



Ocena

dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego, oraz ocena osiągnięcia naukowego „Interleukina 1 i epidermalny czynnik wzrostu regulują ekspresję genów istotnych w przebiegu stanu zapalnego i procesów nowotworowych poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego Elk-1” dr Anety Kaszy, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

1. Informacje podstawowe o kandydatce. Przebieg kariery naukowej, tematyka badań, staże naukowe, uczestnictwo w projektach grantowych, nagrody.

Dr Aneta Kasza jest absolwentką Uniwersytetu Jagiellońskiego. Studia wyższe ukończyła w 1992 roku z oceną bardzo dobrą. Pracę magisterską zatytułowaną: „Wpływ kwasu retinowego na syntezę białek ostrej fazy przez komórki wątrobiaka ludzkiego HepG2”, której promotorem był prof. dr hab. Aleksander Koj Habilitantka wykonała w Zakładzie Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej UJ uzyskując tytuł magistra biologii, ze specjalnością biologią molekularną.

Bezpośrednio po zakończeniu studiów mgr Aneta Kasza rozpoczęła studia doktoranckie (UJ). Pracę doktorską zatytułowaną: „Rola receptorów z rodziny receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości w procesie degradacji kompleksów proteinaza/inhibitor proteinazy”, której promotorem był dr hab. (obecnie profesor) Adam Dubin Habilitantka wykonała w wyżej wymienionym zakładzie. Rozprawę doktorską mgr Aneta Kasza obroniła w 1997 uzyskując tytuł naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. W tym samym roku została zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Biochemii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej, którego ówczesnym kierownikiem był prof. dr hab. Aleksander Koj. Obecnie, od 2001 roku, dr Aneta Kasza jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biochemii Komórki.

Tematyka badań dr Anety Kaszy od początku kariery naukowej dotyczy zagadnień związanych z procesem zapalnym i jego związku z procesem nowotworowym. Zainteresowania Habilitantki koncentrują się na wyjaśnianiu mechanizmów regulacji ekspresji wybranych genów kodujących białka o istotnym znaczeniu dla przebiegu wymienionych procesów. Dr Aneta Kasza ma doskonale opanowany nowoczesny warsztat badawczy z zakresu biologii molekularnej i komórkowej, co umożliwia jej badanie mechanizmu ekspresji genów na wszystkich poziomach, a więc inicjacji transkrypcji, translacji, modyfikacji potranslacyjnych, a także ścieżek przekazywania sygnału. Od zakończenia pracy doktorskiej dr Aneta Kasza poświęca najwięcej uwagi wyjaśnianiu udziału czynnika transkrypcyjnego Elk-1 w modulowaniu ekspresji genów w komórkach układu immunologicznego i komórkach nowotworowych stymulowanych cytokinami prozapalnymi. Najważniejsze osiągnięcia dokonane w wyniku prowadzonych badań są zawarte w publikacjach stanowiących podstawę habilitacji.

Profil badawczy i kariera naukowa dr Anety Kaszy kształtowała się w pod wpływem i pod opieką wybitnych przedstawicieli polskiej nauki, w środowisku niezwykle sprzyjającym prowadzeniu doskonałych prac badawczych, zawsze skutkujących osiągnięciami o wysokiej wartości naukowej i znaczeniu międzynarodowym. Ponadto, na rozwój naukowy i

doskonalenie warsztatu metodycznego dr Anety Kaszy miało odbycie szeregu szkoleń w starannie wybranych ośrodkach zagranicznych.

W latach 1995-2004 dr Aneta Kasza odbyła 3 krótkoterminowe staże: w 1995 roku 8 miesięczny staż na Uniwersytecie w Aarhus (Dania), w zespole prof. Petera Andreasena; w 2002 roku 3 miesięczny staż na Uniwersytecie w Cleveland (USA), w zespole prof. Tomasza Korduli; w 2002 roku 1 miesięczny staż w Northwick Park Institute for Medical Research w Londynie, oraz w latach 2002-2004 najważniejszy, 27 miesięczny staż na Uniwersytecie w Manchesterze (wielka Brytania) w zespole prof. Andrew Sharrocks'a. Każdy z wymienionych staży naukowych dr Aneta Kasza wykorzystała efektywnie, uczestnicząc w badaniach nie tylko mieszczących się w profilu jej zainteresowań, ale także których wynikiem była co najmniej jedna publikacja w renomowanych czasopismach. Szczególne znaczenie ostatniego z wymienionych pobytów naukowych, wynika stąd, że zespół kierowany przez prof. Sharrocks'a od wielu lat zajmuje się badaniem czynników transkrypcji z grupy ETS a w szczególności czynnikami tworzącymi tzw. kompleks trójskładnikowy (czynniki TCF), do których należy czynnik transkrypcyjny Elk-1, kontrolujący ekspresję genów będących przedmiotem badań dr Anety Kaszy.

Ważnym elementem rozwoju naukowego jest nabywanie umiejętności koniecznych do skutecznego aplikowania o zdobywanie funduszy na badania własne, oraz stałe pogłębianie wiedzy i umiejętności warsztatowych, co powoduje, że młody pracownik naukowy staje się wartościowym członkiem innych zespołów badawczych. Należy tutaj podkreślić samodzielne kierownictwo dr Anety Kaszy w trzech projektach i jej udział jako wykonawcy w trzech innych. Zaangażowanie dr Anety Kaszy w pracę badawczą i osiąganie znaczących wyników o dużej wartości naukowej zostało wielokrotnie zauważone i honorowane przyznawaniem stypendiów w tym przez instytucje takie, jak Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej (trzykrotnie), fundację The Wellcome Trust (dwukrotnie) i Fundację Batorego. Dr Aneta Kasza była także beneficjentką programu L'OREAL dla Kobiet i Nauki UNESCO, oraz otrzymała stypendium rektorskiego Funduszu Stypendialnego i nagrodę Rektora UJ.

2. Ogólna ocena dorobku publikacyjnego, w tym publikacji niewchodzących w cykl prac będących podstawą postępowania habilitacyjnego

Prace oryginalne. Dorobek naukowy dr Anety Kaszy jest bez wątpienia znaczący, zarówno pod względem liczby publikacji w czasopismach indeksowanych (baza JCR) uznanych przez międzynarodowe środowisko naukowe jako renomowane, jak również pod względem wartości naukowej opublikowanych prac. W okresie poprzedzającym zakończenie przewodu doktorskiego ukazały się 3 prace, w czasopismach o łącznym IF = 5.1; we wszystkich dr Aneta Kasza jest pierwszym autorem. Po doktoracie dorobek publikacyjny dr Anety Kaszy powiększył się o 19 prac, z czego 4, to prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie JRC. Przed doktoratem Aneta Kasza opublikowała jedną pracę przeglądową, która ukazała się w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki”; dr Aneta Kasza jest jej pierwszym autorem. Po doktoracie dr Aneta Kasza była samodzielnym autorem lub współautorem 6 prac przeglądowych. Dwie zostały opublikowane w czasopiśmie „Postępy biochemii”; w jednej z nich dr Aneta Kasza jest samodzielnym autorem. Jedna z wymienionych 5 prac jest również opracowaniem samodzielnym dr Anety Kaszy i stanowi rozdział w wydawnictwie o charakterze skryptu. Na szczególną uwagę zasługuje jednak praca przeglądowa napisana w języku angielskim i opublikowana w 2013 roku w czasopiśmie *Cytokine* (IF=3.019) mającym znaczne oddziaływanie międzynarodowe. Publikacja ta została słusznie włączona w skład osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego; dr Aneta Kasza jest samodzielnym autorem tego znakomitego artykułu.

Powyższe prace świadczą o aktywnym zaangażowaniu dr Anety Kaszy w działalność popularyzatorską.

Do dorobku naukowego, który jednocześnie należy zaliczyć do osiągnięć w pracy dydaktycznej dr Anety Kaszy należy współudział w przygotowywaniu rozdziałów do trzech skryptów serii wydawniczej Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, oraz do interaktywnej wersji skryptu „Genetyka molekularna”.

Sumaryczny IF prac opublikowanych przed doktoratem wynosi 5.089. Sumaryczny IF prac opublikowanych po doktoracie (a przed złożeniem wniosku o wszczęcie przewodu habilitacyjnego) wynosi 50.183. Sumaryczny IF pięciu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 18.92. Łącznie, IF wszystkich publikacji wynosi 74.2; liczba cytowań przekracza 480, a indeks Hirscha wynosi 12. Dorobek naukowy dr Anety Kaszy oceniam bardzo wysoko zarówno z uwagi na liczbę opublikowanych prac jak również z uwagi na ich wybitną wartość naukową.

3. Tematyka prac badawczych wykonanych przed doktoratem

Przed doktoratem Habilitantka opublikowała 3 prace. W każdej z nich jest pierwszym autorem, oceniając jednocześnie swój udział w badaniach w kolejnych pracach na 30%, 40% i 50%. Problematyka wszystkich prac wiąże się z procesem zapalnym. W pierwszej pracy dr Aneta Kasza wykazała, że komórki ludzkie HepG2 wywodzące się z raka wątroby, mogą być stosowane jako komórki modelowe w badaniach procesów molekularnych zachodzących w czasie procesu zapalnego. Problematyka kolejnych prac dotyczy inhibitorów proteaz serynowych. W jednej z prac opisano procedurę konstruowania wektora ekspresyjnego kodującego rekombinowany inhibitor elastazy końskiej, oraz metody wydajnego otrzymywania tego enzymu w systemie bakteryjnym. Po uzyskaniu oczekiwanego produktu dr Aneta Kasza wykonała badania *in vivo* na modelu szczurzym wykazując, że rekombinowany inhibitor ma cechy pozwalające na potencjalne terapeutyczne zastosowania. Ostatnia z prac opublikowanych przed doktoratem poświęcona była zbadaniu swoistości oddziaływań pomiędzy wybranymi receptorami biorącymi udział w endocytozie a kompleksami proteaz serynowych i ich inhibitorów, serpin. Jak wykazano, dwa badane receptory lipoprotein o małej gęstości różnią się swoistością oddziaływań z kompleksami proteinaza serynowa-serpina, co wskazuje, że mogą one różnić się funkcjonalnie.

4. Tematyka prac badawczych wykonanych po doktoracie

W dorobku publikacyjnym obejmującym oryginalne prace badawcze opublikowane po doktoracie (bez prac włączonych do habilitacji) znajduje się 6 publikacji, w których udział Habilitantka ocenia na co najmniej 40% (dwie prace), 50% (jedna praca), 60%, dwie prace i 80% (jedna praca). Ponadto w omawianym dorobku znajduje się 6 prac, w wykonaniu których Habilitantka ocenia swój udział na 5%-10%.

Tematyka badawcza prac, w których deklarowany jest udział powyżej 40% była zróżnicowana jakkolwiek mieszcząca się w problematyce procesu zapalnego. Główny nurt badawczy dotyczył pogłębiania wiedzy o czynnikach modulujących ekspresję głównych genów kodujących białka systemu aktywacji plazminogenu w komórkach gwiazdki linii U373-MG. Badając wpływ cytokin prozapalnych IL-1 β , TNF α , INF- γ oraz naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) na poziom transkrypcji genów kodujących aktywatory plazminogenu (TPA i uPA), inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1) oraz, podobnie jak PAI-1 należąca do serpin proteazę neksynę, dr Aneta Kasza wskazała EGF i INF- γ jako nowe czynniki mogące wpływać na stan zewnątrzkomórkowej macierzy w mózgu. Wykazała jednocześnie, że cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-4, IL-13 oraz IL-10 nie wywoływały istotnych zmian w poziomie ekspresji badanych genów. Poszukując mechanizmu aktywacji transkrypcji

genu *PAI-1* przez IL-1, wykazała, że stymulowanie komórek tą cytokiną prozapalną pobudza ekspresję genu kodującego czynniki transkrypcji tworzące heterodimer c-fos/c-jun. Habilitantka wykazała, że ten sam mechanizm funkcjonuje także w przypadku indukowania ekspresji genu *PAI-1* przez onkostatinę.

Niezwykle interesującymi badaniami, których problematyka łączy się częściowo z problematyką badań prowadzonych przez Habilitantkę przed doktoratem było wyjaśnienie zróżnicowanej komórkowo ekspresji genów kodujących szereg proteaz należących do rodziny serpin. Geny te zgrupowane są w genomie ludzkim na chromosomie 14 w regionie 14q32.1 i ulegają odmiennej ekspresji w hepatocytach i astrocytach. Wynikiem badań, w których uczestniczyła Habilitantka we współpracy z zespołem prof. Tomasza Korduli było wykazanie, że za odmienny wzór ekspresji omawianych genów odpowiada różnica w strukturze chromatyny w ich regionach promotorowych.

Jak już wspomniałem powyżej w dorobku naukowym Habilitantki po doktoracie znajduje się 6 prac, w wykonaniu których ocenia swój udział na 5%-10%. Według deklaracji, udział ten polegał na wykonaniu części badań, interpretacji wyników i ich opracowaniu. Tematyka badań była zróżnicowana i dotyczyła: zbadania wpływu otrzymywanego z roślin laktonu seskwiterpenowego na aktywności IL-1 w kontekście potencjalnego zastosowania tego związku jako czynnika przeciwzapalnego; badania wpływu oksygenazy hemowej na aktywność genu kodującego czynnik wzrostu śródbłónka naczyń w warunkach hipoksji i normoksji; badania aktywacji metaloproteinazy TIMP-1 przez IL-1 w astrocytach, oraz badania mechanizmu regulacji ekspresji genu kodującego mitochondrialne białko mitynę. Cztery prace powstały we współpracy z kolegami z ośrodków zagranicznych.

5. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej.

Działalność dydaktyczna jest jednym z podstawowych obowiązków pracowników naukowo-badawczych zatrudnionych w wyższej uczelni. Od 1992 roku dr Aneta Kasza prowadzi dla studentów biologii ćwiczenia z biochemii; w latach 1998-2003 zakres obowiązków dydaktycznych Habilitantki został poszerzony o prowadzenie ćwiczeń z podstawowych technik biologii molekularnej i biotechnologii, a od 2004 roku prowadzi ćwiczenia z genetyki molekularnej. Równolegle, od 2007 roku prowadzi także wykłady z zakresu genetyki molekularnej dla studentów specjalizujących się w biotechnologii, a od 2001 roku wykłady o podobnej tematyce dla studentów specjalizujących się w neurobiologii. Wybrani studenci biorą także udział w badaniach naukowych, które prowadzi Habilitantka. Należy podkreślić, że ci studenci, którzy wnoszą dostateczny wkład w realizację zadań badawczych, są uwzględniani jako współautorzy publikacji i komunikatów zjazdowych.

Dr Aneta Kasza jest promotorem 17 ukończonych prac magisterskich i 10 licencjackich, a w obecnym roku akademickim opiekuje się kolejnymi 5 magistrantami i dwoma studentami studiów pierwszego stopnia. Pod opieką dr Anety Kaszy znajduje się obecnie także dwóch doktorantów przygotowujących się do otwarcia przewodu doktorskiego. Do osiągnięć w zakresie dydaktyki należy bez wątpienia zaliczyć opracowanie 4 skryptów dydaktycznych. Za szczególne osiągnięcia dydaktyczne dr Aneta Kasza została uhonorowana w 2012 roku nagrodą Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego (nagroda zespołowa III stopnia).

W zakresie działalności organizacyjnej dr Aneta Kasza nie ma jeszcze zbyt wielu osiągnięć, co jest zrozumiałe, ponieważ na ogół tego typu działalność nasila się po uzyskaniu stopnia dr. habilitowanego. Do elementów działalności organizacyjnej można jednak zaliczyć skuteczne uzyskiwanie funduszy na działalność badawczą. W tym zakresie należy podkreślić, że dr Aneta Kasza była kierownikiem jednego, zakończonego już projektu grantowego, a obecnie kieruje dwoma biegnącymi.

Oceniając dotychczasowy przebieg kariery naukowej, w tym kierowanie trzema projektami grantowymi, umiejętność nawiązywania współpracy z innymi ośrodkami badawczymi, a także biorąc pod uwagę szeroką, zróżnicowaną aktywność dydaktyczną, nie mam wątpliwości, że dr Aneta Kasza ma zdolności organizacyjne, które będzie mogła wykorzystać w stosownym czasie.

6. Podsumowanie i ocena wyników wszystkich prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Problematyka badawcza, prac przedstawionych przez dr Anetę Kaszę dotyczy charakteryzowania struktury promotorów genów, które – jak można było sądzić na podstawie wzoru ich ekspresji – mogą znajdować się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego Elk-1. Białko to należy do jednej z największych rodzin czynników nazywanej Ets (ang. *E-twenty six*), regulujących ekspresję genów, których produkty biorą udział w kontrolowaniu rozmaitych procesów biologicznych, w tym nowotworzenia i stanu zapalnego. Charakterystyczną cechą strukturalną czynników ETS jest obecność domeny ETS, oddziałującej z DNA poprzez rozpoznanie motywu *ets* o sekwencji rdzeniowej 5'-GGA(A/T)-3' otoczonej nukleotydami o zmiennej sekwencji, co warunkuje zróżnicowaną swoistość oddziaływań tych czynników z promotorami różnych genów. Identyfikowanie miejsc wiązania się czynników Ets z DNA nie jest proste, ponieważ czynniki te mogą rozpoznawać sekwencje DNA odbiegające znacznie od sekwencji zgodności, zwłaszcza wtedy, gdy w procesie aktywacji transkrypcji czynnik z rodziny ETS tworzy kompleks z innym czynnikiem, którego miejsce wiązania znajduje się w pobliżu sekwencji regulatorowej *ets*.

Czynnik transkrypcji Elk-1 będący głównym przedmiotem badań Habilitantki należy do podrodziny czynników Ets, nazywanej TCF (ang. ternary transcription factors), do której zaliczane są czynniki transkrypcji, które funkcjonują głównie w kompleksie z dimerem czynnika transkrypcyjnego SRF (ang. *serum response factor*) wiążącego się z sekwencją regulatorową DNA nazywaną SRE (ang. *serum response element*, w obrębie której znajduje się także element regulatorowy „cis” *ets*, wiążący domenę EBS czynników TCF, w tym oczywiście czynnika Elk-1. Kluczowe znaczenie dla powstania kompleksu czynników TCF (w tym czynnika Elk-1) z czynnikiem SRF jest domena B zlokalizowana w części TCF. Czynniki TCF (w tym Elk-1) jeśli nie są aktywowane znajdują się w stanie autoinaktywacji. W przypadku czynnika Elk-1 kluczowym etapem aktywacji jest fosforylacja jednej z domen przez kinazy ścieżek sygnałowych ERK, JNK i p38.

Wielość genów, które mogą potencjalnie w regionie promotorowym zawierać miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego Elk-1, możliwość współdziałania tego czynnika z innymi czynnikami transkrypcji, złożony proces aktywacji Elk-1, oraz wielokierunkowość efektów ekspresji genów będących pod kontrolą Elk-1, powoduje, że mechanizm aktywacji transkrypcji przez Elk-1 musi być badany indywidualnie dla każdego genu i w odniesieniu do określonego procesu biologicznego.

Cykl prac, w których opisane są badania stanowiące osiągnięcie naukowe dr Anety Kaszy i będące podstawą do przeprowadzenia przewodu habilitacyjnego dotyczy, w ogólnym ujęciu, wyjaśniania współdziałania czynnika Elk-1 z innymi czynnikami transkrypcji, mechanizmu jego aktywacji, oraz definiowania miejsc wiązania w obszarze promotorowym kilku wybranych genów, których ekspresja ma istotne znaczenie w procesie zapalnym i nowotworowym. Wybór genów będących przedmiotem badań i celowość prowadzonych analiz, oraz potencjalne znaczenie wyników prac jest w sposób przekonujący przedstawiony przez Habilitantkę w obszernym, kilkustronicowym wprowadzeniu zawartym w autoreferacie i nie ma powodu, aby ponownie ten aspekt wniosku przytaczać.

W dalszej części recenzji skoncentruję się jedynie na skrótowym przedstawieniu wyników badań każdej z załączonych prac oraz podsumuję zasadnicze elementy nowości będące oryginalnym osiągnięciem naukowym Habilitantki.

Praca No1. "The ETS Domain Transcription Factor Elk-1 Regulates the expression of its Partner Protein, SRF". (2005). Kasza A, O'Donnell A, Gascoigne K, Zeef LA, Hayes A, Sharrocks AD. Biol. Chem. 280, 1149-1155. [IF = 5,328].

W czasie, kiedy dr Aneta Kasza prowadziła badania opisane w powyższej publikacji, przedmiotem intensywnych poszukiwań w zakresie regulacji transkrypcji genów było charakteryzowanie genów, których aktywność zależy od kooperacji czynników z rodziny TCF z czynnikiem SRF, oraz wyjaśnienie mechanizmu inicjacji transkrypcji genów zawierających w regionie promotora element SRE (ang. *serum response element*). Szczegółowym problemem, jaki był przedmiotem badań opisanych w powyższej pracy, było wyjaśnienie czy czynnik transkrypcyjny Elk-1 może działać niezależnie od SRF, czy też wiązanie się SRF z sekwencjami SRE jest warunkiem koniecznym, decydującym o rekrutacji określonego TCF (w omawianej pracy Elk-1) i powstanie trójskładnikowego kompleksu transkrypcyjnego.

W badaniach posłużono się linią komórek 293 stabilnie transferowaną genem chimerycznym kodującym fuzyjne białko Elk-En, powstałe w wyniku połączenia Elk-1 z domeną o cechach represora transkrypcji. Oczekiwano, że jeśli zostanie wymuszona ekspresja transgenu, wtedy chimeryczne białko rozpozna promotory wszystkich genów, w których znajdują się sekwencje DNA wiążące TCF i zablokuje ich ekspresję. W wyniku wykonania analizy porównawczej globalnego profilu ekspresji genów z zastosowaniem mikromacierzy Affymetrix pomiędzy komórkami stymulowanymi i niestymulowanymi PA wykazano, że czynnik transkrypcyjny Elk-1 stymuluje transkrypcję genu *SRF*, kodującego białko partnerskie, tworzące kompleks z Elk-1. Aby wyjaśnić czy Elk1 może działać samodzielnie skonstruowano linie komórkową, Elk-En(L158P), w której do transgenu Elk-En wprowadzono mutację uniemożliwiającą oddziaływanie z SRF. Wynik doświadczenia wykazał, że zmutowany czynnik Elk-En nie blokował transkrypcji genu *SRF*, zatem gen ten znajduje się pod kontrolą kompleksu SRF z Elk-1, a obserwację tę potwierdzono stosując właściwie zaprojektowane testy transfekcyjne.

Powyższe badania poszerzone o analizę z zastosowaniem metody EMSA (gel retardation), wskazały, że transkrypcja genu *SRF* aktywowana jest w wyniku tworzenia kompleksu SRF-Elk-1 a kluczowe znaczenie w powstaniu kompleksu ma domena B czynnika Elk-1. Kompleks ten wiąże się z DNA w regionie, w którym znajdują się dwie sekwencje CA₂G będące miejscem wiązania dimeru SRF, a do funkcjonalnych oddziaływań z DNA wymagana jest prawidłowa struktura sekwencji regulatorowej *ets*. Immunoprecypitacja chromatyny z zastosowaniem przeciwciała reagującego z Elk-1, potwierdziła wiązania się tego czynnika transkrypcji z sekwencjami promotora *SRF in vivo*. Aby wyjaśnić, która ze ścieżek aktywacji kompleksu SRF-Elk-1, czy ścieżka ERK i JNK aktywująca koaktywatory należące do grupy TCF współdziałające z SRF, czy ścieżka Rho aktywują współdziałające z SRF czynniki MAL użyto inhibitorów blokujące aktywność kluczowych kinaz, wykazując, że istotne znaczenie w procesie aktywacji transkrypcji genu *SRF* przez kompleks czynników transkrypcyjnych SRF-Elk-1 ma ścieżka ERK1/2.

Praca No2. "Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1". (2010). Paulina Wyrzykowska, Krystyna Stalińska, Mateusz Wawro, Jakub Kochan, Aneta Kasza. Biochimica et Biophysica Acta, 1799, 616–621. [IF = 4.00]

Wykrycie, że w aktywacji transkrypcji genu *SRF* istotną rolę pełni czynnik transkrypcyjny Elk-1, skłoniło Habilitantkę do poszukiwań innych genów, w których aktywację mógłby ten czynnik być zaangażowany. W pierwszej kolejności dr Aneta Kasza skierowała uwagę na gen kodujący PAI-1; (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*). Na

wybór tego genu, jako obiektu badań wpłynęła obserwacja, że PAI-1 może promować proces przerzutowania, a nadekspresja tej proteazy wiązana jest ze złą prognozą w rozmaitych nowotworach, oraz że gen *PAI-1* jest silnie aktywowany przez oddziaływanie czynnika wzrostu EGF z receptorem EGFR, aczkolwiek mechanizm pobudzania tej ekspresji nie był wtedy zbyt jasny.

Habilitantka wraz z zespołem prowadząc badania na modelowych komórkach raka szyjki macicy wykazała, że EGF aktywuje ścieżkę ERK1/2, zatem pojawiła się przesłanka aby sądzić, że EGF uruchamiając ścieżkę ERK, może pobudzać transkrypcję genu PAI-1 poprzez aktywację czynnika Elk-1. Gdyby tak było w istocie, wtedy taka obserwacja mogłaby mieć implikacje terapeutyczne. W systemie transfekcyjnym *in vitro* wykazano, że fuzyjne czynniki transkrypcyjne Elk-VP16 (induktor) i Elk-En (represor) odpowiednio stymulują i hamują transkrypcję transgenu zawierającego gen wskaźnikowy lucyferazy połączony z fragmentem promotora genu PAI-1. Następnie, po przygotowaniu szeregu mutantów delecyjnych i wykonaniu klasycznej analizy funkcjonalnej promotora wykazano, że najkrótsza sekwencja zapewniająca indukowalność poprzez czynnik Elk-1, to fragment DNA o długości 140 pz poprzedzający miejsce inicjacji transkrypcji genu PAI-1, w którym wykryto sekwencję nukleotydów o potencjalnych właściwościach wiązania Elk-1 i potwierdzono doświadczalnie, że jest to funkcjonalny element regulacyjny „*cis*”. Następnie, metodą immunoprecypitacji chromatyny wykazano, że w promotorze endogennego genu *PAI-1* zidentyfikowany element regulacyjny „*cis*” wiąże czynnik Elk-1. W powyższej pracy dr Aneta Kasza była autorem korespondencyjnym.

Nadzwyczaj ważnym wynikiem było wykazanie, że w badanych regionach genu i jego otoczenia nie występuje sekwencja regulatorowa CARG box będąca miejscem wiązania czynnika SRF i udowodnienie, że Elk-1 aktywuje ekspresję genu *PAI-1* samodzielnie, ale aby stał się aktywny musi ulec swoistej fosforylacji przez kinazy ERK.

Praca No3. “Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of ZC3H12A Expression”. (2010). Aneta Kasza, Paulina Wyrzykowska, Irena Horwacik, Piotr Tymoszek, Danuta Mizgalska, Karren Palmer, Hanna Rokita, Andrew Sharrocks, Jolanta Jura. BMC Mol. Biol., 11:14. [IF = 3.188].

Powyższa praca przedstawia poszukiwania sekwencji regulacyjnych genu *ZC3H12A* (kodującego białko MCPI-1), istotnych dla aktywacji tego genu w komórkach stymulowanych IL-1 β . Należy zaznaczyć, że gen kodujący MCPI-1 został wykryty stosunkowo niedawno, (w latach 2006-2008) równolegle przez dwa zespoły, a jednym z nich był zespół, w którym pracuje Habilitantka. Obecnie wiadomo, że gen *ZC3H12A* pełni rolę głównego przełącznika (ang. „*master gene*”) kontrolującego proces zapalny. O ile funkcja białka MCPI jest stosunkowo dobrze poznana, to proces aktywacji transkrypcji genu kodującego to białka był, w momencie podejmowania przez Habilitantkę badań, nie był w pełni poznany.

Inspiracją do podjęcia badań była obserwacja szybkiego wzrostu poziomu transkryptu genu *ZC3H12A* w monocytach, fibroblastach i komórkach HepG2 po stymulacji komórek prozapalną cytokiną IL-1 β . Jak następnie wykazano, ekspozycja komórek na tę cytokinę uruchamia ścieżki sygnałowe kinaz aktywujących czynnik transkrypcji NF- κ B, a także - będące przedmiotem zainteresowania Habilitantki - czynniki transkrypcyjne z grupy TCF, w tym Elk-1 (szlak zależny od kinaz ERK, p38 i JNK). Wcześniejsze badania wykazały, że aktywacja transkrypcji genu *ZC3H12A* zależy od aktywacji czynnika transkrypcji NF- κ B, przy czym sekwencje DNA wiążące ten czynnik wykryto w drugim intronie genu, a więc w znacznym oddaleniu od miejsca inicjacji transkrypcji. Okazało się zatem konieczne wyjaśnienie, czy w proces inicjacji transkrypcji genu *ZC3H12A* mogą być także zaangażowane elementy regulacyjne „*cis*” zlokalizowane przed genem, oraz czynniki transkrypcyjne TCF, a w szczególności czynnik Elk-1.

Podstawowym modelem badawczym Habilitantki były komórki HepG2, oraz genetycznie modyfikowane pochodne tej linii, a mianowicie komórki HepG2 stabilnie

transferowane retrowirusowym wektorem kodującym niedegradowalną formę IκBα, co powodowało konstytutywną nieaktywność czynnika NF-κB. Wykorzystując ten układ modelowy, oraz prowadząc badania z użyciem inhibitora kinazy aktywującej kinazę ERK1/2, uzyskano pewność, że oprócz NF-κB także inne elementy regulacyjne „*trans*” biorą udział w aktywacji genu *ZC3H12A*, które oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez tę ścieżkę przekazu sygnału zależną od ERK1/2.

Następnie, na podstawie wyników funkcjonalnej analizy promotora genu *ZC3H12A* oraz analizy *in silico* wykazano, że krytyczne elementy regulacyjne „*cis*” aktywujące transkrypcję genu istotnie, jak spodziewano się, znajdują się w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji genu. W zdefiniowanym fragmencie promotora wykryto sekwencję DNA oddziałującą z czynnikiem transkrypcyjnym Elk-1, oraz sekwencję zbliżoną strukturalnie do elementu regulacyjnego CARG mogącą oddziaływać z czynnikiem transkrypcyjnym SRF. Oddziaływanie wymienionych sekwencji z Elk-1 i SRF potwierdzono doświadczalnie posługując się analizą mutacyjną połączoną z analizą EMSA, a także wykonując test immunoprecypitacji. Zatem gen *ZC3H12A* został wskazany, jako kolejny nowy gen znajdujący się pod kontrolą czynnika Elk-1.

Jednocześnie wykazano, że czynnik Elk-1 jest stale związany z sekwencjami DNA w obszarze promotora genu *ZC3H12A*, ale aby stał się czynnikiem aktywnym transkrypcyjnie musi ulec fosforylacji poprzez uruchamianie ścieżki sygnałowej ERK. Ponadto wykazano, że aktywacja genu *ZC3H12A* przez IL-1β i w konsekwencji wzrost poziomu białka MCP-1 prowadzi do wytłumienia sygnału generowanego przez tę cytokinę na skutek udziału białka MCP-1 w degradacji mRNA IL-1β.

Praca No4. “EGF activates TTP expression by activation of ELK-1 and EGR-1 transcription factors”.

(2012). Magdalena Florkowska, Piotr Tymoszek, Aleksandra Balwierz, Anna Skucha, Jakub Kochan, Mateusz Wawro, Krystyna Stalinska and **Aneta Kasza**. BMC Molecular Biology, 13:18 [IF = 2.86].

Kolejny gen, *ZFP36*, będący obiektem badawczym dr Anety Kaszy koduje białko TTP o właściwościach podobnych do właściwości białka MCP-1. TTP wiążąc się swoiście z regionem 3'UTR mRNA niektórych genów w tym cytokin, czynników prozapalnych, oraz białek o istotnym znaczeniu w przerzutowaniu niektórych nowotworów, bierze udział w procesie kierowania tych mRNA do degradacji. Przystępując do charakteryzowania mechanizmu regulacji transkrypcji genu *ZFP36* dr Aneta Kasza wraz z zespołem wykazała, że stymulacja komórek MCF-7 wywodzących się z raka piersi przez EGF prowadzi do szybkiego i znaczącego wzrostu poziomu mRNA genu *ZFP36*. Badanie metodą western z zastosowaniem przeciwciała przeciwko fosforylowanej formie ERK1/2 wykazało, że w wyniku stymulacji aktywowana jest ścieżka ERK.

W celu zlokalizowania regionu promotora genu *ZFP36* w którym znajdują się sekwencje regulatorowe „*cis*” oddziałujące z czynnikami transkrypcji, wykonano standardową analizę funkcjonalną promotora wykazując, że miejsca istotne dla aktywacji genu są znacznie oddalone od siebie i znajdują się regionach genu o koordynantach (-293 do -105) oraz (+744 do +905). W pierwszym z wymienionych regionów wykryto miejsce wiążące czynnik Egr-1, a w drugim sekwencje *ets* o potencjalnej właściwości wiązania Elk-1.

Niezwykle ważnym wynikiem badań było wykazanie, że oba zidentyfikowane regiony łącznie biorą udział w wiązaniu czynników transkrypcji aktywujących gen *ZFP36*, a także, że czynnik Elk-1 pełni dwojaką funkcję w aktywacji genu *ZFP36* w komórkach MCF-7 stymulowanych EGF. Z jednej strony jest to działanie bezpośrednie poprzez oddziaływanie z miejscami regulatorowymi *ets* zlokalizowanymi wewnątrzgenowo. Z drugiej strony Elk-1 działa pośrednio pobudzając ekspresję czynnika transkrypcyjnego Egr-1, który następnie wiąże się z sekwencją regulatorową w regionie poprzedzającym miejsce inicjacji transkrypcji genu. Badania immunoprecypitacji potwierdziły, że wskazane sekwencje DNA wiążą właściwe czynniki transkrypcyjne *in vivo*. W dyskusji wyników omawianej pracy pojawia się ważny sugestia, a mianowicie że stymulowana przez EGF ekspresja TTP może modulować

przebieg procesu nowotworowego, ponieważ jak wynika z piśmiennictwa wzrost poziomu tego białka hamuje wzrost nowotworów i hamuje proces waskularyzacji. W powyższej pracy dr Aneta Kasza była autorem korespondencyjnym.

Praca No5. „IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer”. (2013). Kasza A. Cytokine, 62, 22-33. [IF = 3.019].

W powyższej pracy przeglądowej dr Aneta Kasza opisała, opierając się na najnowszym piśmiennictwie i wynikach własnych badań, mechanizmy indukowania procesu zapalnego, wywoływanego zarówno przez czynniki patogenne, jak i procesu indukowanego w wyniku sterylnego uszkodzenia tkanek. Habilitantka szczegółowo opisała mechanizm przekazywania sygnału generowanego przez oddziaływanie interleukiny 1, oraz naskórkowego czynnika wzrostu EGF z ich receptorami, oraz molekularne efekty jakie wywołuje uruchomienie tych ścieżek w odniesieniu do procesu zapalnego i nowotworowego. Głównym przesłaniem pracy jest przedstawienie i przedyskutowanie relacji pomiędzy wymienionym procesami, oraz ukazanie w jakim stopniu do poszerzenia wiedzy o tych relacjach przyczyniły się badania prowadzone przez Habilitantkę. Artykuł napisany z głęboką wiedzą w zakresie omawianych zagadnień, ilustrowany klarownymi schematami ścieżek przekazywania sygnału stanowi ważną pozycję w zbiorze prac stanowiących dorobek przedstawiony jako osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego. Lektura omawianego artykułu przeglądowego autorstwa dr Anety Kaszy pozwala głębiej zrozumieć motywacje, jakimi kierowała się Habilitantka przy formułowaniu celów pracy badawczej oraz pełniej docenić naukowe nowatorstwo i znaczenie osiągnięć przedstawionych w jej pracach oryginalnych.

6. Podsumowanie najważniejszych wyników badań przedstawionych w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

Badania opisane w jednotematycznym cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, przyniosły szereg ważnych wyników o dużej wartości naukowej.

Po pierwsze, Habilitantka wykazała, że do grupy genów, których ekspresja pobudzana jest przez czynnik transkrypcyjny Elk-1 należy zaliczyć także geny kodujące SRF, PAI-1, MCP1, oraz TTP.

Po drugie, wynikiem badań o dużym znaczeniu poznawczym było wykazanie przez Habilitantkę, że czynnik transkrypcyjny Elk-1 może funkcjonować w dalece zróżnicowanym kontekście molekularnym. W przypadku genu kodującego czynnik transkrypcyjny SRF, oraz genu *ZC3H12A* kodującego białko MCP1, ich aktywacja w komórkach stymulowanych IL-1 β , wymaga powstania w obszarze promotora kompleksu trójskładnikowego, w którym występuje Elk-1 z partnerskim czynnikiem transkrypcyjnym SRF. Natomiast w modulowaniu transkrypcji genu *PAI-1* w komórkach MCF-7 stymulowanych EGF, czynnik transkrypcyjny Elk-1 uczestniczy samodzielnie.

Szczególnie złożony mechanizm aktywacji transkrypcji opisała Habilitantka w odniesieniu do regulacji ekspresji genu *ZFP36* w komórkach MCF-7 stymulowanych EGF. W tym przypadku okazało się, że oprócz Elk-1, konieczny jest równoczesny udział czynnika transkrypcyjnego Egr-1. Habilitantka wykryła bardzo interesujące oddziaływania czynników „cis” i „trans” wykazując, że miejsce wiązania czynników Elk-1 (w aktywacji biorą udział dwie cząsteczki tego białka, oddziałujące z odrębnymi sekwencjami *ets*) znajduje się w pierwszym intronie genu kodującego *TTP*, natomiast miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego Egr-1 znajduje się przed miejscem inicjacji transkrypcji genu. Jednocześnie Habilitantka wykazała, że Elk-1 działa także w sposób pośredni, a mianowicie wiążąc się z promotorem genu kodującego Egr-1 wzmacnia jego transkrypcję, co prowadzi do wzrostu

poziomu tego czynnika transkrypcyjnego, który z kolei wiąże się z właściwymi sekwencjami w promotorze genu *ZFP36*.

Po trzecie, ważnym elementem nowości naukowej jest wykazanie, że czynnik transkrypcyjny Elk-1 jest konstytutywnie związany z DNA w regionach regulatorowych genów *ZC3H12A*, *EGR-1* i *PAI-1*. Aby jednak czynnik ten mógł uaktywnić transkrypcję danego genu, musi ulec aktywującej fosforylacji przez kinazę ERK1/2, w wyniku pobudzenia kaskady kinaz przez oddziaływanie receptorów powierzchniowych z właściwym ligandem.

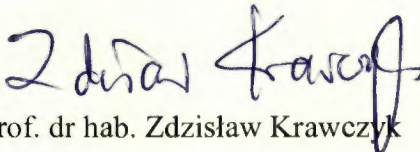
Po czwarte, wnikliwa analiza doprowadziła do wykazania przez Habilitantkę, że w przypadku zaangażowania czynnika Elk-1 w proces regulacji ekspresji genu *ZC3H12A* w komórkach HepG2 stymulowanych IL-1 β , oraz w regulację ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcji SRF ujawnia się mechanizm sprzężenia zwrotnego. W pierwszym przypadku, w wyniku stymulacji komórek IL-1 β , aktywowany jest czynnik transkrypcyjny Elk-1, który z kolei indukuje ekspresję genu kodującego MCP-1, białka, które z kolei zaangażowane jest w proces degradacji mRNA IL-1 β . W drugim przypadku, czynnik transkrypcyjny Elk-1 moduluje ekspresję genu kodującego białko SRF będące jego partnerem, i z którym tworzy trójskładnikowy kompleks transkrypcyjny.

Po piąte, badania dr Anety Kaszy, oprócz wyjaśnienia wielu molekularnych aspektów oddziaływań czynników transkrypcyjnych Elk-1 i Egr-1 z sekwencjami regulatorowymi DNA i partnerskimi czynnikami transkrypcyjnymi, wskazały nowe, interesujące i potencjalnie istotne dla zastosowań klinicznych kierunki poszukiwań. Głównie chodzi tu o wykazanie przez Habilitantkę, że czynnik transkrypcyjny Elk-1 może modulować ekspresję genów różnych klas, kodujących białka o funkcjach kluczowych w różnych procesach, w tym w procesie zapalnym. Niemniej ważne jest zwrócenie uwagi na to, że naskórkowy czynnik wzrostu EGF, którego nadekspresja w nowotworach wiązana jest ze złą prognozą, może w określonych warunkach, poprzez aktywację genu *ZFP36* i w konsekwencji wzrost poziomu białka TTP hamować proces przerzutowania.

7. Podsumowanie oceny

Podsumowując ocenę dorobku naukowego dr Anety Kaszy stwierdzam, że jest to dorobek obszerny, o zdecydowanie wysokiej wartości naukowej, o czym świadczy między innymi wysoki sumaryczny współczynnik wpływu i znaczna liczba niezależnych cytowań. Przedstawiona dokumentacja oraz osiągnięcie naukowe spełniają całkowicie wymagane kryteria. Osiągnięcia naukowe, dydaktyczne, popularyzatorskie oraz zakres współpracy międzynarodowej, jednoznacznie i przekonująco wskazują, że dr Aneta Kasza jest utalentowanym, ambitnym, dojrzałym, wysoce profesjonalnym, w pełni ukształtowanym samodzielnym pracownikiem naukowym. Oceniając monotematyczny zestaw publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą do wszczęcia przewodu habilitacyjnego, stwierdzam, że Habilitantka miała w prowadzonych badaniach i przygotowaniu publikacji udział dominujący, a wyniki badań są istotnym wkładem w rozwój dyscypliny naukowej, którą Habilitantka się zajmuje. Podsumowując ocenę wyrażam przekonanie, że dr Aneta Kasza spełnia w najwyższym stopniu wymagania, jakie stawiane są ubiegającym się o nadanie tytułu doktora habilitowanego i uzyskanie samodzielności w prowadzeniu badań naukowych.

Gliwice, 30 maja 2013 r.


Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk