczności,
- c) badanie proliferacji komórek (test BrdU, metoda filetu krystalicznego i MTT),
- d) badanie procesu apoptozy i stresu oksydacyjnego,
- e) transfekcję komórek,
- f) liczne oznaczenia biochemiczne (badanie aktywności enzymów, poziomu siarki sulfanowej, tiosiarczanu, siarkowodoru, oraz niebiałkowych tioli- metoda HPLC),
- g) techniki molekularne (Western Blot, izolacja DNA i RNA, RT-PCR, Real-Time PCR),
- h) badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

#### 5.4. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Moje zainteresowania biologiczne realizowałam na kierunku biologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ uzyskując w czerwcu 2000 roku tytuł magistra biologii ze specjalnością biologia molekularna. Pracę magisterską zatytułowaną „Wpływ taksolu na żywotność i proliferację ludzkich komórek nowotworowych: A549 i U373” wykonałam w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej UJ pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Andrzeja Kleina. Praca magisterska i egzamin magisterski ocenione zostały na ocenę bardzo dobrą, a uzyskana w trakcie studiów wysoka średnia ocen pozwoliła mi na ukończenie studiów z wyróżnieniem. W 2000 roku ukończyłam też z wynikiem bardzo dobrym 2-letnie Studium Pedagogiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, co dało mi jednocześnie dobre przygotowanie do pracy dydaktycznej.

W trakcie studiów na kierunku biologia, napisałam pierwszą pracę popularno-naukową pod kierunkiem Prof. dr hab. Anny Lityńskiej z Zakładu Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego (obecnie Zakład Biochemii Glikokoniugatów UJ). Praca ta opisuje funkcje, jakie pełnią białka adhezyjne – kadheryny:

- 1) **Jurkowska H., Lityńska A. (2000) Kadheryny – białka o wielu funkcjach. Wszechświat, 101: 167-17.**

W 2000r rozpoczęłam pracę na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej, kierowanym przez Panią Prof. dr hab. Marię Wróbel, gdzie od początku mojej pracy do chwili obecnej prowadzę badania naukowe dotyczące metabolizmu L-cysteiny w tkankach ssaków oraz w hodowlach komórkowych. W zespole kierowanym przez Panią Prof. dr hab. Marię Wróbel od wielu lat kontynuowane są badania, pionierami których byli uznani Profesorowie - Aleksander Koj,

który był moim wykładowcą i nauczycielem biochemii w trakcie studiów, oraz Profesor Julian Frendo, który był kierownikiem zespołu zajmującego się badaniami metabolizmu L-cysteiny w organizmach w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej UJ CM.

W pierwszych dwóch latach mojej pracy w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej UJ CM uczestniczyłam w badaniach, których wyniki przedstawiono w publikacji dotyczącej modyfikacji metody oznaczania aktywności  $\gamma$ -cystationazy - enzymu uczestniczącego w desulfuracyjnych przemianach L-cysteiny; z metody tej korzystamy do dziś w wielu realizowanych przez nas projektach:

- 1) Czubak J., Wróbel M., **Jurkowska H.** (2002) *Cystathionine  $\gamma$ -lyase (EC 4.4.1.1): an enzymatic assay of  $\alpha$ -ketobutyrate using lactate dehydrogenase. Acta Biol. Crac., Ser. Zool., 44: 113-117.*

Uczestniczyłam w badaniach dotyczących roli siarki sulfanowej oraz transferaz siarkowych w procesach detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych zachodzących w organizmach zwierząt (badania dotyczące wpływu cyjanku, nitroprusydku sodu i aspiryny na aktywność rodanazy, MPST,  $\gamma$ -cystationazy oraz na poziom siarki sulfanowej w tkankach myszy). Badania prowadzone były we współpracy z Zakładem Biologii Rozwoju Człowieka UJ CM. Wyniki badań dotyczących tego tematu zostały opublikowane w pracach:

- 1) Wróbel M., **Jurkowska H.**, Śliwa L., Srebro Z. (2004) *Sulfurtransferases and cyanide detoxification in mouse liver, kidney and brain. Toxicol. Mech. Metod., 14, 331-337.*
- 2) Wróbel M., Góralska J., **Jurkowska H.**, Sura P (2017) *Similar effect of sodium nitroprusside and acetylsalicylic acid on antioxidant system improvement in mouse liver but not in the brain. Biochimie 135: 181-185.*

Wyniki tych badań prezentowane były również na konferencji polskiej (1 streszczenie zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz.2) i konferencji o zasięgu międzynarodowym (1 streszczenia zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz.12).

Uczestniczyłam w badaniach dotyczących rozmieszczenia i aktywności transferaz siarkowych oraz poziomu siarki sulfanowej w różnych regionach mózgu myszy oraz mózgu ludzkiego. Badania te prowadzone były we współpracy z Zakładem Neuropatologii Katedry Patomorfologii UJ CM oraz z Zakładem Biologii Rozwoju Człowieka UJ CM. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach:

- 1) Wróbel M., Czubak J., Srebro Z., **Jurkowska H.** (2006) Rhodanese in mouse brain: regional differences and their metabolic implications. *Toxicol. Mech. Metod.*, 16, 169-172.
- 2) Wróbel M, Czubak J, Bronowicka-Adamska P, **Jurkowska H**, Adamek D, Papla B (2014) Is development of high-grade gliomas sulfur-dependent? *Molecules* 19:21350-21362.

Wyniki tych badań prezentowane były również na konferencjach polskich (2 streszczenie zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz.3, 4) i konferencjach o zasięgu międzynarodowym (2 streszczenia zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz.1, 5).

Uczestniczyłam w realizacji projektów (Załącznik 3, pkt. II.I, poz.2, 4) obejmujących badania dotyczące powstawania i przemian związków siarki w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Zbadano m.in wpływ menadionu (witaminy K3) na przeżywalność komórek nowotworowych U373 (astrocytoma ludzka) oraz jednocześnie na poziom siarki sulfanowej, glutationu i na aktywność transferaz siarkowych (rodanazy i MPST) w tych komórkach. Wyniki badań dotyczących menadionu zostały przedstawione w pracy:

- 1) Wróbel M., **Jurkowska H.** (2007) Menadione effect on L-cysteine desulfuration in U373 cells. *Acta Biochim. Pol.*, 54, 407-411.

Wyniki dotyczące menadionu prezentowane były również na konferencji polskiej (1 streszczenie zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz.10).

Zbadano również ekspresję i aktywność MPST oraz  $\gamma$ -cystationazy, a także poziom niebiałkowych tioli (L-cysteiny, L-cystyny, GSH, GSSG) i cystationiny w ludzkich komórkach nowotworowych melanomy (A375, WM35). Wyniki te zostały przedstawione w pracy:

- 1) **Jurkowska H.**, Placha W., Nagahara N., Wróbel M. (2011) The expression and activity of cystathionine- $\gamma$ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines. *Amino Acids*, 41: 151-158.

W ramach tych projektów (Załącznik 3, pkt. II.I, poz.2, 4) realizowałam również badania, które stały się podstawą mojej pracy doktorskiej (wyniki opisałam poniżej w pkt 5.5).



### 5.5. Tematyka badań obejmująca zagadnienia dotyczące pracy doktorskiej

Celem badań objętych tematem mojej pracy doktorskiej: „Wpływ desulfuracyjnych przemian cysteiny na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek mózgu.”, było określenie zależności między poziomem siarki sulfanowej, ekspresją genów i aktywnością enzymów uczestniczących w jej powstawaniu i przemianach oraz proliferacją komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe charakteryzują się niskim poziomem siarki sulfanowej w porównaniu do komórek prawidłowych. Interesujące wydawało się sprawdzenie czy zwiększając w komórkach nowotworowych poziom siarki sulfanowej można zahamować ich proliferację. W tym celu hodowano komórki w obecności dwóch prekursorów L-cysteiny - N-acetylocysteiny (NAC) i kwasu 2(R,S)-D-rybo-(1',2',3',4'-tetrahydroksybutyl)tiazolidyno-4(R)-karboksylowego (rybozocysteina, RybCys - związek ten otrzymaliśmy od Profesor Jeanette C. Roberts z University of Wisconsin, School of Pharmacy, Madison, USA). Badano także wpływ cystationiny na poziom niebiałkowych tioli i proliferację komórek.

Badania prowadzono w astrocytach izolowanych z kory mózgowej jednodniowych osesków mysich i komórkach nowotworowych U373 (astrocytoma ludzka). W celu potwierdzenia ustalonej dla komórek U373 zależności między poziomem siarki sulfanowej a proliferacją, część doświadczeń prowadzona była w komórkach SH-SY5Y (neuroblastoma ludzka). W komórkach oznaczano aktywność transferaz siarkowych, oraz poziom siarki sulfanowej i niskocząsteczkowych związków siarki. Badanie desulfuracyjnych przemian L-cysteiny i wpływu prekursorów L-cysteiny na te przemiany oraz na ekspresję genów kodujących MPST i CTH w komórkach astrocytów, oraz w komórkach U373 i SH-SY5Y przeprowadzono, jak wynika z dostępnej literatury, po raz pierwszy. Brak było także doniesień dotyczących wpływu prekursorów L-cysteiny na proliferację tych komórek.

Przeprowadzenie badań ekspresji genu MPST w tych komórkach było możliwe dzięki współpracy z Dr Noriyuki Nagahara (Nippon Medical School, Department of Environmental Medicine w Tokio) - cenionym ekspertem w zakresie badań MPST, od którego otrzymaliśmy pierwsze primery dla tego genu.

Wykazano, że w badanych komórkach główną drogą tworzenia związków zawierających siarkę sulfanową są reakcje z udziałem MPST. W astrocytach mysich brak jest aktywności CTH, a w komórkach U373 jej aktywność jest śladowa. Badania na poziomie ekspresji genu wykazały, że zarówno w astrocytach mysich, jak i komórkach U373 i SH-SY5Y zachodzi ekspresja genu kodującego MPST i CTH. Wykazano, że w komórkach SH-SY5Y ekspresja i aktywność MPST jest wyższa niż w komórkach U373. Oznaczono również poziomu glutationu, L-cysteiny oraz cystationiny w astrocytach mysich i komórkach U373. Wykazano,



że intensywność przemian L-cysteiny z udziałem MPST i poziom siarki sulfanowej są niższe w komórkach nowotworowych aniżeli w komórkach prawidłowych.

Uzyskane wyniki pokazały również istnienie zależności między aktywnością MPST, poziomem siarki sulfanowej a proliferacją komórek nowotworowych U373 i SH-SY5Y. N-acetylocysteina w komórkach U373 i SH-SY5Y oraz rybozocysteina w komórkach U373 wpływają na zwiększenie aktywności MPST i zwiększenie poziomu siarki sulfanowej, czemu towarzyszy hamowanie proliferacji komórek. Ustalono warunki hodowli, w których w obecności NAC hamowana jest proliferacja komórek astrocytomy U373, ale nie zmienia się proliferacja astrocytów.

Wykazano, że NAC i RybCys wpływają na zwiększenie poziomu glutationu w komórkach U373. RybCys ma wpływ również na wzrost aktywności rodanazy w komórkach U373 z równoczesnym wzrostem całkowitej ilości białka, co sugeruje, że może ona nasilać syntezę różnych białek w komórkach.

Wykazano także, że dodanie cystationiny do medium hodowlanego wpływa na stymulację proliferacji komórek nowotworowych U373.

**Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że niski poziom siarki sulfanowej w komórkach nowotworowych ma istotne znaczenie dla ich proliferacji oraz, że hamowanie proliferacji związane jest nie tylko ze wzrostem komórkowego poziomu siarki sulfanowej, ale również ze wzrostem aktywności MPST i/ lub rodanazy.**

**Wyniki badań przedstawione w mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Wpływ desulfuracyjnych przemian cysteiny na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek mózgu (Jurkowska H, promotor Wróbel M, Kraków 2008)”, zostały opublikowane w kolejnych latach w pracach:**

- 1) **Jurkowska H., Wróbel M., (2008) N-acetyl-L-cysteine as a source of sulfane sulfur in astrocytoma and astrocyte cultures: correlations with cell proliferation. *Amino Acids*, 34: 231–237.**
- 2) **Jurkowska H., Uchacz T., Roberts J., Wróbel M. (2011) Potential therapeutic advantage of ribose-cysteine in the inhibition of astrocytoma cell proliferation. *Amino Acids*, 41: 131-139.**
- 3) **Jurkowska H., Placha W., Nagahara N., Wróbel M. (2011) The expression and activity of cystathionine-γ-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines. *Amino Acids*, 41: 151-158.**

- 4) **Jurkowska H, Wróbel M (2018)** Cystathionine promotes the proliferation of human astrocytoma U373 cells. *Anticancer Res.*, 38(6): 3501-3505.
- 5) **Jurkowska H, Wróbel M (2018)** Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation by N-acetyl-L-cysteine as a result of increased sulfane sulfur level. *Anticancer Res.*, *Anticancer Res.*, 38(9): 5109-5113.

Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej prezentowane były również na konferencjach polskich (4 streszczenia zjazdowe- *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.8, 13, 14, 17*) oraz konferencjach o zasięgu międzynarodowym (4 streszczenia zjazdowe- *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.6, 7, 9, 26*).

### **5.6. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych**

Po uzyskanie stopnia doktora w latach 2008-2018 kontynuowałam i prowadzę do chwili obecnej badania dotyczące metabolizmu L-cysteiny. W latach 2012-2013, badania dotyczące metabolizmu L-cysteiny prowadziłam na Uniwersytecie Cornella w USA (podczas mojego pobytu na stypendium) w zespole kierowanym przez Profesor Martę H. Stipanuk – uznanego eksperta w dziedzinie badań metabolizmu L-cysteiny. Po powrocie do kraju, poza badaniami realizowanymi w ramach moich projektów (*Załącznik 3, pkt. II.I, poz. 10, 11*), prowadzę też badania we współpracy z Katedrą Histologii oraz z Katedrą Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, a także z Zakładem Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

### **Szczegółowy opis działalności naukowej po doktoracie (poza osiągnięciem naukowym przedstawionym w pkt 4.3.):**

Uczestniczyłam w przygotowaniu dwóch prac przeglądowych, w których zamieszczone zostały najważniejsze aktualne dane literaturowe na temat budowy i funkcji badanych przez nas transferaz siarkowych - rodanazy, transferazy siarkowej 3-merkaptopirogronianu i  $\gamma$ -cystationazy. Prace te zostały napisane w języku polskim z myślą głównie o studentach czy przyszłych magistrantach, gdyż mało jest prac przeglądowych w polskim piśmiennictwie odnośnie tematyki desulfuracyjnych przemian L-cysteiny:

- 1) **Wróbel M, Jurkowska H, Kaczor M, Uchacz T (2012)** Rodanaza i transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu - enzymy pokrewne ewolucyjnie. *Kosmos (Warsz.)*, 61: 233-244.

- 2) **Jurkowska H**, Kaczor-Kamińska M, Bronowicka-Adamska P, Wróbel M (2014) *Liaza cystationinowa. Postępy Hig. Med. Dośw.* 68:1-9.

Uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w Katedrze Histologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum - badanie ekspresji białka Bcl-2 w liniach komórkowych ludzkiej białaczki (HL60 i U937) hodowanych w obecności etopozydu, trichostatyny A i kwasu walproinowego. Wyniki badań dotyczących tego tematu zostały opublikowane w pracy:

- 1) Jasek E, Lis GJ, Jasińska M, **Jurkowska H**, Litwin JA (2012) *Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on etoposide-induced apoptosis in leukemia cells. Anticancer Res.*, 32: 2791-2799.

W ramach projektów otrzymanych z MNiSW w ramach dotacji na działalność statutową (Załącznik 3, pkt. II.I, poz. 6, 9, 10), jako kierownik projektu i główny wykonawca, prowadziłam badania, wyniki których zostały przedstawione w **Publikacji 2** (**Jurkowska H**, Wróbel M, Kaczor-Kamińska M, Jasek-Gajda E (2017) *A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity. Amino Acids*, 49(11): 1855-1866) i w **Publikacji 3** (**Jurkowska H**, Wróbel M, Szlęzak D, Jasek-Gajda E (2018) *New aspects of antiproliferative activity of 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, a natural H<sub>2</sub>S-donor. Amino Acids*, 50(6): 699-709) stanowiących moje osiągnięcie naukowe (**opis tych prac w pkt 4.3.3**). Wyniki tych badań prezentowane były również na konferencjach krajowych (2 streszczenia zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz. 19, 20) i konferencjach o zasięgu międzynarodowym (4 streszczenia zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz. 15, 21, 22, 31).

W ramach projektu statutowego (Załącznik 3, pkt. II.I, poz. 9), poza badaniami przedstawionymi w moim osiągnięciu naukowym (w Publikacji 2, pkt 4.3.3), prowadziłam także badania dotyczące wpływu kurkuminy na proliferację i desulfuracyjne przemiany L-cysteiny w komórkach nowotworowych. Stwierdzono, że kurkumina wpływa na hamowanie proliferacji ludzkich komórek glioblastomy (U87MG), oraz wykazuje właściwości antyoksydacyjne, o czym świadczy wzrost poziomu glutationu i cystationiny w tych komórkach. Wyniki tych badań prezentowane były na konferencjach polskich (2 streszczenia zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz. 19, 20) i konferencji o zasięgu międzynarodowym (1 streszczenie zjazdowe- Załącznik 3, pkt. III.B, poz. 22).

W latach 2012-2013 w ramach stypendium z programu Mobilność Plus, na Uniwersytecie Cornella realizowałam projekt: „Desulfuracyjne przemiany cysteiny w warunkach braku jej utleniania z powodu genetycznie uwarunkowanego niedoboru dioksygenazy cysteinowej. Stan zapalny a siarkowodór”. Część badań dotyczących realizacji tego projektu przedstawiłam w moim osiągnięciu naukowym w **Publikacja 1, w pkt. 4.3.3** (*Jurkowska H, Stipanuk MH, Hirschberger LL, Roman HB. (2015) Propargylglycine inhibits hypotaurine/taurine synthesis and elevates cystathionine and homocysteine concentrations in primary mouse hepatocytes. Amino Acids 47:1215-1223*). Wyniki badań dotyczących tego tematu prezentowane były również na konferencji „XIX International Taurine Meeting” w Krakowie (2014r) - *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.24*.

W ramach projektu stypendialnego, który realizowałam na Uniwersytecie Cornella, powstała też druga publikacja, dzięki współpracy z naukowcami z Uniwersytetu w Tokyo (zsyntezowali oni próbę fluorescencyjną, co pozwoliło na oznaczenie poziomu H<sub>2</sub>S w izolowanych hepatocytach) i z Uniwersytetu Karola w Pradze - Pierwszego Wydziału Lekarskiego i Ogólnego Szpitala Uniwersyteckiego (dzięki którym możliwe było oznaczenie poziomu lantioniny). Badania wykonywane były na komórkach hepatocytów izolowanych z myszy Cdo1<sup>+/+</sup> i Cdo1<sup>-/-</sup>, oraz częściowo na komórkach HEK-293T (linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerek). Komórki HEK-293T, które są dobrym modelem do transfekcji zostały użyte w celu sprawdzenia skuteczności działania próby fluorescencyjnej HSip-1 do detekcji H<sub>2</sub>S - czy będzie można użyć jej w dalszej kolejności do określenia produkcji H<sub>2</sub>S w komórkach hepatocytów.

W hepatocytach izolowanych z myszy Cdo1<sup>+/+</sup> oraz Cdo1<sup>-/-</sup> wykonano badania porównawcze dotyczące - poziomu H<sub>2</sub>S i tiosiarczanu; poziomu L-cysteiny, cystationiny i lantioniny; poziomu białek i aktywności enzymów zaangażowanych w produkcję H<sub>2</sub>S (CTH, CBS, MPST) oraz jego katabolizm (reduktaza siarczkowo-chinonowa SQRDL, dioksygenaza siarczkowa ETHE1, rodanaza). Zbadano także wpływ propargylglicyny na produkcję H<sub>2</sub>S i tiosiarczanu oraz na poziom L-cysteiny w hepatocytach izolowanych z obu genotypów myszy. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

1. *Jurkowska H, Roman HB, Hirschberger LL, Sasakura K, Nagano T, Hanaoka K, Krijt J, Stipanuk MH (2014) Primary hepatocytes from mice lacking cysteine dioxygenase show increased cysteine concentrations and higher rates of metabolism of cysteine to hydrogen sulfide and thiosulfate. Amino Acids 46:1353-65.*

W pracy tej wykazano m.in., że propargylglycyna, mimo że jest inhibitorem reakcji katalizowanej przez CTH, to wbrew oczekiwaniom wcale nie wpływa na zmniejszenie poziomu L-cysteiny w komórkach Cdo1<sup>+/+</sup>, a wręcz przeciwnie - poziom L-cysteiny wzrasta w nich dwukrotnie (nie stwierdzono tego w przypadku Cdo1<sup>-/-</sup> hepatocytów). To intrygujące spostrzeżenie stało się podstawą do badań dotyczących wpływu propargylglycyny na tlenowe przemiany L-cysteiny i ewentualne możliwe tego konsekwencje, co zostało przedstawione w Publikacji 1 (pkt 4.3.3) stanowiącej moje osiągnięcie naukowe.

Wyniki badań prowadzonych w ramach projektu stypendialnego prezentowane były również na konferencji „Joint Annual Meeting of the ASPET/BPS at Experimental Biology (EBConference)” w Bostonie (2013r) - *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.23.*

Podczas pobytu na Uniwersytecie Cornella, uczestniczyłam także w badaniach prowadzonych przez Profesor Martę H Stipanuk, które dotyczyły regulacji metabolizmu tauryny. Badania prowadzono w tkankach wątroby pochodzących z myszy (samce i samice) Cdo1<sup>+/+</sup> i Cdo1<sup>-/-</sup> podzielonych na różne grupy doświadczalne: myszy kontrolne; myszy z dietą wysokotłuszczową; oraz myszy z dietą wysokotłuszczową, którym podawano jednocześnie taurynę. Model doświadczalny stanowiły też pierwotne hepatocyty izolowane z myszy (samce i samice) Cdo1<sup>+/+</sup> i Cdo1<sup>-/-</sup>, które hodowano w obecności ustalonych niecytotoksycznych stężeń tauryny (0.05 mM, 0.5 mM tauryna). W tych wymienionych modelach doświadczalnych zbadano m.in. czy dieta wysokotłuszczowa oraz suplementacja tauryną mają wpływ na zmiany poziomu hipotauryny/tauryny oraz na ekspresję i poziom białek związanych z metabolizmem aminokwasów siarkowych i kwasów żółciowych: CSAD (dekarboksylaza kwasu L-cysteinosulfonowego, enzym uczestniczący w produkcji hipotauryny), BHMT (metylotransferaza betaino-homocysteinowej, enzym uczestniczący w remetylacji metioniny), OSTβ (organiczny transporter substancji rozpuszczonych i związków steroidowych), cytochromy P450 - CYP7A1 (7α-hydroksylaza cholesterolowa), CYP27A1 i CYP3A11. Wyniki badań dotyczących tego tematu zostały opublikowane w pracach:

- 1) *Stipanuk MH, Jurkowska H, Roman HB, Niewiadomski J, Hirschberger LL (2015) Insights into Taurine Synthesis and Function Based on Studies with Cysteine Dioxygenase (CDO1) Knockout Mice. Adv. Exp. Med. Biol. 803:29-39.*
- 2) *Jurkowska H, Niewiadomski J, Hirschberger LL, Roman HB, Mazor KM, Liu X, Locasale JW, Park E, Stipanuk MH (2016) Downregulation of hepatic betaine:homocysteine methyltransferase (BHMT) expression in taurine-deficient mice is reversed by taurine supplementation in vivo. Amino Acids 48:665-676.*

- 3) *Stipanuk MH, Jurkowska H, Niewiadomski J, Mazor KM, Roman HB, Hirschberger LL (2017) Identification of taurine-responsive genes in murine liver using the Cdo1-null mouse model. Adv. Exp. Med. Biol., 975: 475-495.*

Wyniki tych badań prezentowane były również na „XIX International Taurine Meeting” w Krakowie (2014r) - *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.25.*

Po powrocie do kraju, poza badaniami które realizowałam w ramach projektu statutowego (*Załącznik 3, pkt II.I, poz.10*) - wyniki stanowiące część mojego osiągnięcia naukowego i opisane w pkt 4.3.3 (Publikacja 2 i 3), uczestniczyłam w badaniach prowadzonych we współpracy z Katedrą i Zakładem Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Wykonałam oznaczenia poziomu tiosiarczanu i siarki sulfanowej w osoczu krwi obwodowej i żyłnej szczurów (w próbkach kontrolnych i po stymulacji Na<sub>2</sub>S lub neomycyną); zbadałam również ekspresję genu rodanazy, MPST, CTH i CBS w wątrobach szczurzych (w grupie szczurów zdrowych oraz z marskością wątroby). Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach:

- 1) *Tomasova L, Dobrowolski L, Jurkowska H, Wróbel M, Huc T, Ondrias K, Ostaszewski R, Ufnal M (2016) Intracolonic hydrogen sulfide lowers blood pressure in rats. Nitric Oxide 60:50-58.*
- 2) *Tomasova L, Drapala A, Jurkowska H, Wróbel M, Ufnal M (2017) Na<sub>2</sub>S, a fast-releasing H<sub>2</sub>S donor, given as suppository lowers blood pressure in rats. Pharmacol. Rep. 69: 971-977.*
- 3) *Huc T, Jurkowska H, Wróbel M, Jaworska K, Onyszkiewicz M, Ufnal M. Colonic hydrogen sulfide produces portal hypertension and systemic hypotension in rats (2018) Exp Biol Medicine (Maywood, N.J.), 243: 96-106.*

Wyniki tych badań prezentowane były również na konferencji „Joint Meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society” w Irlandii (2016r) - *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.27*, oraz na konferencji „Experimental Biology Meeting” w San Diego (2018r) - *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.32.*

W ramach współpracy z Katedrą Immunologii UJ CM, uczestniczyłam w badaniu ekspresji transferaz siarkowych ( $\gamma$ -cystationazy, MPST i  $\beta$ -syntazy cystationinowej) w makrofagach mysich J774A.1 stymulowanych INF- $\gamma$  oraz lipopolisacharydem. Wyniki tych badań prezentowane były na konferencji „4th International Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide” we Włoszech (2016r)- *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.28*, na konferencji Eurobiotech „6th



Central European Congress of Life Science” w Krakowie (2017r)- *Załącznik 3, pkt. III.B, poz.30*, oraz aktualnie wysłana jest publikacja do czasopisma *Immunologic Research*:

- 1) Bronowicka-Adamska P, **Jurkowska H**, Gawda A, Skalska P, Marcinkiewicz J, Wróbel M. *Expression and activity of hydrogen sulfide generating enzymes in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-γ. Immunologic Research.*

Obecnie realizuję projekt (*Załącznik 3, pkt II.I, poz. 11*) – „Modulacja przemian L-cysteiny w komórkach nowotworowych mózgu o różnym stopniu złośliwości”. Celem projektu jest poznanie, jak wraz ze wzrostem stopnia złośliwości ludzkich komórek nowotworowych mózgu: 1321N1 (astrocytoma, II stopień złośliwości) oraz T98G (glioblastoma multiforme, IV stopień złośliwości), zmienia się zarówno tlenowy, jak i beztlenowy metabolizm L-cysteiny i jak skutecznie można go regulować, aby mieć wpływ na stan oksydacyjny, proliferację i stopień złośliwości badanych komórek nowotworowych.

## 5.7. Podsumowanie całego dorobku naukowego

### a) 22 prace oryginalne:

- w tym 10 prac, w których jestem pierwszym autorem, oraz jednocześnie w 5-ciu z nich jestem także autorem korespondencyjnym;
- w pozostałych 12 pracach, 5-krotnie jestem w nich wymieniona jako drugi autor;

### b) 2 prace przeglądowe (w tym 1 praca, w których jestem pierwszym autorem);

### c) 1 praca popularno-naukowa (w której jestem pierwszym autorem);

### c) 32 streszczenia zjazdowe (w tym 16, w których jestem pierwszym autorem);

- wśród tych 32 streszczeń zjazdowych, 19 z nich to streszczenia zjazdowe o zasięgu międzynarodowym oraz 13 to streszczenia zjazdowe polskie.

(szczegółowy wykaz prac oraz streszczeń zjazdowych podano w *Załączniku 3, pkt I.B, II.A, II.D, III.B*).

**Całkowita punktacja wynosi** (zgodnie z analizą bibliometryczną (*Załącznik 4B*) przygotowaną przez Bibliotekę Medyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z dnia 24 września 2018r.):

**Impact Factor: 52.952**

**Punktacja MNiSW: 515**

**Współczynnik Hirscha: 7**

**Liczba cytowań: 155, w tym bez autocytacji: 130**



### 5.8. Recenzowane prace

- a) jestem recenzentem jednej pracy licencjackiej (*szczegóły w Załączniku 3, pkt III.J*).
- b) jestem recenzentem prac eksperymentalnych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym na zaproszenie Redakcji: dwóch prac oryginalnych w czasopiśmie Cancer Chemotherapy and Pharmacology (IF: 2.808) oraz dwóch prac oryginalnych w czasopiśmie OncoTargets and Therapy (IF: 2.656) (*szczegóły w Załączniku 3, pkt III.P*).

### 5.9. Działalność dydaktyczna

#### Zajęcia dydaktyczne

Od początku swego zatrudnienia (od 2000 r do chwili obecnej), najpierw jako asystent naukowo-dydaktyczny, a następnie jako adiunkt, prowadzę zajęcia dydaktyczne – seminaria (konwersatoria) i ćwiczenia z zakresu chemii, biochemii, genetyki/biologii molekularnej – ze studentami Wydziału Lekarskiego UJ CM: studentami II roku kierunku lekarsko-dentystycznego (w ramach kursu „Biochemia z elementami chemii”), III roku kierunku lekarsko-dentystycznego (w ramach kursu „Biochemia jamy ustnej”), I roku kierunku lekarskiego (w ramach kursu „Biochemia z elementami chemii”), III roku kierunku lekarskiego (w ramach kursu „Zajęcia zintegrowane z Biochemii w ramach Chirurgii”). (*szczegóły w Załączniku 3, pkt . III.I*).

Od 2014r prowadzę w języku angielskim zajęcia seminaryjne i ćwiczeniowe z zakresu biochemii i genetyki/biologii molekularnej ze studentami Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców Collegium Medicum UJ.

Prowadziłam także zajęcia ćwiczeniowe z biochemii ze studentami II roku kierunku dietetyka (w ramach kursu „Biochemia Ogólna i Żywienia”) i ze studentami kierunku farmacja (w ramach kursu „Biochemia”), oraz zajęcia seminaryjne z biochemii ze studentami Zawodowych Studiów Podyplomowych w zakresie Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej UJ CM (w ramach kursu „Biochemia”). (*szczegóły w Załączniku 3, pkt . III.I*).

Prowadzone przeze mnie zajęcia dydaktyczne oceniane są bardzo wysoko w ankietach studenckich. W roku akademickim 2016/2017 uzyskałam w ramach tzw. ankiety ciągłej średnią 4.86 (średnia z 267 odpowiedzi uczestników zajęć), a w ubiegłym roku akademickim

2017/2018 uzyskałam w ramach tej ankiety ocenę 5.0 (średnia z 53 odpowiedzi uczestników zajęć).

**Opracowanie ćwiczeń laboratoryjnych (metody + instrukcje)** dla studentów II i III roku kierunku lekarsko-dentystycznego Wydziału Lekarskiego UJ CM, w ramach kursów „Biochemia z elementami chemii” i „Biochemia jamy ustnej”. (szczegółowy wykaz w Załączniku 3, pkt. III.I).

**Opieka nad realizacją prac magisterskich** wykonywanych w Zakładzie Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Lekarskiej UJ CM pod kierunkiem promotora Pani Prof. dr hab. Marii Wróbel - studenci Wydziału Chemii UJ o specjalności Chemia Biologiczna (jeden magistrant w roku akademickim 2003/2004r, jeden magistrant w roku akademickim 2004/2005r, jeden magistrant w roku akademickim 2008/2009) **oraz doktorskich** (jeden doktorant w latach 2010-2014) (szczegóły w Załączniku 3, pkt. III.J, K).

#### 5.10. Inne rodzaje aktywności naukowej

- a) współorganizacja sesji poświęconych metabolizmowi L-cysteiny, w ramach dwóch konferencji, na których prezentowałam również w formie wykładów (w języku polskim i angielskim) wyniki swoich badań (szczegóły w Załączniku 3, pkt. II.K, III.C).
- b) udział w prezentacjach Katedry Biochemii Lekarskiej na Festiwalach Nauki w Krakowie.

#### 5.11. Przynależność do organizacji Towarzystw Naukowych

- należę do Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od 2005 roku.

Kraków, dnia 29.10.2018r.

Halina Jurkowska  
.....  
podpis

