

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ I BIOTECHNOLOGII

AUTOREFERAT PRACY DOKTORSKIEJ

Anna HABRYKA

**Wpływ hipoksji na ekspresję genu *HSPA2*
w keratynocytach NHEK i HaCaT oraz komórkach
raka płaskonabłonkowego A431**

Regulation of *HSPA2* gene expression under hypoxia in normal keratinocytes
(NHEK and HaCaT) and in squamous carcinoma cells (A431)

Promotor: prof. dr hab. Zdzisław KRAWCZYK

Promotor pomocniczy: dr Dorota ŚCIEGLIŃSKA

Gliwice 2014

Praca doktorska wykonana w ramach Studium Doktoranckiego Politechniki Śląskiej.

Praca finansowana ze środków UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz z grantu Narodowego Centrum Nauki (2012/05/N/NZ1/00022).

Praca doktorska została wykonana w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii - Instytutu im. M. Skłodowskiej - Curie, oddział w Gliwicach.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE.....	4
1.1. Gen <i>HSPA2</i>	4
1.2. Hipoksja.....	5
1.3. Hipoksja w naskórku.....	5
1.4. Czynn timeranskrypcyjny HIF-1.....	6
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	7
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	8
3.1. Wpływ hipoksji na poziom transkryptu i białka HIF-1 α oraz na ekspresję genów regulowanych przez czyn timeranskrypcyjny HIF-1.....	8
3.2. Wpływ hipoksji na poziom transkryptu i białka kodowanego przez endogenny gen <i>HSPA2</i> w keratynocytach pierwotnych NHEK, komórkach HaCaT oraz w komórkach nowotworowych A431.....	9
3.3. Badanie aktywności promotora genu <i>HSPA2</i> w warunkach hipoksji.....	10
3.4. Analiza oddziaływań pomiędzy czynn timeranskrypcyjnym HIF-1, a sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu <i>HSPA2</i> w warunkach standardowych i hipoksyjnych.....	14
3.5. Wpływ nadekspresji konstytutywnie stabilnej formy podjednostki HIF-1 α na ekspresję genu <i>HSPA2</i>	15
3.6. Wpływ N-acetylocysteiny i echinomycyny, związków hamujących potencjał transkrypcyjny czynn timeranskrypcyjny HIF-1, na poziom aktywności promotora <i>HSPA2</i> w testach funkcjonalnych.....	16
3.7. Analiza oddziaływań pomiędzy czynn timeranskrypcyjnym HIF-1, a sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu <i>HSPA2</i> w komórkach HaCaT poddanych działaniu hipoksji w obecności echinomycyny.....	19
3.8. Wpływ echinomycyny na ekspresję endogennego genu <i>HSPA2</i> w warunkach hipoksji.....	20
3.9. Aktywność promotora genu <i>HSPA2</i> w komórkach HeLa nie jest hamowana przez HIF-1 w warunkach hipoksji.....	21
3.10. Analiza poziomu ekspresji endogennego genu <i>HSPA2</i> w warunkach reoksygenacji.....	22
4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI.....	24
5. BIBLIOGRAFIA.....	26
Wykaz osiągnięć naukowych	28

1. WPROWADZENIE

1.1. Gen *HSPA2*

Przedmiotem badań pracy doktorskiej jest gen *HSPA2* (ang. *HEat Shock Protein A2*) należący do rodziny genów *HSPA* (*HSP70*) grupującej tzw. geny szoku cieplnego, kodujące białka opiekuńcze i cytoprotekcyjne, nazywane także białkami stresu lub białkami szoku cieplnego. Białka tej rodziny biorą udział w ochronie białek komórkowych przed zmianami konformacji natywnej w czasie ekspozycji komórek na działanie toksycznych czynników środowiskowych i endogennych, chronią białka przed agregacją, rozdzysocjują nieswoiste agregaty białkowe oraz biorą udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych. W wyniku nadekspresji niektórych spośród tych białek komórki mogą zwiększać oporność na działanie sygnałów indukujących śmierć komórkową, co w przypadku np. komórek nowotworowych jest zjawiskiem niepożądanym zmniejszającym efektywność chemio czy radioterapii [9].

Do rodziny *HSPA* (*HSP70*) człowieka zalicza się 13 genów, spośród których jedynie kilka zostało dostatecznie dobrze poznanych. Gen *HSPA2* koduje białko, najslabiej scharakteryzowane zarówno pod względem funkcji jak i wzoru ekspresji. Ponadto nie jest znany mechanizm regulacji transkrypcji tego genu. Początkowo aktywność genu kodującego białko *HSPA2* wiązano z procesem spermatogenezy. Badania prowadzone w ciągu ostatnich kilku lat, w tym głównie przez zespół, z którym współpracuję, wykazały, że u człowieka gen kodujący białko *HSPA2*, może ulegać ekspresji w niektórych typach nowotworów [28], [10], [11], [25]. Wykrycie, że gen *HSPA2* ulega ekspresji w komórkach nowotworowych stało się bodźcem do rozpoczęcia prac, których celem było zbadanie, czy zwiększony poziom tego białka w guzach nowotworowych (lub jego brak) może wiązać się ze zmianą fenotypu komórek nowotworowych lub też korelować z określonymi cechami klinicznymi, a tym samym czy *HSPA2* mogłoby być nowym markerem nowotworowym [28], [10], [11], [25].

Jednym z zaskakujących odkryć było wykazanie ekspresji genu *HSPA2* w nielicznych typach komórek prawidłowych, w szczególności w nabłonkach. Najsilniejszą ekspresję tego wykazano w naskórku, przy czym białko *HSPA2* obecne jest selektywnie w keratynocytach warstwy podstawnej tej struktury [29]. Jedną z cech keratynocytów jest wzrost w warunkach obniżonego stężenia tlenu (hipoksja), co wynika z braku unaczynienia naskórka [20], [21], [22]. Obecny stan wiedzy o właściwościach genu i białka *HSPA2* został przedstawiony w pracy przeglądowej [42].

Poszukiwanie *in silico* krótkich sekwencji nukleotydowych, które mogłyby oddziaływać z białkami regulującymi transkrypcję genu *HSPA2* doprowadziło do wskazania, że jednym z takich elementów regulacyjnych może być sekwencja HRE (ang. *Hypoxia Responsive Element*) do której wiąże się czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1*). Biorąc pod uwagę, że gen *HSPA2* ulega silnej ekspresji w keratynocytach, które w naskórku w warstwie podstawnej proliferują w

środowisku hipoksyjnym, uznaliśmy, że keratynocyty mogą być doskonałym modelem badawczym służącym do wyjaśniania mechanizmów regulacji ekspresji genu *HSPA2* w warunkach zmian stężenia tlenu w środowisku zewnątrzkomórkowym.

1.2. Hipoksja

Fizjologiczne stężenie tlenu w środowisku komórek w ludzkim organizmie jest znacznie zróżnicowane i waha się od około 15 - 20% (110 - 150 mmHg) w górnych drogach oddechowych do około 1% (5 mmHg) w siatkówce oraz w nerwie na granicy części korowej i miąższowej [15], [31], [6]. Obniżenie stężenia tlenu poniżej wartości fizjologicznej nazywane jest hipoksją (niedotlenieniem), a całkowity brak tlenu anoksją. Stan hipoksji może być stanem rozległym (systemowym) lub dotyczyć jedynie narządu lub jego części.

Powstawanie obszarów niedotlenienia jest także sytuacją częstą w litych guzach nowotworowych, gdzie do komórek nowotworowych tlen dostarczany jest na drodze dyfuzji z naczyń krwionośnych występujących w jego mikrośrodowisku [12]. Na skutek nieprawidłowej budowy naczyń okołonowotworowych oraz ich niedostatecznej gęstości podaż tlenu w guzie jest niewystarczająca i jak ocenia się w około 60% guzów litych występują obszary hipoksyjne [33], [37], [24], [5].

Niedostateczna ilość tlenu wpływa na takie procesy komórkowe jak: podziały, progresja cyklu komórkowego i adhezja [31], [19]. Komórki, które nie są w stanie przystosować się do ograniczenia dostępności tlenu ulegają śmierci komórkowej, głównie w wyniku apoptozy lub nekrozy [39], [5]. Ponieważ występowanie obszarów hipoksji w guzie nowotworowym może wiązać się ze zmniejszoną wrażliwością komórek na działanie czynników terapeutycznych (radioterapia, chemioterapia, inne), jedną z ważnych strategii w terapii przeciwnowotworowej są działania zmierzające do eliminowania niedotlenienia lub blokowania procesów prożyciowych indukowanych przez stan hipoksji [5], [35].

1.3. Hipoksja w naskórku

Fizjologiczne stężenie tlenu w skórze właściwej wynosi około 10%, w naskórku waha się w granicach 1,5 - 5%, a w przydatkach skóry osiąga zaledwie 0,1 - 1,3% [20], [21], [22]. Jedną z przyczyn niskiego stężenia tlenu w naskórku jest brak unaczynienia tej tkanki; tlen pozyskiwany jest głównie w wyniku dyfuzji ze środowiska zewnętrznego. Stosunkowo niska zawartość tlenu w naskórku wskazuje, że w środowisku zasiedlanym przez keratynocyty występują warunki łagodnej hipoksji. Prawdopodobnie z tego powodu w naskórku czynnik transkrypcyjny HIF-1, jest obecny konstytutywnie, przy czym najwyższy poziom tego białka występuje w keratynocytach warstwy podstawnej [20]. Aktywność transkrypcyjną HIF-1 w keratynocytach potwierdzono w szeregu prac, wykrywając w tych

komórkach między innymi anhidrazę węglanową (*CAIX*) oraz transporter glukozy 1 (*GLUT1*), białka kodowane przez geny będące pod bezpośrednią kontrolą czynnika HIF-1 [2], [8], [4], [1], [21].

Stan hipoksji w warstwie podstawnej naskórka, jest ważnym czynnikiem biologii komórek występujących w tym mikrośrodowisku, zarówno keratynocytów jak również melanocytów. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum działania czynnika HIF-1, jego aktywność transkrypcyjna może pełnić ważną rolę w utrzymaniu homeostazy skóry oraz w przystosowaniu komórek do szkodliwych czynników środowiskowych, jak również może odgrywać rolę w prawidłowym różnicowaniu keratynocytów, rozwoju naczyń w skórze właściwej, ochronie przed infekcjami czy też gojeniu się ran [21], [34]. Zaburzona aktywność HIF-1 α wiązana jest także ze stanami patologicznymi skóry takimi jak: łuszczyca, powstawanie niegojących się ran, nowotworowa transformacja melanocytów czy udział w tworzeniu mikrośrodowiska sprzyjającego progresji nowotworów skóry [34].

1.4. Czynniki transkrypcyjny HIF-1

Głównym elementem sterującym odpowiedzią komórek na warunki hipoksyjne okazał się czynnik transkrypcyjny HIF-1 (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1*). Czynniki HIF-1 można także sklasyfikować jako czynniki transkrypcji z podgupy zawierającej w swojej strukturze domenę bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*). Funkcjonalną, kompetentną transkrypcyjnie formą czynnika HIF-1 jest heterodimer, złożony z podjednostek α (**HIF-1 α**) i β (**HIF-1 β** , znanej również jako ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)). Motywy PAS i bHLH w podjednostce HIF-1 α są niezbędne do tworzenia aktywnego heterodimeru z podjednostką β , jak również są konieczne do wiązania się dimerycznego czynnika HIF-1 z DNA [14], [21].

Cząsteczka HIF-1 α zawiera dwie domeny transaktywacyjne (N-TAD i C-TAD) zlokalizowane w części C-końcowej białka [26]. Te dwie domeny, aktywując transkrypcję genów, mogą oddziaływać z acetylotransferazami histonów takimi jak CBP/p300 i SRC-1. Szczególnie ważnym elementem strukturalnym cząsteczki HIF-1 α jest domena ODD (ang. *oxygen-dependent degradation domain*), uczestnicząca m.in. w stabilizacji/destabilizacji cząsteczki HIF-1 α zależnej od stężenia tlenu w środowisku komórki [14], [21].

W warunkach normoksji białko HIF-1 α ma bardzo krótki okres półtrwania (poniżej 5 minut), podczas gdy w warunkach obniżonego stężenia tlenu (hipoksji, 5% - 1% O₂) czynnik ten ulega stabilizacji. Proces stabilizacji/destabilizacji HIF-1 jest złożony, a podstawową rolę pełnią w nim dwa typy hydroksylaz: hydroksylazy proliny (PHD) oraz hydroksylaza asparaginy (FIH1). Enzymy te funkcjonują w komórce jako aktywne sensory tlenu, które regulują odpowiedź komórki na warunki hipoksji [14], [30].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Najnowsze badania prowadzone metodą precypitacji chromatyny przeciwciałem anty HIF-1 α wspartą analizą wyodrębnionych sekwencji DNA z zastosowaniem technik sekwencjonowania DNA najnowszej generacji wykazała, że sekwencja zgodności HRE występuje w genomie ludzkim bardzo często, jednak nie w każdym przypadku mamy do czynienia z sekwencjami o znaczeniu funkcjonalnym. Szereg czynników wpływających na zależną od HIF-1 ekspresję genów powoduje, że ekspresja genów, które w promotorze bądź w obszarze sekwencji wzmacniających transkrypcję (enhancerów) zawierają sekwencję HRE może wykazywać komórkowo swoisty wzór ekspresji [43]. W przeważającej liczbie poznanych przypadków oddziaływanie HIF-1 z HRE w warunkach hipoksji ma właściwość aktywowania transkrypcji genów, jednak znane są przykłady dokumentujące, że takie oddziaływanie może wpływać hamująco na ekspresję niektórych genów.

Przytoczone dane literaturowe stały się przesłankami do podjęcia badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej, których głównym celem było wyjaśnienie czy w keratynocytach aktywność genu *HSPA2* może być modulowana poprzez oddziaływanie sekwencji HRE z czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1.

Podstawowym modelem badawczym były immortalizowane keratynocyty linii HaCaT. W celu weryfikacji najważniejszych wyników i w celach porównawczych wykorzystywałam keratynocyty pierwotne izolowane z ludzkiej skóry (NHEK) oraz komórki raka płaskonabłonkowego skóry (linia A431). Wybranie jako modelu badawczego keratynocytów wydawało się szczególnie interesujące i ważne, ponieważ w keratynocytach warstwy podstawnej naskórka zachodzi silna ekspresja genu *HSPA2*, komórki te są też jednymi z nielicznych populacji komórek somatycznych w których poziom ekspresji genu *HSPA2* jest wysoki. Ponadto, w mikrośrodoisku komórek naskórka stężenie tlenu jest niższe niż w skórze właściwej, co sprawia, że keratynocyty warstwy podstawnej rezydują w warunkach łagodnej hipoksji (hipoksja fizjologiczna), a czynnik transkrypcyjny HIF-1 ulega stałej ekspresji.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

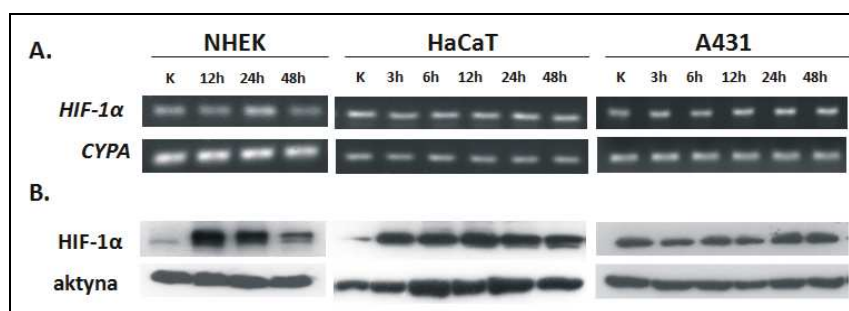
Ze względu na obszerność materiału doświadczalnego zawartego w pracy doktorskiej w autoreferacie zamieściłam jedynie najważniejsze wyniki.

3.1. Wpływ hipoksji na poziom transkryptu i białka HIF-1 α oraz na ekspresję genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny HIF-1

Komórki linii HaCaT, komórki NHEK po izolacji z naskórka i komórki nowotworowe A431 utrzymywałam w hodowli *in vitro* w warunkach określanych jako warunki standardowe (37°C, 5% CO₂, 95% powietrza atmosferycznego, 95% wilgotności). W czasie trwania eksperymentu hipoksyjnego hodowle komórkowe (konfluencja 50 - 70%) umieszczano w inkubatorze (HERAcell150, Thermo Elektron Corporation) z regulowanym poziomem tlenu w warunkach: ~1% O₂, 5% CO₂, 37°C, 95% wilgotności.

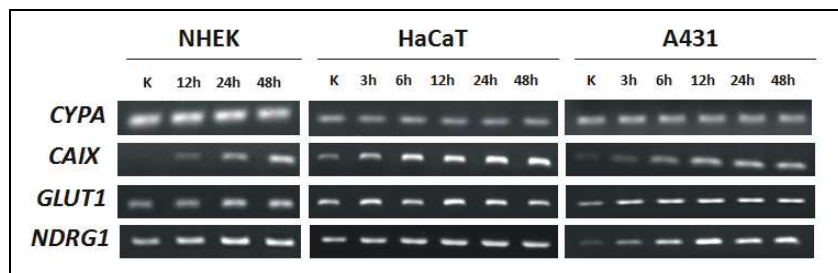
Wstępnym etapem pracy było zbadanie czy w warunkach obniżonego stężenia tlenu białko HIF-1 α ulega stabilizacji oraz czy aktywacji ulegają geny będące bezpośrednio pod kontrolą tego czynnika transkrypcyjnego. W tym celu komórki poddałam hipoksji w czasie od 3 do 24 godzin, a następnie określałam poziom transkryptów i białek. Wyniki badań przedstawiłam na rycinach 3.1 oraz 3.2.

Zgodnie z oczekiwaniami w warunkach hipoksji poziom transkryptów genu *HIF-1 α* nie zwiększał się, natomiast obserwowałam silną akumulację podjednostki HIF-1 α . Wyższy poziom akumulacji HIF-1 α obserwowano w keratynocytach prawidłowych niż w komórkach A431, przy czym należy zauważyć, że komórki A431 nawet w warunkach standardowych wykazują bardzo wysoki poziom HIF-1 α (Ryc. 3.1.).



Ryc.3.1. Analiza poziomu ekspresji genu *HIF-1 α* . A) Analiza transkryptu wykonana metodą RT-PCR; *CYPA* - cyklofilina A, wykorzystana jako gen referencyjny B) Analiza poziomu białka metodą Western Blot. Na żel nanoszono 40 μ g lizatów. K – kontrola, komórki inkubowane w warunkach standardowych, 3 – 48h czas inkubacji komórek w warunkach hipoksji (1% O₂). Na rycinach przedstawiono zdjęcia reprezentatywne z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych eksperymentu.

Następnie zbadalam czy akumulacja HIF-1 α wiąże się ze zwiększeniem aktywności transaktywacyjnej czynnika transkrypcyjnego HIF-1. W tym celu równolegle z oznaczaniem ekspresji genu *HIF-1 α* oznaczałam poziom transkryptów genów anhidrazy węglanowej IX (*CAIX*), transportera glukozy 1 (*GLUT1*) oraz genu 1 regulowanego N-myc (*NDRG1*) (Ryc.3.2.). Geny te są uznawane jako markerowe dla stanu hipoksji, ponieważ jak wykazano w licznych pracach, ich ekspresja jest silnie pobudzana przez czynnik HIF-1 w warunkach hipoksji (geny *CAIX* i *GLUT1* – [5], [14], [1], [31], gen *NDRG1* – [40], [41]).

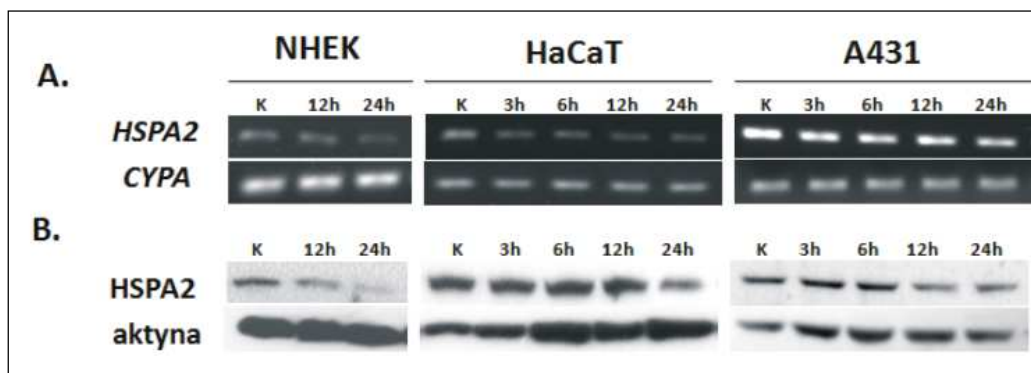


Ryc.3.2. Analiza poziomu transkrypcji genu referencyjnego cyklofiliny A (*CYPA*) oraz genów aktywowanych przez czynnik HIF-1 w hipoksji takich jak: anhidraza węglanowa IX (*CAIX*), transporter glukozy 1 (*GLUT1*) oraz genu 1 regulowanego N-myc (*NDRG1*). Analizę wykonano metodą RT-PCR. K – kontrola, komórki hodowane w warunkach standardowych, 3 – 48h czas hodowli komórek w warunkach hipoksji (1% O₂). Zdjęcia reprezentatywne z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

3.2. Wpływ hipoksji na poziom transkryptu i białka kodowanego przez endogenne gen *HSPA2* w keratynocytach pierwotnych NHEK, komórkach HaCaT oraz w komórkach nowotworowych A431

Kolejnym etapem badań było zbadanie poziomu ekspresji endogennego genu *HSPA2* w keratynocytach HaCaT, NHEK i A431 hodowanych w warunkach hipoksji. Wyniki badań przedstawiłam na rycinie 3.3.

Poziom transkryptów genu *HSPA2* w komórkach HaCaT w warunkach hipoksji nie zwiększał się co zostało określone zarówno metodą półilościową, jak i ilościową (Ryc.3.3.). Przeciwnie, obserwovałam spadek poziomu transkryptów określanego metodą qRT-PCR o około $0,63 \pm 0,06$ raza ($p < 0,05$) w stosunku do komórek hodowanych w warunkach standardowych, już po 3 godzinach ekspozycji komórek na hipoksję. Podobnie, obniżony poziom mRNA (max. o $0,47 \pm 0,09$ raza dla 6 godzin, $p < 0,05$) obserwovałam także w kolejnych analizowanych punktach czasowych (aż do 24 godzin). Wynik ten wskazuje, że w warunkach hipoksji w komórkach HaCaT dochodzi do szybkiego, znacznego i utrzymującego się w czasie spadku ilości transkryptów genu *HSPA2*. Metodą Western blot wykazałam, że hipoksja prowadzi również do spadku poziomu białka *HSPA2*, co było widoczne dopiero po 24 godzinach hipoksji. Podobne doświadczenia wykonałam dla komórek NHEK oraz komórek nowotworowych linii A431 (Ryc.3.3.).



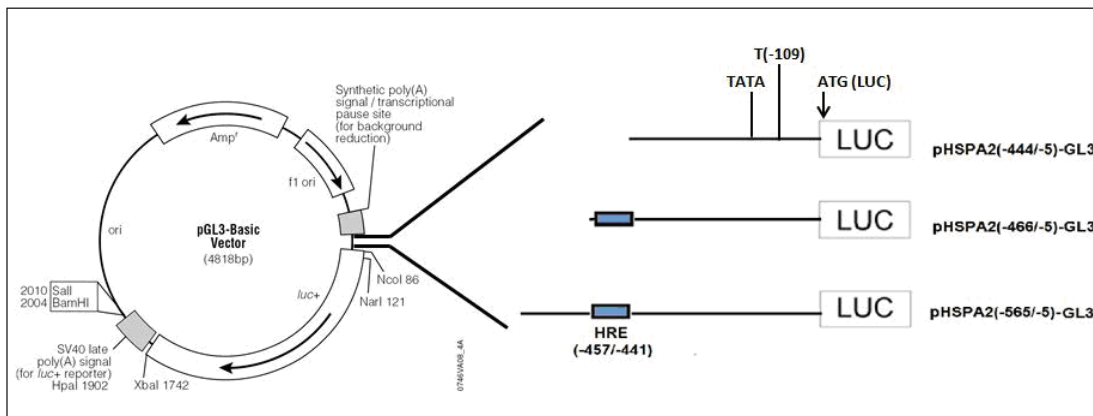
Ryc. 3.3. Analiza poziomu ekspresji HSPA2 w warunkach hipoksji. A) Analiza poziomu transkryptów HSPA2 metodą półilościowego RT-PCR. B) Analiza poziomu białka metodą Western blot. Analizę ekspresji HSPA2 wykonano w komórkach linii HaCaT, NHEK i A431. W analizie qRT-PCR posłużono się metodą $2^{\Delta\Delta C_t}$, a wyniki normalizowano względem genów referencyjnych CYPA i B2M. K – kontrola, komórki inkubowane w warunkach standardowych, 3 – 24h czas inkubacji komórek w warunkach hipoksji (1% O_2). Zdjęcia reprezentatywne z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

3.3. Badanie aktywności promotora genu HSPA2 w warunkach hipoksji

W celu wyjaśnienia czy sekwencja HRE znajdująca się w promotorze genu HSPA2 jest zaangażowana w modulowanie ekspresji tego genu w warunkach hipoksji wykonałam funkcjonalną analizę promotora genu HSPA2. Głównym zadaniem tego etapu badań było skonstruowanie plazmidowych wektorów ekspresyjnych, w których fragmenty promotora genu HSPA2 zostały połączone z genem wskaźnikowym lucyferazy. Otrzymane konstrukty stosowałam do transfekcji przejściowej komórek HaCaT, a następnie po hodowli komórek w warunkach standardowych lub hipoksyjnych oznaczałam aktywność lucyferazy. Fragment sekwencji regionu promotorowego genu HSPA2 wklonowanego w plazmid pGL3-Basic, z którego wyodrębniałam fragmenty zawierające lub pozbawione sekwencji HRE oraz niektóre inne informacje dotyczące sekwencji pHSPA2-luc przedstawiłam na rycinie 3.4.

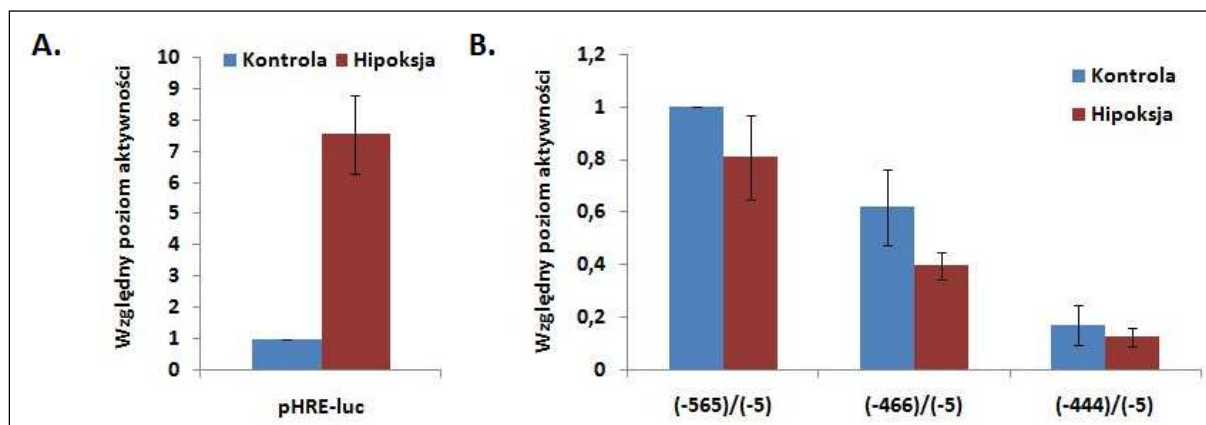
466/-5)-luc. Poziom aktywności tego fragmentu promotora powinien wskazywać, czy na poziom ekspresji genu hybrydowego mogą wpływać inne sekwencje regulatorowe DNA zlokalizowane przed sekwencją HRE.

- Plazmidowy wektor ekspresyjny oznaczony **pHSPA2(-466/-5)-luc** zawierał fragment DNA o długości 462 pz z obszaru promotorowego genu *HSPA2*, zlokalizowany 5 pz powyżej miejsca startu translacji. W końcu 5' badanego fragmentu znajdowała się sekwencja HRE.
- Plazmidowy wektor ekspresyjny oznaczony **pHSPA2(-444/-5)-luc** zawierał fragment DNA z obszaru promotorowego genu *HSPA2* omówionego powyżej, z którego końca 5' usunięto odcinek o długości 22 par zasad. Delecja ta usuwa sekwencję HRE dlatego spodziewana aktywność tego fragmentu promotora w warunkach hipoksji powinna być istotnie niższa w porównaniu z aktywnością fragmentu promotora *HSPA2* zawartego w wektorze pHSPA2(-466/-5)-luc.



Ryc.3.5. Struktura plazmidowych wektorów ekspresyjnych. Po lewej przedstawiono schemat plazmidu *pGL3-Basic* do którego wklonowałam fragmenty promotora genu *HSPA2*. Po prawej przedstawiono schematyczną strukturę fragmentów promotora genu *HSPA2* połączonych z genem wskaźnikowym lucyferazy. Fragmenty promotora *HSPA2* zostały wklonowane do plazmidu *pGL3-Basic* w miejscu polilinkera. LUC - gen kodujący lucyferazę. HRE - Hypoxia Responsive Element, miejsce wiązania czynnika HIF1. TATA – kasetta TATA, T(-109) – miejsce inicjacji transkrypcji genu *HSPA2*, ATG(LUC) – miejsce inicjacji translacji genu kodującego lucyferazę. Szczegółowy opis otrzymania powyższych plazmidów został opisany w rozdziale *Materiały i metody pracy doktorskiej*.

Wymienione konstrukty wprowadziłam do komórek HaCaT metodą transfekcji przejściowej. Komórki hodowałam w warunkach standardowych lub w hipoksji, a następnie poddawałam je lizie i oznaczałam aktywność genu wskaźnikowego - lucyferazy. Równocześnie sprawdziłam czy w warunkach w jakich prowadzone było doświadczenie indukowana jest ekspresja genu zawierającego w regionie promotorowym element regulacyjny HRE o potwierdzonej w piśmiennictwie funkcjonalności. W tym celu posłużyłam się plazmidem referencyjnym pHRE-luc [44], [45]. Plazmid ten zawiera gen wskaźnikowy lucyferazy pod kontrolą regionu promotora genu *VEGF* zawierającego funkcjonalną sekwencję HRE. Wyniki opisanego doświadczenia przedstawione są na rycinie 3.6.A. (plazmid referencyjny) i 3.6.B. (plazmidy skonstruowane i opisane powyżej)



Ryc.3.6. Względny poziom aktywności wektora referencyjnego pHRE-luc (A) oraz promotora genu HSPA2 (B) poddanych działaniu hipoksji. Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych z wykorzystaniem systemu Dual Luciferase Reporter Assay (Promega). Wyniki były przeliczane względem kontroli hodowanej w warunkach standardowych (w przypadku wektora pHRE-luc) oraz względem najdłuższego fragmentu promotora (-565/-5) w warunkach standardowych.

Jak wynika z ryciny 3.6.A. zgodnie z oczekiwaniem, w warunkach hipoksji aktywność genu wskaźnikowego wzrasta około 7,5 razy ($\pm 1,25$; $p < 0,05$) w stosunku do jego aktywności w warunkach standardowych. Wynik doświadczenia wskazuje, że w komórkach HaCaT, w warunkach obniżonego stężenia tlenu (1%) zachodzi stabilizacja czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α , wiązanie się HIF-1 do sekwencji HRE w regionie promotorowym genu hybrydowego, a w konsekwencji dochodzi do silnej aktywacji ekspresji genu lucyferazy

Z kolei jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 3.6.B., w warunkach standardowych aktywność badanych fragmentów promotora genu *HSPA2* malała wraz ze zmniejszaniem się ich długości. Dla transgenu **pHSPA2(-466/-5)-luc** odnotowano obniżenie aktywności promotorowej o ok. 44% w stosunku do transgenu pHSPA2(-565/-5)-luc. Szczególnie silny spadek aktywności obserwowaliśmy w przypadku transfekcji komórek plazmidem **pHSPA2(-444/-5)-luc**, w którym fragment DNA połączony z genem wskaźnikowym nie zawierał sekwencji HRE, a którego aktywność spadała o ok. 83% w stosunku do plazmidu pHSPA2(-565/-5)-luc. Oznacza to, że na poziom aktywności promotora *HSPA2* może wpływać fragment DNA zawierający sekwencję HRE, jak również sekwencje DNA zlokalizowane powyżej tego miejsca.

Oba z badanych fragmentów promotora genu *HSPA2*, które posiadały sekwencję HRE wykazywały słabszą aktywność w komórkach hodowanych przez 24 godziny w warunkach hipoksji w odniesieniu do warunków standardowych. W przypadku genów hybrydowych **pHSPA2(-466/-5)-luc** i **pHSPA2(-565/-5)-luc**, które posiadają sekwencję HRE obniżenie poziomu aktywności promotora w warunkach hipoksji wynosiło odpowiednio około $0,65 \pm 0,05$ i $0,81 \pm 0,16$ ($p < 0,05$). Dla genu hybrydowego **pHSPA2(-444/-5)-luc**, który nie posiada sekwencji HRE nie zaobserwowano zmian w poziomie aktywności.

Wyniki opisanego analizy funkcjonalnej promotora genu *HSPA2* wskazują, że w warunkach hipoksji ekspresja tego genu nie zwiększa się pomimo obecności w jego regionie regulatorowym

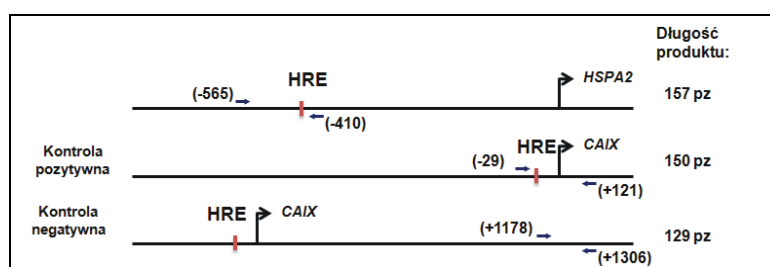
sekwencji HRE mogącej potencjalnie oddziaływać z czynnikiem HIF-1, a wręcz przeciwnie jej poziom ulega obniżeniu.

3.4. Analiza oddziaływań pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1, a sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu *HSPA2* w warunkach standardowych i hipoksyjnych

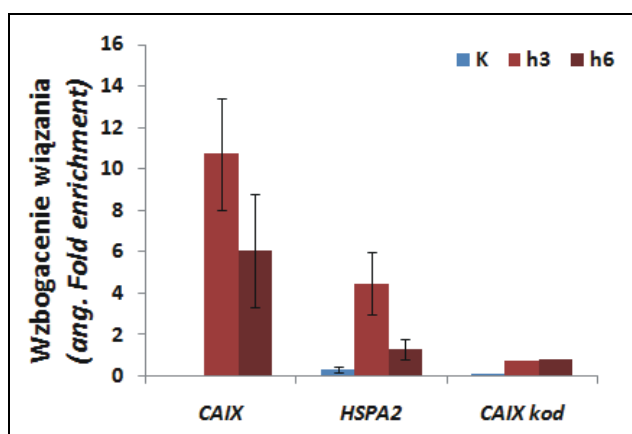
W celu oceny, czy w keratynocytach czynnik HIF-1 może oddziaływać z sekwencją zgodności HRE zlokalizowaną w promotorze genu *HSPA2* posłużyłam się metodą immunoprecypitacji chromatyny połączoną z ilościową reakcją PCR (metoda CHIP-qPCR). Lokalizację starterów zastosowanych w powyższej metodzie oznaczono na rycinie 3.7. Jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 3.9. w warunkach hipoksji białko HIF-1 α wiąże się z badanymi sekwencjami DNA promotora genu *CAIX* oraz genu *HSPA2*. W przypadku genu *HSPA2* wzbogacenie wiązania po 3 godzinach hipoksji było słabsze ($4,5 \pm 1,49$, $p < 0,05$) niż w przypadku sekwencji promotorowych genu *CAIX* ($10,74 \pm 2,68$, $p < 0,01$). Większe wzbogacenie wiązania wykryto dla chromatyny pochodzącej z komórek hodowanych w hipoksji przez 3 godziny niż przez 6 godzin, a wynik taki uzyskano dla obu badanych genów (po 6 godz.: *HSPA2* - $1,32 \pm 0,51$, $p < 0,05$; *CAIX* - $6,08 \pm 2,71$, $p < 0,05$).

Dla fragmentów DNA stanowiących kontrolę negatywną (*CAIX kod.*) nie wykazano wzbogacenia wiązania czynnika HIF-1 do sekwencji zawartych w amplifikowanym fragmencie. Jako dodatkową kontrolę wykonałam immunoprecypitację chromatyny z zastosowaniem przeciwciała kontrolnego (anty-IgG) nierozpoznającego białka HIF-1 α . W tym teście nie wykazałam wzbogacenia wiązania dla żadnego z badanych genów (dane niepokazane).

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują, że HIF-1 α oddziałuje z sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu *HSPA2* w hipoksji, a co się z tym wiąże, może brać udział w regulacji jego ekspresji w keratynocytach.



Ryc. 3.7. Schemat lokalizacji starterów wykorzystanych do amplifikacji metodą q-PCR fragmentów chromatyny immunoprecypitowanej przeciwciałem anti-HIF-1 α . HRE - ang. Hypoxia Responsive Element (oznaczony jako czerwony prostokąt). W nawiasach podano lokalizację starterów w sekwencjach genów *HSPA2* i *CAIX* (anhidrazy węglanowej IX) względem miejsc inicjacji translacji (+1) oznaczonych czarną strzałką, miejsca wiązania starterów zaznaczono niebieskimi strzałkami. Amplifikacja sekwencji genu *CAIX* zawierającego element HRE posłużyła jako kontrola pozytywna, natomiast amplifikacja fragmentu genu *CAIX* - jako kontrola negatywna.



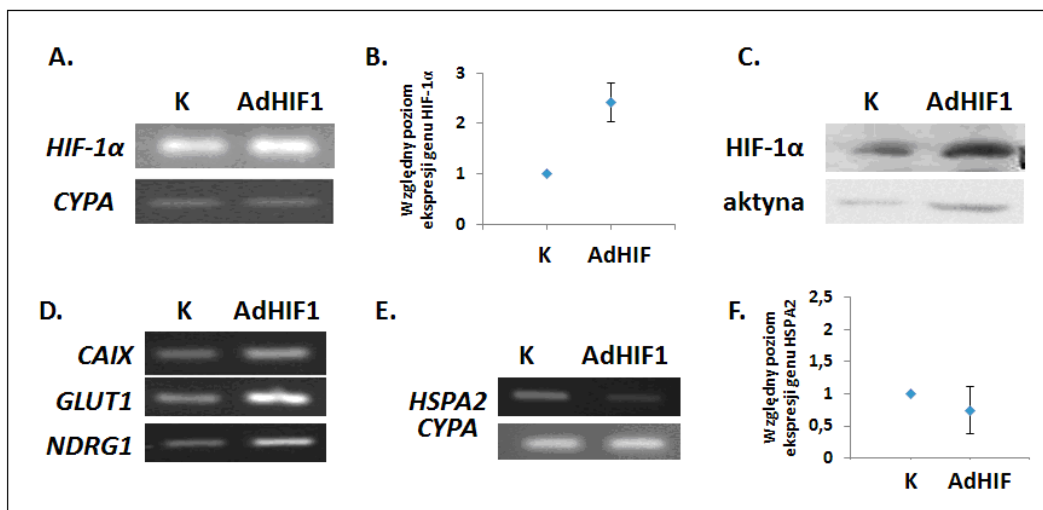
Ryc. 3.8. Analiza q-PCR dla DNA uzyskanego w wyniku immunoprecypitacji przeciwciałem anti-HIF-1 α chromatyny pochodzącej z komórek HaCaT hodowanych w warunkach standardowych i hipoksji. Wyniki przedstawiono jako poziom wzbogacenia wiązania (ang. fold enrichment) czynnika HIF-1 α do DNA znormalizowane względem próby bez przeciwciała. CAIX - anhidraza węglanowa IX (kontrola pozytywna), CAIX kod - kontrola negatywna. K - komórki hodowane w warunkach standardowych przez 6 godzin, h3 - hipoksja 3 godziny, h6 - hipoksja 6 godzin. Na wykresie przedstawiono wyniki z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

3.5. Wpływ nadekspresji konstytutywnie stabilnej formy podjednostki HIF-1 α na ekspresję genu HSPA2

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że HIF-1 wiąże się z sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu *HSPA2* oraz może pełnić funkcję negatywnego regulatora ekspresji tego genu.

W celu oceny wpływu czynnika HIF-1 na ekspresję genu *HSPA2* do komórek HaCaT transdukowałam wektor adenowirusowy kodujący konstytutywnie stabilnego mutantu HIF-1 α . Mutację wprowadzono w domenę regulowaną tlenem (ODD), co powoduje stałą ekspresję tego białka w warunkach dostępności tlenu (standardowych). Jako kontrolę posłużył wektor adenowirusowy kodujący białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP). Wynik doświadczenia pokazany jest na rycinie 3.10.

Wprowadzenie wektorów powodowało nadekspresję podjednostki HIF-1 α w warunkach standardowych. Zaobserwowałam wzrost poziomu transkryptu (ryc.3.10.A i B; $2,41 \pm 0,39$ raza w stosunku do kontroli, $p < 0,05$) oraz białka HIF-1 α (ryc.3.10.C). Wykazałam wzrost poziomu transkrypcji genów regulowanych przez czynnik HIF-1: *CAIX*, *GLUT1* i *NDRG1* (ryc.3.10.D) co potwierdziło, że nadekspresji HIF-1 α towarzyszył wzrost aktywności transaktywatorowej czynnika HIF-1. Ponadto, w komórkach z nadekspresją HIF-1 α obserwowałam spadek poziomu transkryptu genu *HSPA2* (ryc.3.10.E i F; $0,74 \pm 0,37$ w stosunku do kontroli). Uzyskany wynik wskazuje, że czynnik transkrypcyjny HIF-1 może istotnie pełnić funkcję negatywnego regulatora transkrypcji genu *HSPA2*.



Ryc. 3.10. Nadekspresja konstytutywnie stabilnego mutantu białka HIF-1 α w keratynocytach HaCaT w warunkach standardowych. (A) Poziom transkryptów HIF-1 α określony metodą RT-PCR i (B) qRT-PCR. (C) Poziom białka HIF-1 α określony metodą Western blot. (D) Poziom transkryptów genów regulowanych przez czynnik HIF-1 - CAIX, GLUT1, NDRG1 określony metodą RT-PCR. (E) Poziom transkryptów HSPA2 określony metodą RT-PCR i (F) qRT-PCR. K - komórki transdukiowane wektorem kontrolnym GFP, AdHIF1 - komórki transdukiowane wektorem kodującym stabilne białko HIF-1 α . Cyklofilina A (CYPA) została wykorzystana jako gen referencyjny w metodach RT-PCR i qRT-PCR, B2M - w metodzie qRT-PCR. Aktyna została wykorzystana jako białko referencyjne w metodzie Western blot. Zdjęcia reprezentatywne z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

3.6. Wpływ N-acetylocysteiny i echinomycyny, związków hamujących potencjał transkrypcyjny czynnika HIF-1, na poziom aktywności promotora HSPA2 w testach funkcjonalnych

Jak wykazałam powyżej nadekspresja białka HIF-1 α w keratynocytach prowadzi do obniżenia poziomu HSPA2 w warunkach standardowych. Koniecznym etapem badań była próba wykazania czy zahamowanie potencjału transkrypcyjnego tego czynnika w warunkach hipoksji wpłynie na ekspresję genu HSPA2. W tym celu komórki HaCaT traktowałam N-acetylocysteiną oraz echinomycyną. N-acetylocysteina (NAC) w warunkach hipoksji powoduje destabilizację HIF-1 α (mechanizm działania tego związku opisano m.in. w pracy [27]). Z kolei echinomycyna (NSC-13502) jest cyklicznym peptydem należącym do antybiotyków wyizolowanym z *Streptomyces echinatus*, który hamuje wiązanie się HIF-1 z HRE, równocześnie nie wpływając na wiązanie się innych czynników transkrypcji (np. AP-1 czy NF κ B) do odpowiednich sekwencji w DNA [16].

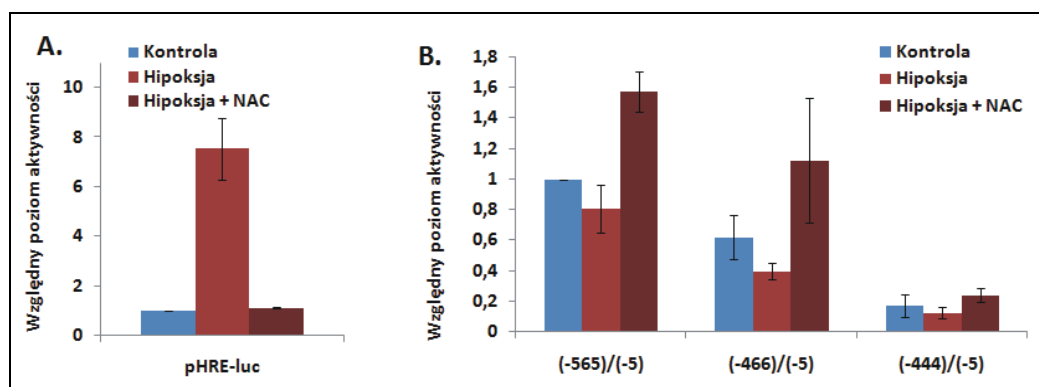
Komórki HaCaT hodowałam 8 godzin w warunkach standardowych i hipoksyjnych bez oraz w obecności 20 mM N-acetylocysteiny (stężenie związku wybrano na podstawie analizy danych literaturowych). Następnie metodą Western blot wykazałam, że w obecności N-acetylocysteiny (NAC) w hipoksji dochodzi do znacznie słabszej akumulacji podjednostki HIF-1 α niż ma to miejsce w komórkach eksponowanych wyłącznie na hipoksję ($1,12 \pm 0,73$ versus $2,3 \pm 0,46$ odpowiednio dla hipoksji z versus bez dodatku NAC) (Rycina 3.11).



Ryc.3.11. Wpływ N-acetylocysteiny na stabilizację białka HIF-1 α w keratynocytach HaCaT poddanych działaniu hipoksji. Analiza przeprowadzona metodą Western Blot. Aktyna została wykorzystana jako kontrola naniesienia białka na żel. K - komórki hodowane w warunkach standardowych, H - komórki hodowane w warunkach hipoksji (1% O₂), K+NAC, H+NAC - komórki hodowane z dodatkiem NAC w stężeniu końcowym 20 mM.

W celu zbadania jak N-acetylocysteina wpływa na aktywność promotora genu *HSPA2* do komórek HaCaT metodą transfekcji przejściowej wprowadziłam geny hybrydowe **pHRE-luc**, **pHSPA2(-565/-5)-luc**, **pHSPA2(-466/-5)-luc** i **pHSPA2(-444/-5)-luc**. Następnie komórki hodowano 8 godzin w warunkach hipoksji (1% O₂) oraz hipoksji przy obecności w pożywce NAC w stężeniu 20 mM. Następnie przygotowałam ekstrakty komórkowe i oznaczałam aktywność genu wskaźnikowego lucyferazy. Jak można zauważyć aktywność genu hybrydowego pHRE-luc znacząco rośnie (około 7,5 krotnie) w komórkach HaCaT poddanych działaniu hipoksji, a spada niemal do poziomu kontroli, jeśli w pożywce obecna jest N-acetylocysteina (Ryc. 3.12.A). Wynik ten wskazuje, że w wyniku działania na keratynocyty N-acetylocysteiny następuje zahamowanie aktywności transaktywatorowej czynnika HIF-1. Natomiast wpływ N-acetylocysteiny na poziom aktywności genów hybrydowych zawierających fragmenty promotora genu *HSPA2* jest całkowicie odmienny od opisanego w rozdziale 3.3.

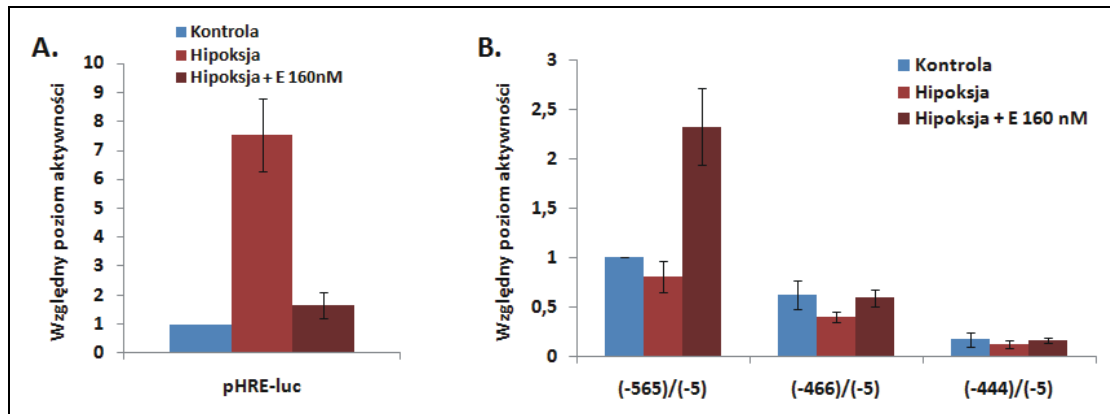
Obecność N-acetylocysteiny w hipoksji prowadzi do wzrostu aktywności genów hybrydowych **pHSPA2(-565/-5)-luc**, **pHSPA2(-466/-5)-luc** i **pHSPA2(-444/-5)-luc** odpowiednio o $1,95 \pm 0,13$, $p < 0,05$; $2,80 \pm 0,41$, $p < 0,05$ i $2,0 \pm 0,05$ razy w stosunku do ich aktywności w komórkach eksponowanych wyłącznie na hipoksję (Ryc.3.12.B.). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że obniżenie poziomu podjednostki HIF-1 α w warunkach hipoksji może prowadzić do wzrostu aktywności promotora genu *HSPA2*, a zatem można przypuszczać, że czynnik transkrypcyjny HIF-1 działa jako represor genu *HSPA2*. Interesujący jest natomiast wzrost aktywności genu hybrydowego, w którym promotor został pozbawiony sekwencji HRE. Obserwacja ta spowodowała wyłączenie powyższego związku z dalszych badań.



Ryc.3.12. Względny poziom aktywności wektora referencyjnego *pHRE-luc* (A) oraz promotora genu *HSPA2* (B) traktowanego 20 mM *N-acetylocysteiny* (NAC) w czasie 8-godzinnej inkubacji komórek *HaCaT* w warunkach hipoksji. Eksperyment wykonano w 2 powtórzeniach biologicznych z wykorzystaniem systemu *Dual Luciferase Reporter Assay* (Promega). Wyniki były przeliczane względem kontroli hodowanej w warunkach standardowych (w przypadku wektora *pHRE-luc*) oraz względem najdłuższego fragmentu promotora (-565/-5) w warunkach standardowych.

W celu zbadania jak echinomycyna wpływa na aktywność promotora genu *HSPA2* do komórek *HaCaT* metodą transfekcji przejściowej wprowadzono geny hybrydowe **pHRE-luc**, **pHSPA2(-565/-5)-luc**, **pHSPA2(-466/-5)-luc** i **pHSPA2(-444/-5)-luc**. Następnie komórki hodowałam 24 godziny w warunkach hipoksji (1% O₂) oraz hipoksji w obecności w pożywce echinomycyny w stężeniu 160 nM. Następnie przygotowałam ekstrakty komórkowe i oznaczałam aktywność genu wskaźnikowego lucyferazy. Jak pokazano wpływ echinomycyny na ekspresję genu hybrydowego znajdującego się w referencyjnym plazmidzie **pHRE-luc** (rycina 3.13.A) jest taki sam jak *N-acetylocysteiny*.

Echinomycyna wywarła natomiast nieco odmienny wpływ niż *N-acetylocysteina* na ekspresję genu hybrydowego **pHSPA2(-466/-5)-luc**. O ile w wyniku stosowania *N-acetylocysteiny* obserwowano silne pobudzenie funkcji promotora w hipoksji, to zastosowanie echinomycyny w hipoksji prowadziło do wzrostu aktywności promotorowej do poziomu obserwowanego w warunkach standardowych, jakkolwiek poziom ten był wyższy (o 1,47 raza) niż w komórkach poddanych jedynie hipoksji. Powód tej różnicy nie został wyjaśniony, jednak przypuszcza się, że słabszy wzrost aktywności powyższego fragmentu po zastosowaniu echinomycyny jest związany z większą specyficnością działania tego związku. Natomiast w przypadku genu hybrydowego **pHSPA2(-565/-5)-luc** obserwowano silny wzrost aktywności promotora w hipoksji zarówno w obecności *N-acetylocysteiny* jak również echinomycyny (wzrost $1,95 \pm 0,13$, $p < 0,05$ i $2,88 \pm 0,39$, $p < 0,05$ razy odpowiednio dla *N-acetylocysteiny* i echinomycyny względem komórek poddanych samej hipoksji) (Ryc.3.13.B).

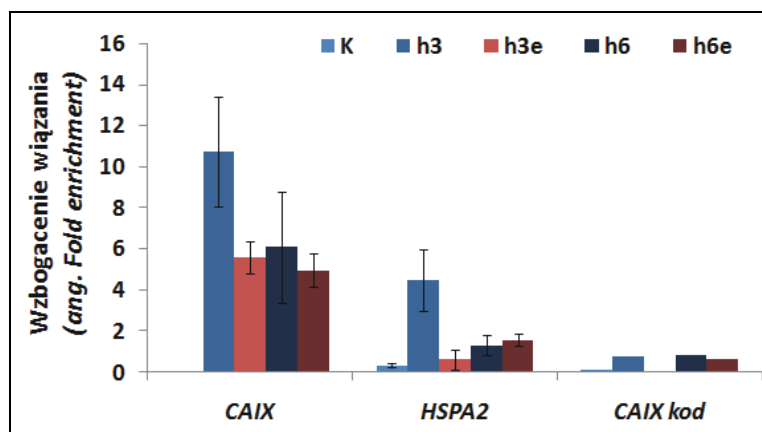


Ryc.3.13. Względny poziom aktywności wektora referencyjnego *pHRE-luc* (A) oraz wektorów *pHSPA2-luc* (B) w komórkach *HaCaT* traktowanych echinomycyną (160 nM) w warunkach hipoksji. Eksperyment wykonano w 2 powtórzeniach biologicznych z wykorzystaniem systemu Dual Luciferase Reporter Assay (Promega). Wyniki były przeliczane względem kontroli hodowanej w warunkach standardowych (w przypadku wektora *pHRE-luc*) oraz względem najdłuższego fragmentu promotora (-565/-5) w warunkach standardowych w przypadku wektorów *pHSPA2-luc*. E 160 nM - echinomycyna w stężeniu 160 nM, jako kontrola posłużyły komórki nietraktowane echinomycyną hodowane w warunkach standardowych.

3.7. Analiza oddziaływań pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1, a sekwencją HRE zlokalizowaną w promotorze genu *HSPA2* w komórkach *HaCaT* poddanych działaniu hipoksji w obecności echinomycyny

Przedstawione powyżej wyniki badań wskazywały, że zahamowanie przez echinomycynę wiązania HIF-1 do DNA może prowadzić do wzrostu aktywności promotora *HSPA2*, w którym obecna jest sekwencja HRE. W celu potwierdzenia czy echinomycyna hamuje wiązanie HIF-1 do DNA w warunkach hipoksji wykonałam immunoprecypitację chromatyny połączoną z ilościową reakcją PCR (ChIP-qPCR). Warunki prowadzenia immunoprecypitacji chromatyny zastosowałam takie same jak opisano w rozdziale 3.4. Wyniki doświadczenia przedstawiłam na rycinie 3.14.

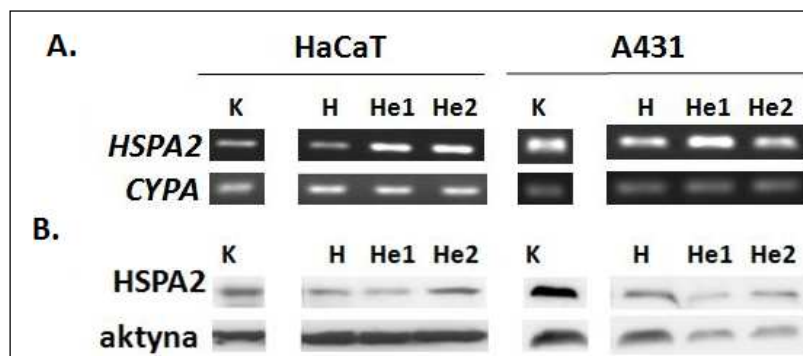
W warunkach hipoksji echinomycyna powoduje obniżenie wiązania HIF-1 α do sekwencji HRE w promotorach genów *CAIX* ($10,74 \pm 2,68$ versus $5,59 \pm 0,77$, odpowiednio dla hipoksji i hipoksji w połączeniu z echinomycyną, $p < 0,05$) i *HSPA2* ($4,50 \pm 1,49$ versus $0,62 \pm 0,49$, odpowiednio dla hipoksji i hipoksji z echinomycyną, $p < 0,05$). Zjawisko to zachodzi najwydajniej w czasie 3 godzin hipoksji, a więc wtedy, kiedy wiązanie HIF-1 α jest najsilniejsze. Po 6 godzinach hodowli komórek w warunkach hipoksji wiązanie czynnika HIF-1 do DNA jest mniejsze, a echinomycyna nie powoduje już dalszego spadku oddziaływań czynnika z DNA.



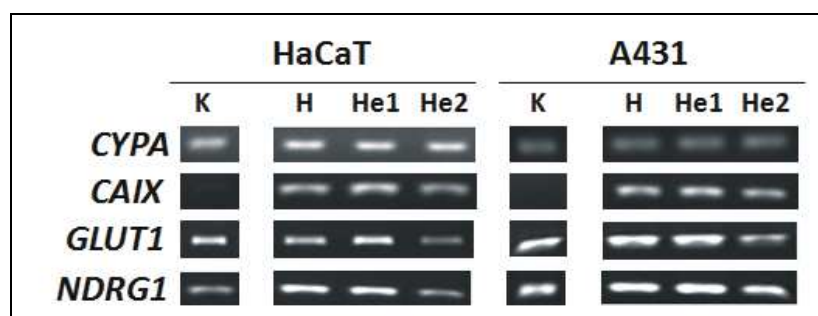
Ryc.3.14. Analiza qPCR dla DNA uzyskanego w wyniku immunoprecypitacji chromatyny przeciwciałem anti-HIF-1 α w komórkach HaCaT hodowanych w warunkach hipoksji i poddanych działaniu echinomycyny w stężeniu 160 nM. Wyniki przedstawiono jako poziom wzbogacenia wiązania (ang. fold enrichment) czynnika HIF-1 α do DNA. CAIX - anhidraza węglanowa IX (kontrola pozytywna), CAIX kod - kontrola negatywna. K- komórki nietraktowane hodowane w warunkach standardowych, h3, h6 - komórki hodowane w hipoksji odpowiednio 3 lub 6 godzin; h3e, h6e - komórki poddane działaniu 160 nM echinomycyny oraz hodowane w warunkach hipoksji odpowiednio 3 lub 6 godzin. Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

3.8. Wpływ echinomycyny na ekspresję endogennego genu *HSPA2* w warunkach hipoksji

Następnym etapem badań była analiza ekspresji endogennego *HSPA2* w keratynocytach poddanych działaniu hipoksji w obecności echinomycyny. W komórkach HaCaT echinomycyna powodowała znaczący wzrost ekspresji genu *HSPA2* w warunkach hipoksji. O ile jednak poziom transkrypcji wzrastał po traktowaniu echinomycyną zarówno w stężeniu 80 nM jak i 160 nM o odpowiednio $2,1 \pm 0,99$ i $3,56 \pm 0,31$ razy, $p < 0,05$ (w stosunku do komórek poddanych samej hipoksji), to wzrost poziomu białka obserwowałam tylko w komórkach traktowanych wyższym stężeniem tego związku (Ryc.3.15.). Równoległe z oznaczaniem poziomu transkrypcji genu *HSPA2* oznaczałam poziom transkryptów genów *CAIX*, *GLUT1* i *NDRG1* (Ryc. 3.16.). Zgodnie z oczekiwaniem hipoksja prowadzi do silnego wzrostu ekspresji badanych genów. Natomiast w obecności echinomycyny w stężeniu 160 nM poziom ekspresji powyższych genów ulega obniżeniu w stosunku do poziomu obserwowanego w komórkach hodowanych w warunkach hipoksji. Wynik ten potwierdza, że zastosowanie echinomycyny w stężeniu 160 nM obniża poziom indukcji genów aktywowanych przez HIF-1 w warunkach hipoksji, co odbywa się poprzez hamowanie wiązania HIF-1 do promotorów tych genów. Równocześnie wykazanie, że zastosowanie echinomycyny prowadzi do wzrostu aktywności promotora oraz poziomu ekspresji genu *HSPA2* potwierdza, że w odniesieniu do promotora genu *HSPA2* HIF-1 działa jako czynnik hamujący transkrypcję.



Ryc.3.15. Wpływ echinomycyny na ekspresję genu *HSPA2*. (A) Poziom transkryptów oceniony metodą RT-PCR. (B) Poziom białka określony metodą Western blot. Aktyna posłużyła jako białko referencyjne. K – komórki hodowane w warunkach standardowych, H- komórki hodowane w warunkach hipoksji, He1 - komórki traktowane 80 nM echinomycyny w warunkach hipoksji, He2 - komórki traktowane 160 nM echinomycyny w warunkach hipoksji.



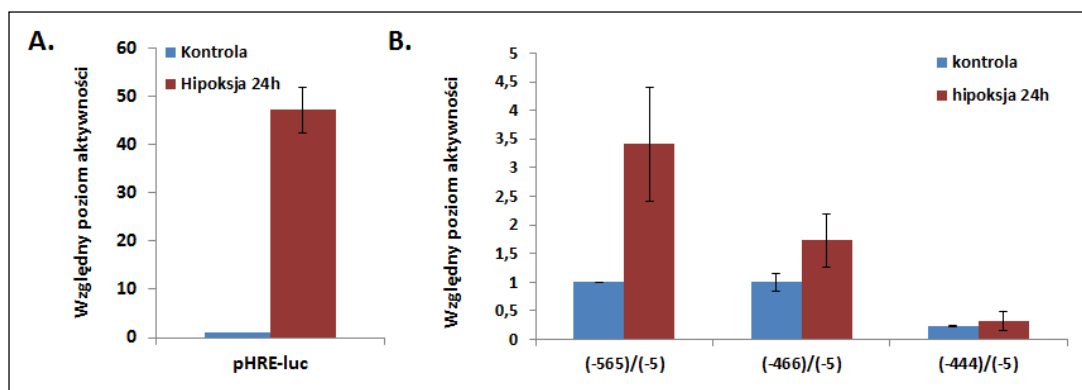
Ryc.3.16. Wpływ echinomycyny na ekspresję genu referencyjnego cyklofiliny A (*CYPA*) oraz genów indukowanych hipoksją: anhidrazy węglanowej IX (*CAIX*), transportera glukozy 1 (*GLUT1*) oraz genu *NDRG1*. Poziom transkryptów oceniono metodą RT-PCR. K – kontrola, komórki hodowane w warunkach standardowych, H- komórki hodowane w warunkach hipoksji, He1 - komórki traktowane 80 nM echinomycyny w warunkach hipoksji, He2 - komórki traktowane 160 nM echinomycyny w warunkach hipoksji. Analiza wykonana metodą RT-PCR.

3.9. Aktywność promotora genu *HSPA2* w komórkach HeLa nie jest hamowana przez HIF-1 w warunkach hipoksji

W celu zbadania czy obserwowany efekt obniżania się ekspresji genu *HSPA2* pod wpływem hipoksji w keratynocytach występuje także w innych komórkach wykonałam funkcjonalną analizę promotora genu *HSPA2* w linii komórek nowotworowych HeLa (Ryc. 3.17.).

Komórki HeLa, tak jak poprzednio komórki HaCaT, transfekowałam plazmidami pHRE-luc, pHSPA2(-565/-5)-luc, pHSPA2(-466/-5)-luc i pHSPA2(-444/-5)-luc. W komórkach HeLa, do których wprowadzałam plazmid pHRE-luc, zaobserwowałam znaczny wzrost aktywności genu wskaźnikowego w warunkach hipoksji. Natomiast jeśli do komórek HeLa wprowadziłam konstrukty pHSPA2-luc zawierające sekwencję HRE zaobserwowałam, przeciwnie niż w przypadku komórek HaCaT, wzrost aktywności genu wskaźnikowego (pHSPA2(-565/-5)-luc: $3,41 \pm 1,0$; pHSPA2(-466/-5)-luc: $1,73 \pm$

0,46). Nie zaobserwowałam natomiast różnic w ekspresji najkrótszego fragmentu promotora, pozbawionego sekwencji HRE.

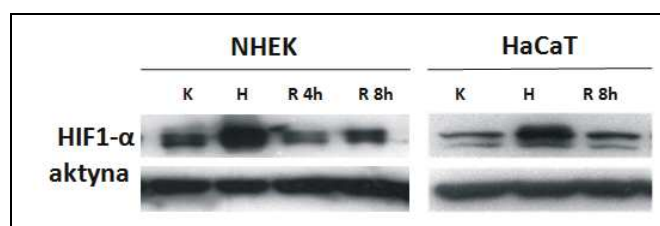


Ryc. 3.17. Względny poziom aktywności wektora referencyjnego pHRE-luc (A) oraz promotora genu HSPA2 (B) Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych z wykorzystaniem systemu Dual Luciferase Reporter Assay (Promega). Wyniki były przeliczane względem kontroli hodowanej w warunkach standardowych (w przypadku wektora pHRE-luc) oraz względem najdłuższego fragmentu promotora (-565/-5) w warunkach standardowych.

3.10. Analiza poziomu ekspresji endogennego genu HSPA2 w warunkach reoksygenacji

Jakkolwiek nie było to celem pracy postanowiłam sprawdzić wpływ reoksygenacji (hodowla komórek w warunkach standardowych (21% O₂) następująca po hodowli komórek w warunkach hipoksji) na poziom ekspresji endogennego HSPA2.

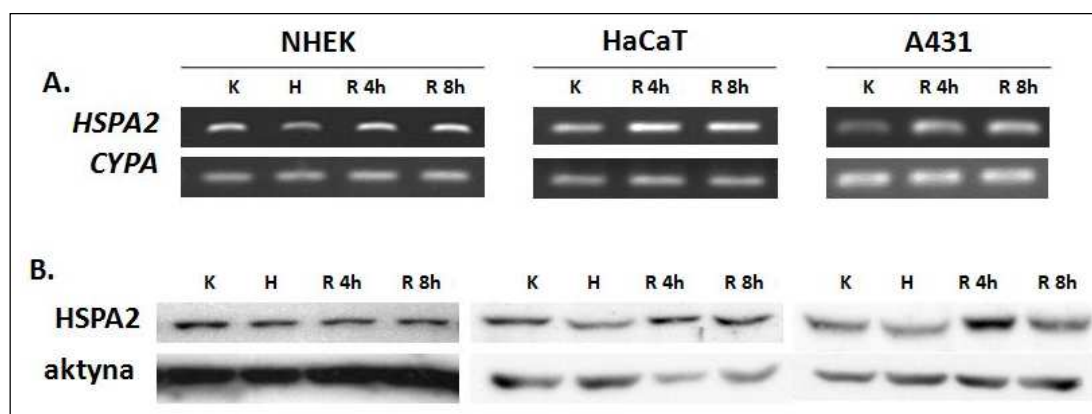
W pierwszej kolejności sprawdziłam, w jakim stopniu reoksygenacja keratynocytów wpłynie na poziom białka HIF-1 α (Ryc. 3.18.). Po zmianie warunków hodowli z hipoksyjnych na standardowe podjednostka HIF-1 α ulega szybkiej destabilizacji. W komórkach NHEK osiąga poziom kontrolny (komórki nie poddane hipoksji) już po 4 godzinach reoksygenacji.



Ryc.3.18. Zmiany poziomu podjednostki HIF-1 α w czasie hipoksji i reoksygenacji keratynocytów NHEK i HaCaT. Komórki hodowano 24 godziny w warunkach hipoksji (1% O₂), a następnie 4 lub 8 godzin w warunkach standardowych (21% O₂); poziom białka wykrywano metodą Western blot. Aktynę wykorzystano jako białko referencyjne. K - warunki standardowe. H - warunki hipoksyjne, R4h, R8h - reoksygenacja odpowiednio przez 4 i 8 godzin

Równolegle sprawdziłam czy poziom ekspresji genu HSPA2 ulega zmianie w warunkach reoksygenacji poprzedzonej hipoksją. Poziom transkryptów sprawdziłam metodą RT-PCR, natomiast

poziom białka analizowałam wykorzystując metodę Western blot. Wyniki przedstawiono na ryczeniu 3.19. Poziom transkryptów *HSPA2* w komórkach NHEK spada w hipoksji, a po reoksygenacji jest porównywalny do poziomu obserwowanego w komórkach hodowanych w warunkach standardowych. Poziom białka *HSPA2* po 24 godz. hipoksji spada, jednak po poddaniu komórek reoksygenacji nie odnotowałam wzrostu jego poziomu. W liniach HaCaT i A431 poziom transkryptów *HSPA2* spada po 24 godzinach hipoksji (wyniki przedstawione w rozdziale 3.2.), a po reoksygenacji jego ekspresja wzrasta powyżej poziomu kontroli (rycina 3.19.). Wzrost transkrypcji genu *HSPA2* przekłada się także na podwyższenie poziomu białka w komórkach HaCaT i A431 poddanych reoksygenacji.



Ryc.3.19. Analiza poziomu ekspresji *HSPA2* w keratynocytach poddanych reoksygenacji. A) Analiza poziomu transkryptów *HSPA2* metodą półilościowego RT-PCR. **B))** Analiza poziomu białka metodą Western blot. Analizę ekspresji *HSPA2* wykonano w komórkach linii HaCaT, NHEK i A431. K- komórki hodowane w warunkach standardowych, R 4h, R 8h – czas inkubacji komórek w warunkach reoksygenacji podany w godzinach. Zdjęcia reprezentatywne z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

W keratynocytach poddanych reoksygenacji poziom ekspresji genu *HSPA2* wzrasta. Jak można sądzić ekspresja genu *HSPA2* może być regulowana przez czynniki transkrypcyjne ulegające aktywacji w warunkach stresu oksydacyjnego. Jednym z takich czynników jest np. NF- κ B, dla potencjalne miejsce wiązania zlokalizowano w promotorze genu *HSPA2*. Powyższa hipoteza wymaga jednak dalszych badań, a jej weryfikacja nie była przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej.

4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI

Najważniejsze wyniki:

- Obniżenie stężenia tlenu z 21% do 1% (hipoksja) powoduje w komórkach HaCaT, w pierwotnych keratynocytach skóry NHEK, a także w komórkach nowotworowych linii A431 spadek ekspresji genu *HSPA2* zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Spadek aktywności genu *HSPA2* pod wpływem hipoksji wykazano także wykonując analize funkcjonalną promotora genu *HSPA2 in vitro*.
- Stosując metodę immunoprecypitacji chromatyny połączonej z ilościowym PCR wykazano, że w keratynocytach HaCaT białko HIF-1 α w warunkach hipoksji wiąże się preferencyjnie z fragmentami promotora genu *HSPA2* zawierającymi sekwencję HRE.
- Nadekspresja konstytutywnie stabilnego wariantu podjednostki HIF-1 α w standardowych warunkach hodowli (21% tlenu) skutkowała obniżeniem ekspresji endogennego genu *HSPA2*.
- Analiza funkcjonalna promotora genu *HSPA2* w komórkach HaCaT wykazała, że destabilizacja HIF-1 wywołana działaniem N-acetylocysteiny lub zahamowanie oddziaływania HIF-1 z elementem regulacyjnym HRE w wyniku traktowania komórek echinomycyną powoduje wzrost aktywności fragmentów promotora zawierających sekwencję HRE.
- Zablockowanie oddziaływania HIF-1 z sekwencją HRE w wyniku traktowania keratynocytów echinomycyną powoduje wzrost poziomu ekspresji endogennego genu *HSPA2*. W tych warunkach, jak wykazano metodą immunoprecypitacji chromatyny w połączeniu z ilościowym PCR, wydajność wiązania HIF-1 α do fragmentu promotora genu *HSPA2* zawierającego sekwencję HRE spada.

Najważniejsze wnioski:

- W keratynocytach naskórki i w komórkach HaCaT obniżenie stężenia tlenu (hipoksja) zmniejsza poziom ekspresji genu *HSPA2*. Przedstawione dane wskazują, że główną przyczyną obniżenia ekspresji badanego genu w keratynocytach poddanych hipoksji jest oddziaływanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1 z fragmentem DNA zawierającym sekwencję HRE. Gen *HSPA2* jest jednym z nielicznych genów, którego ekspresja może być hamowana w warunkach hipoksji poprzez bezpośrednie oddziaływanie czynnika HIF-1 z sekwencją HRE.

- Udział czynnika transkrypcyjnego HIF-1 w regulacji ekspresji genu *HSPA2* może być zróżnicowany i zależeć od typu komórek. Czynniki te mogą wpływać hamująco (komórki HaCaT) bądź aktywująco (komórki HeLa) na aktywność promotora genu *HSPA2*.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Bedogni B., Powell M.B. (2009) *Pigment Cell Melanoma Research* 22:166-174
2. Bedogni B., Welford S.M., Cassarino D.S., Nickoloff B.J., Giaccia A.J., Powell M.B. (2005) *Cancer Cell* 8:443-454
3. Bonnycastle L.L., Yu C-E., Hunt C.R., Trask B.J., Clancy K.P., Weber J.L., Patterson D., Schellenberg G.D. (1994) *Genomics* 23: 85-93
4. Boutin A.T., Weidemann A., Fu Z., Mesropian L., Gradin K., Jamora C., Wiesener M., Eckardt K-U., Koch C.J., Ellies L.G., Haddad G., Haase V.H., Simon M.C., Poellinger L., Powell F.L., Johnson R.S. (2008) *Cell* 133(2): 223-234
5. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J. (2007) *Journal of Molecular Medicine* 85: 1301-1307
6. Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., Grillon C., Kieda C. (2011) *J. Cell. Mol. Med.* 15(6): 1239-1253
7. Cho Y-S., Bae J-M., Chun Y-S., Chung J-H., Jeon Y-K., Kim I-S., Kim M-S., Park J-W. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:323-333
8. Evans S.M., Schrlau A.E., Chalian A.A., Zhang P., Koch C.J. (2006) *Journal of Investigative Dermatology* 126:2596-2606
9. Filipczak P.T. (2011) Ocena wpływu zahamowania syntezy białka HSPA2 na mechanizm śmierci komórek niedrobnokomórkowego raka płuca traktowanych cisplatyną, etopozydem i winblastyną. *Praca doktorska*
10. Garg M., Kanojia D., Saini S., Suri S., Gupta A., Surolia A., Suri A. (2010a) *Cancer* 116:3785-96
11. Garg M., Kanojia D., Seth A., Kumar R., Gupta A., Surolia A., Suri A. (2010b). *European Journal of Cancer* 46:207-215
12. Hoogsteen I.J., Marres H.A.M., Bussink J., van der Kogel A.J., Kaanders J.H.A.M. (2007) *Head and Neck* 29(6): 591-604
13. Huang W-J., Xia L-M., Zhu F., Huang B., Zhou C., Zhu H-F., Wang B., Chen B., Lei P., Shen G-X., Tian D-A. (2009) *Int. J. Cancer* 124:298-305
14. Ke Q., Costa M. (2006) *Molecular Pharmacology* 70:1469-1480
15. Koh M.Y., Spivak-Kroizman T.R., Powis G. (2008) *Trends in Biochemical Sciences* 33(11): 526-534
16. Kong D., Park E.J., Stephen A.G., Calvani M., Cardellina J.H., Monks A., Fisher R.J., Shoemaker R.H. Melillo G. (2005) *Cancer Research* 25: 9047-9055
17. Krawczyk Z., Szymik N., Wiśniewski J. (1987b). *Mol Biol Rep* 12(1): 35-41
18. Krawczyk Z., Wiśniewski J., Biesiada E. (1987a) *Molecular Biology Reports* 12:27-34
19. Liu W., Shen S-M., Zhao X-Y., Chen G-Q. (2012). *Int J Biochem Mol Biol* 3(2): 165-178
20. Nys K., Maes H., Dudek A.M., Agostinis P. (2011) *Biochimica et Biophysica Acta* 1816: 1-12
21. Rezvani H.R., Ali N., Nissen L.J., Harfouche G., de Verneuil H., Taieb A., Mazurier F. (2011a) *Journal of Investigative Dermatology* 131: 1793-1805
22. Rezvani H.R., Ali N., Serrano-Sanchez M., Dubus P., Varon C., Ged C., Pain C., Cario-Andre M., Seneschal J., Taieb A., de Verneuil H., Mazurier F. (2011b). *Journal of Cell Science* 124: 4172-4183
23. Richard D.E., Berra E., Gothie E., Roux D., Pouyssegur J. (1999). *The Journal of Biological Chemistry* 274(46): 32631-32637
24. Rofstad E.K., Galappathi K., Mathiesen B., Ruud E-B.M. (2007) *Clin Cancer Res* 13: 1971-1978
25. Rohde M., Daugaard M., Jensen M.H., Helin K., Nylandsted J., Jaattela M. (2005) *Genes and Development* 19: 570-582
26. Ruas J.L., Poellinger L., Pereira T. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277: 38723-38730
27. Sceneay J., Liu M.C.P., Chen A., Wong C.S.F., Bowtell D.D.L., Möller A. (2013) *PLOS One* 8(6): e66388
28. Ściegłńska D., Gogler - Pięłowska A., Butkiewicz D., Chekan M., Małusecka E., Harasim J., Habryka A., Krawczyk Z. (2014). *Anticancer Research* 34(6): 2833-2840
29. Ściegłńska D., Pięłowski W., Chekan M., Mazurek A., Krawczyk Z. (2011) *Histochem Cell Biol* 135: 337-350

30. Semenza G.L. (2009) Regulation of oxygen homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology* 24: 97-106
31. Semenza G.L. (2010) Oxygen homeostasis. *WIREs Syst Biol Med* 2: 336-361
32. Stenger C., Naves T., Veridier M., Ratinaud M-H. (2011) *International Journal of Oncology* 39: 601-609
33. Vaupel P., Harrison L. (2004) *Oncologist*; 9:4-9
34. Weir L., Robertson D., Leigh I.M., Vass J.K., Panteleyev A.A. (2011) *Biochimica et Biophysica Acta* 1813: 60-72
35. Wilson W.R., Hay M.P. (2011). *Nature Reviews- Cancer* 11: 393-410
36. Wiśniewski J., Malezewski M., Krawczyk Z., Gedamu L. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212: 137-143
37. Wouters A., Pauwels B., Lardon F., Vermoken J.B. (2007) *The Oncologist*; 12:690-712
38. Zakeri Z.F., Wolgemuth D.J., Hunt C.R. (1988). *Molecular and Cellular Biology.* 8(7): 2925-2932
39. Zhou J., Schmid T., Schnitzer S., Brune B. (2006) *Cancer Letters* 237: 10-21
40. Cangul H. (2004). *BMC Genetics* 5:27.
41. Olbryt M., Jarzab M., Jazowieca-Rakus J., Simek K., Szala S., Sochanik A. (2006). *Gene Expression* 13: 191-203
42. Ściegłńska D., Krawczyk Z. (2014) *Cell Stress and Chaperone* DOI: 10.1007/s12192-014-0548-x
43. Villar D., Ortiz-Barahona A., Gomez-Maldonado L., Pescador N., Sanchez-Cabo F., Hackl H., Rodriguez B.A.T., Trajanoski Z., Dopazo A., Huang T.H.M., Yan P.S., del Peso L. (2012). *PLOS One* 7(9): e45708.
44. Kimura H., Wiesz A., Kurashima Y., Hashimoto K., Ogura T., D'Acquisto F., Addeo R., Makuuchi M., Esumi H. (2000). *Blood* 95: 189-197
45. Dulak J., Tomala K., Łoboda A., Józkwicz A. (2004). *Life Science* 75: 2573-2586

Wykaz osiągnięć naukowych

Publikacje

1. Olbryt M., **Habryka A.**, Jarzab M., Student S., Tyszkiewicz T., Lisowska K. "Global gene expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia" *PLOS One* **2014**, 9(8): e105104, **IF 3,73**
2. Ściegłńska D, Gogler-Pigłowska A, Butkiewicz D, Chekan M, Malusecka E, Harasim J, **Habryka A**, Krawczyk Z. "HSPA2 chaperone protein is expressed in various human tumors and correlates with clinical features in non-small cell lung carcinoma patients" *Anticancer Research* **2014**, 34(6): 2833-2840 **IF 1,713**
3. Olbryt M., **Habryka A.**, Tyszkiewicz T., Rusin A., Cichoń T., Jarzab M., Krawczyk Z. „Melanoma associated genes, *MXII*, *MCAM*, *FNI*, *STAT3*, and *NME1* are hypoxia response in murine and human melanoma cells" *Melanoma Research* **2011**, 21:417-425. **IF 2,19**

Komunikaty zjazdowe

1. **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Kryj M., Sojka D., Krawczyk Z., Klyszcz K., Ściegłńska D. „Dual role of HIF-1 in regulation of HSPA2 gene in cancer and normal cells” (2014) XVIII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
2. Klarzyńska K., **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Głowala – Kościńska M., Kryj M., Herok M., Krawczyk Z., Ściegłńska D. „The expression and function of HSPA2 in human epidermal keratinocytes” (2014) XVIII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
3. Sojka D., **Habryka A.**, Filipczak P., Głowala-Kościńska M., Gogler-Pigłowska A., Krawczyk Z., Ściegłńska D. „HSPA2 role in Non-Small Cell Lung Carcinoma cells” (2014) XVIII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
4. Olbryt M., Rusin A., **Habryka A.**, Sochanik A., Priebe W. „Anti-melanoma activity of WP760 in various in vitro culturing conditions” (2014) XVIII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
5. Ściegłńska D., **Habryka A.**, Filipczak P., Gogler – Pigłowska A., Sojka D., Bojko U., Krawczyk Z. „HSPA2 chaperone protein modulates sensitivity of Non-Small Cell Lung Carcinoma cells to cisplatin.” (2014) 9th International Conference of Anticancer Research, Porto Carras, Sithonia, Greece, *Anticancer Research* 34(10) str. 6157
6. Olbryt M., Rusin A., Fokt I., **Habryka A.**, Sochanik A., Priebe W. "Anti-melanoma activity of WP760 in various *in vitro* culturing conditions." (2014) 9th International Conference of Anticancer Research, Porto Carras, Sithonia, Greece, *Anticancer Research* 34(10) str. 6086
7. **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Kryj M., Sojka D., Krawczyk Z., Ściegłńska D. "Role of hypoxia and Hypoxia Inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) in regulation of the *HSPA2* gene expression in human keratinocytes." (2014) EACR-23: From basic science to personalised cancer treatment, Munich, Germany, *European Journal of Cancer* 50(5) S126 **IF 5.061**
8. **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Kryj M., Krawczyk Z., Klarzyńska K., Ściegłńska D. "An intriguing role of HIF1 α in regulation of HSPA2 in keratinocytes." (2013) XVII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.

9. Klarzyńska K., **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Kryj M., Krawczyk Z., Sojka D., Ściegłińska D. „HSPA2 is a marker of epidermal undifferentiated keratinocytes” (2013) XVII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
10. **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Pyclik B., Kryj M., Krawczyk Z., Ściegłińska D. "Hypoxia downregulates *HSP* genes expression in human keratinocytes" (2013) 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, Polska, *Acta Biochemica Polonica*, Vol.60, Supplement 1/2013, **IF 1,49**
11. **Habryka A.**, Gogler – Pigłowska A., Pyclik B., Kryj M., Klyszcz K., Krawczyk Z., Ściegłińska D. "HSPs expression under hypoxia and oxidative stress in normal keratinocytes and skin squamous cell carcinoma (A431)" (2013) VI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Sheffield, Wielka Brytania, Oral presentation in **Session: Heat Shock Proteins in Cancer Radiotherapy**
12. Ściegłińska, Gogler-Pigłowska A., Butkiewicz D., Chekan M. , **Habryka A.**, Bojko U., Krawczyk Z. "The association of HSPA2 expression with prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients" (2013) VI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Sheffield, Wielka Brytania
13. **Habryka A.**, Byrska M., Gogler – Pigłowska A., Kryj M., Krawczyk Z., Ściegłińska D. „Is HSPA2 a marker of epidermal undifferentiated keratinocytes?” (2012) Seneka, Warszawa, Polska . Plakat P4, str.66-67 w książce abstraktów
14. **Habryka A.**, Byrska M., Gogler – Pigłowska A., **Habryka A.**, Byrska M., Gogler – Pigłowska A., „Differential expression of HSPA1 and HSPA2 in human epidermis” (2012) PTBioch, Poznań, Polska, *Acta Biochemica Polonica*, Vol.59, Supplement 3/2012, **IF 1,18**
15. Ściegłińska D., Filipczak P., Gogler – Pigłowska A., **Habryka A.**, Butkiewicz D., Krawczyk Z. „HSPA2 depletion augments cisplatin- induced macroautophagy in Non-Small Cell Lung Carcinoma cell lines” (2012) PTBioch, Poznań, Polska, *Acta Biochemica Polonica*, Vol.59, Supplement 3/2012, **IF 1,49**)
16. **Habryka A.**, Klockiewicz A., Klarzyńska K., Płachetka A., Krawczyk Z., Ściegłińska D. “Mechanism regulating HSPA2 gene expression in cancer and normal cells” (2011) XV Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
17. Klockiewicz A., **Habryka A.**, Kryj M., Krawczyk Z., Ściegłińska D. “Effect of extracellular calcium on the differentiation of HaCaT cells and the expression of HSPA2 protein”. (2011), XV Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
18. **Habryka A.**, Płachetka A., Krzemień K., Ściegłińska D., Krawczyk Z. „Regulation of human *HSPA2* gene expression” (2011) PTBioch, Kraków, Polska. *Acta Biochemica Polonica*, Vol.59, Supplement 3/2012, **IF 1,23** Oral presentation in **Session: Gasotransmitters and signal transduction.**
19. **Habryka A.**, Krzemień K., Olbryt M., Klarzyńska K., Krawczyk Z., Ściegłińska D. „Regulation of HSPS’ gene expression by hypoxia” (2010), XIV Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
20. Olbryt M., Jarzab M., **Habryka A.**, Tyszkiewicz T., Lisowska K., „Cycling vs chronic hypoxia response in tumor cells” (2010), XIV Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska.
21. Olbryt M., **Habryka A.**, Tyszkiewicz T., Rusin A., Cichoń T., Lisowska K., Krawczyk Z. „Gene expression signature of hypoxia in melanoma cells *in vitro* and *in vivo*” (2009) 7th World Congress on Melanoma, Vienna, Austria. Plakat nr P277, strona 414.

22. Olbryt M., **Habryka A.**, Tyszkiewicz T., Rusin A., Cichoń T., Lisowska K., Krawczyk Z. „Gene expression signature of hypoxia in melanoma cells *in vitro* and *in vivo*” (2009) XIII Gliwickie Spotkania Naukowe, Gliwice, Polska

Nagrody

II nagroda przyznana przez Stowarzyszenie na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem oraz European Association of Cancer Research za najlepszą prezentację plakatową na XVII Gliwickich Spotkaniach Naukowych, 15-16 listopad, 2013

Stypendia

Stypendium w ramach projektu UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-00, **2009-2013**

Stypendium projakościowe przyznawane przez Rektora Politechniki Śląskiej dla najlepszych studentów, **2009/2010 i 2011/2012**

Stypendium naukowe ze Stowarzyszenia na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem, 01.07.-30.09.2014

Szkolenia i staże

27.03.-03.07.2012 - Szkolenie w zakresie przygotowania do pracy w charakterze kierownika projektów badawczych (Politechnika Śląska, Gliwice)

01.06.-31.08.2013 - **staż naukowy** w Zakładzie Biologii Molekularnej **Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej** w Warszawie. Opiekun: prof. Alicja Żylicz

22-23.10.2013 - Szkolenie oraz warsztaty "Handling and Application Training on Cytation™3 Cell Imaging Multi-Mode Reader and Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System" zorganizowane przez BioTek Instruments, Inc and BIOKOM s.j. oraz Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej (Politechnika Śląska, Gliwice)

09-10.01.2014 - Warsztaty badawcze "Mikroskopia konfokalna w badaniach materiałowych" zorganizowane przez Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej oraz OLYMPUS Polska (Politechnika Śląska, Gliwice).

20.05.2014 - Uczestnictwo w seminarium naukowym poświęconym tematyce: "Odwrotna transkrypcja i Real-time PCR - technika, źródła najczęstszych problemów i ich rozwiązania, Klonowanie molekularne - optymalizacja techniki oraz Technologia RNAi i jej zastosowanie w badaniach biologicznych" organizowane przez firmę Abo we współpracy z firmami Thermo Scientific oraz Dharmacon (Uniwersytet Jagielloński, Kraków).

Udział w projektach

Grant **N401 683740** (05.2011 - 03.2015) "Rola białka HSPA2 należącego do rodziny białek opiekuńczych HSP70 w procesie proliferacji komórek warstwy bazalnej naskórka" CO-I, Gliwice, **wykonawca**

Grant **2012/05/N/NZ1/00022** (20.03.2013 – 21.03. 2015) „Badanie mechanizmu regulacji ekspresji genu HSPA2 w wybranych komórkach somatycznych” CO-I, Gliwice, **kierownik**

Grant **2013/09/N/NZ5/01815** (2014 - 2017) „Wpływ białka HSPA2, należącego do rodziny białek szoku termicznego HSPA (HSP70), na modulowanie wrażliwości komórek niedrobnokomórkowego raka płuca na pochodne platyny”, CO-I Gliwice, **wykonawca**