



# **AUTOREFERAT**

**Katarzyna Lubecka**

Zakład Chemii Biomedycznej  
Katedra Biochemii Medycznej  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2019

<b>Spis treści</b>	<b>Strona</b>
1. Imię i nazwisko.....	3
2. Dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników.....	5
I. Wprowadzenie i motywacja badań.....	5
II. Cel i zakres badań .....	8
III. Omówienie wyników badań .....	9
IV. Wnioski.....	19
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	20
6. Podsumowanie dorobku naukowego.....	27
7. Piśmiennictwo.....	27

### 1. Imię i nazwisko

Katarzyna Lubecka

### 2. Dyplomy i stopnie naukowe

- 2014      Stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Promotor: prof. dr hab. Krystyna Fabianowska-Majewska  
Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Rola roślinnych polifenoli i kłofarabiny w epigenetycznej regulacji transkrypcji wybranych genów supresorowych”*  
Praca z wyróżnieniem
- 2009      Tytuł zawodowy magister  
Kierunek Zdrowie Publiczne, Specjalność Promocja Zdrowia  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Promotor: prof. dr hab. Krystyna Fabianowska-Majewska  
Tytuł pracy magisterskiej: *„Rola kwasu foliowego w epigenetycznej regulacji aktywności genów”*  
Praca z wyróżnieniem

### 3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych

- 2017 – obecnie      p.o. Kierownika Zakładu Chemii Biomedycznej, Katedry Biochemii Medycznej, Wydziału Nauk o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- 2017 – obecnie      Adiunkt, Zakład Chemii Biomedycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 2011 – 2017      Asystent, Zakład Chemii Biomedycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Cykl 5 publikacji naukowych związanych tematycznie, pt.:

**„Nowe skojarzenia klofarabiny z bioaktywnymi fitozwiązkami i epigenetyczne mechanizmy ich przeciwnowotworowego działania w ludzkich komórkach raka piersi”**

**4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Summary wskaźnik *Impact Factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **14,368**, a punktacja MNiSW **130** punktów (wg odpowiednio ISI Journal Citation Report oraz Ujednoliconego Wykazu Czasopism Naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego)

H1. **Lubecka-Pietruszewska K\***, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K. (2015) Sulforaphane Alone and in Combination with Clofarabine Epigenetically Regulates the Expression of DNA Methylation-Silenced Tumour Suppressor Genes in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 8(2): 91-101. doi: 10.1159/000439111  
**Wskaźnik IF: 1,488, MNiSW: 20, \*** autor korespondencyjny

H2. Kaufman-Szymczyk A<sup>#</sup>, Majewski G<sup>#</sup>, **Lubecka-Pietruszewska K**, Fabianowska-Majewska K. (2015) The Role of Sulforaphane in Epigenetic Mechanisms, Including Interdependence between Histone Modification and DNA Methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 29732-29743. doi: 10.3390/ijms161226195  
**Wskaźnik IF: 3,257, MNiSW: 30, #** równy udział autorów

H3. **Lubecka K**, Kurzava L, Flower K, Buvala H, Zhang H, Teegarden D, Camarillo I, Suderman M, Kuang S, Andrisani O, Flanagan JM, Stefanska B. (2016) Stilbenoids remodel the DNA methylation patterns in breast cancer cells and inhibit oncogenic NOTCH signaling through epigenetic regulation of *MAML2* transcriptional activity. *Carcinogenesis*, 37(7): 656-668. doi: 10.1093/carcin/bgw048  
**Wskaźnik IF: 5,105, MNiSW: 35**

H4. **Lubecka K\***, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2018) Inhibition of breast cancer cell growth by the combination of clofarabine and sulforaphane involves epigenetically mediated *CDKN2A* upregulation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 37(5): 280-289. doi: 10.1080/15257770.2018.1453075  
**Wskaźnik IF: 0,831, MNiSW: 15, \*** autor korespondencyjny

H5. **Lubecka K\***, Kaufman-Szymczyk A, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Szemraj J, Fabianowska-Majewska K. (2018) Novel Clofarabine-Based Combinations with Polyphenols Epigenetically Reactivate Retinoic Acid Receptor Beta, Inhibit Cell Growth, and Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). pii: E3970. doi: 10.3390/ijms19123970  
**Wskaźnik IF: 3,687, MNiSW: 30, \*** autor korespondencyjny

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

#### I. Wprowadzenie i motywacja badań

Rak piersi jest drugim najpowszechniej występującym nowotworem na świecie, będąc zdecydowanie najczęstszym typem nowotworu u kobiet, z szacunkową liczbą ponad 2,0 milionów nowych przypadków zdiagnozowanych w 2018 roku, co stanowi prawie 25% wszystkich przypadków nowotworów wśród kobiet. Rak piersi stanowi główną przyczynę zgonów z powodu nowotworów u kobiet na całym świecie [1]. Ze względu na coraz częstsze występowanie nowotworów piersi i ich heterogenność, istnieje potrzeba opracowania nowych, skutecznych strategii prewencji, detekcji i terapii chorób nowotworowych.

Na podstawie poziomu ekspresji trzech receptorów komórkowych, w tym: receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR) i receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2), można wyróżnić przynajmniej cztery podtypy nowotworów piersi: luminalny A, luminalny B, HER2 i podstawny [2]. Każdy z podtypów raka piersi różni się znacząco mechanizmem inicjacji i progresji procesu nowotworowego.

Uważa się, że istnieją dwie podstawowe drogi patogenezy raka piersi. Pierwsza dotyczy od 5% do 10% przypadków raka piersi, będących wynikiem dziedziczonych mutacji (m.in. geny *BRCA1* (ang. *BRCA1, DNA Repair Associated*), *BRCA2* (ang. *BRCA2, DNA Repair Associated*) obecnych we wszystkich komórkach organizmu [1]. Druga droga patogenezy prowadzi do tzw. sporadycznego raka piersi w wyniku zahamowania funkcji genów supresorowych i aktywowania onkogenów na skutek zmian genetycznych i/lub epigenetycznych. W przeciwieństwie do zmian genetycznych, epigenetyczne modyfikacje, zależne od czynników zewnętrznych, są odwracalne i mogą być celem chemoprewencji i terapii nowotworów, mających na celu zarówno zahamowanie wczesnych zmian transformacji nowotworowej, jak i zapobieganie takim zmianom.

W licznych badaniach wskazuje się na potencjalny związek pomiędzy częstością występowania nowotworów a narażeniem na różnorodne zewnętrzne czynniki ryzyka, związane ze stylem życia. Do czynników ryzyka sporadycznego raka piersi można zaliczyć, m.in. nieprawidłową dietę, otyłość, brak aktywności fizycznej, palenie papierosów, czy zażywanie egzogennych środków hormonalnych. Ekspozycja na czynniki tego typu może prowadzić do zmian epigenetycznych (m.in. zmiany wzoru metylacji DNA, dostępności chromatyny i aktywności miRNA) wpływających na wzrost, różnicowanie, czy apoptozę komórek. Rozregulowany kod epigenetyczny wydaje się więc odgrywać ważną rolę w rozwoju sporadycznych nowotworów, w tym nowotworów piersi [3-5].

Epigenetyka to obszerna dziedzina nauki zajmująca się badaniem dziedzicznych zmian w ekspresji genów bez naruszenia sekwencji nukleotydów w DNA. Trzy główne, współzależne modyfikacje epigenetyczne, obejmujące metylację DNA, kowalencyjne modyfikacje histonów, oraz zmiany w aktywności niekodujących RNA (miRNA), są zaangażowane w regulację transkrypcyjnej aktywności wielu genów. Modyfikacje epigenetyczne podlegają w komórkach prawidłowych ciągłym, dynamicznym zmianom. W procesie transformacji nowotworowej, w tym w procesie rozwoju raka piersi, zaburzenie mechanizmów epigenetycznych może prowadzić do wyciszenia genów supresorowych oraz jednocześnie do zwiększonej ekspresji onkogenów i genów prometastatycznych. Wyciszenie genów supresorowych może być często związane ze zwiększoną metylacją (hipermetylacją) ich regionów promotorowych, natomiast

nadekspresja onkogenów i genów prometastatycznych może wynikać ze zmniejszonej metylacji (hipometylacji) ich regionów regulatorowych [3-5].

Wiele genów supresorowych koduje białka odpowiedzialne za negatywną regulację wewnątrzkomórkowych, onkogennych szlaków przekazu sygnału, m.in. MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)/AP-1 (ang. *activating protein-1*) oraz PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)/AKT (ang. *AKT Serine/Threonine Kinase*) [4-7]. Wyciszenie hipermetylowanych genów supresorowych w komórkach nowotworowych jest potencjalnie odwracalne. Dlatego też identyfikacja nowych strategii przeciwnowotworowej terapii epigenetycznej nakierowanej na reaktywację tych genów poprzez ich demetylację wydaje się być bardzo obiecująca.

Opracowano nowe strategie skoncentrowane na hamowaniu procesu metylacji DNA za pomocą specyficznych inhibitorów metylotransferaz DNA (DNMT), tj. azacytydina (5-azacytydina, 5-aza-C) i decytabina (5-aza-2'-deoksycytydina, DAC). 5-aza-C i DAC po wbudowaniu do DNA, hamują aktywność DNMT i powodują demetylację i indukcję genów supresorowych [8]. Alternatywne podejście, polegające na hamowaniu metylacji DNA, odnosi się do związków, które zakłócają cykl „aktywnego metylu”, np. kladrybina (2-chloro-2'-deoksyadenozyna, 2CdA) i fludarabina (9-β-D-arabinozylo-2-fluoroadenina, F-ara-A). 2CdA i F-ara-A hamują aktywność hydrolazy S-adenozylu-L-homocysteiny (SAH), co powoduje akumulację SAH i uszczuplenie puli S-adenozylu-L-metioniny (SAM, donor grup metylowych), zaburzenie cyklu „aktywnego metylu” i ostatecznie zahamowanie reakcji metylacji DNA [4, 5, 9, 10]. Ze względu na pewne ograniczenia w stosowaniu 2CdA i F-ara-A, m.in. niską biodostępność leków po podaniu doustnym i wysoką toksyczność neurologiczną [10], został zsyntetyzowany nowy analog 2'-deoksyadenozyny, klofarabina (2-chloro-2'-fluoro-2'-deoksyarabinozylo-adenina, Clf, produkowana jako Clolar lub Evoltra), strukturalnie podobny do 2CdA i F-ara-A. W 2004 roku Clf została wprowadzona do leczenia pacjentów pediatrycznych z oporną i nawrotową ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukaemia*, ALL) [12].

Dane literaturowe wskazują, że mechanizm działania Clf poprzez jej trifosforanową pochodną (2-chloro-2'-fluoro-2'-deoksyarabinozyloadenino-5'-trifosforan, Clf-ATP) obejmuje głównie hamowanie syntezy DNA poprzez inhibicję reduktazy rybonukleotydomowej i polimerazy DNA $\alpha$ , a następnie indukcję apoptozy [13,14]. Clf wykazuje duże, wyższe od naturalnego substratu 2'-deoksycytydyny, powinowactwo do jednego z enzymów fosforylujących (kinazy deoksycytydomowej, dCK). Ponadto Clf posiada większą oporność na rozkład w komórce przez deaminazę adenzynową (ADA) i mniejszą podatność na rozpad fosforolityczny niż 2CdA i F-ara-A, podczas gdy powinowactwo Clf-ATP do polimerazy DNA $\alpha$  i reduktazy rybonukleotydomowej jest podobne lub większe niż powinowactwo trifosforanu 2'-deoksyadenozyny (dATP) [15].

Ponieważ wcześniejsze badania *in vitro* naszego zespołu wykazały, że 2CdA i F-ara-A (prekursory Clf) biorą udział w epigenetycznej regulacji transkrypcyjnej aktywności genów supresorowych w komórkach raka piersi [4,5], założyliśmy, że również Clf może wpływać na modulację ludzkiego epigenomu. Nasze dalsze badania ujawniły nowy, epigenetyczny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności Clf, obejmujący demetylację i jednoczesną reaktywację ekspresji wybranych genów supresorowych, *APC* (ang. *APC, WNT Signaling Pathway Regulator*), *PTEN* (ang. *Phosphatase And Tensin Homolog*) i *RARB* (ang. *Retinoic Acid Receptor Beta*) w ludzkich komórkach białaczki erytrocytarnej linii K-562,

reprezentujących komórki przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myeloid leukaemia*, CML) [16]. Geny supresorowe *APC*, *PTEN* i *RARB* zostały wybrane do naszych badań na podstawie dotychczasowych danych literaturowych, które wskazują na istotny udział zwiększonej metylacji ich promotorów w wyciszeniu transkrypcyjnej aktywności tych genów w komórkach licznych typów nowotworów [4, 5]. Ponadto geny te kodują białka supresorowe, negatywnie regulujące podstawowe, wewnątrzkomórkowe szlaki przekazu sygnału: PI3K/AKT (białko PTEN), MAPK/AP-1 (białka PTEN i RARB) i Wnt1/beta-katenina/ T-cell factor, TCF (białko APC), które kontrolują wzrost, przeżywalność i apoptozę komórek oraz ich adhezję i migrację [4-7, 17, 18].

W naszych badaniach wykazano, że 96-godzinna inkubacja komórek K-562 z CIF zastosowaną w stężeniu równym 20 nM (stężenie ponad dwukrotnie wyższe od stężenia IC<sub>50</sub>, równego 8 nM) powoduje obniżenie stanu metylacji promotorów genów supresorowych, *APC*, *PTEN* i *RARB* o 10-35% względem komórek kontrolnych, hodowanych w pożywce (medium) bez leku. Zaobserwowanym zmianom w poziomie metylacji regionów promotorowych badanych genów towarzyszył istotny wzrost ich ekspresji o 33-151%. Jednocześnie, ekspozycja komórek K-562 na CIF prowadziła do 28% obniżenia ekspresji genu kodującego główny enzym z grupy metylotransferaz DNA, metylotransferazę DNA 1 (*DNMT1*), odpowiedzialny za katalizę reakcji metylacji DNA [16]. Zwiększona ekspresja i/lub aktywność DNMT1 jest często odnotowywana w komórkach wielu typów nowotworów [3-5, 8].

Obserwacje te przyczyniły się do podjęcia przeze mnie badań mających na celu ocenę roli CIF w epigenetycznej regulacji transkrypcyjnej aktywności genów supresorowych w ludzkich komórkach raka piersi. Do badań, które były podstawą mojej rozprawy doktorskiej, wybrano dwie linie raka piersi, MCF7 i MDA-MB-231, różniące się stopniem inwazyjności, jako eksperymentalny model *in vitro* nowotworów litych.

Do chwili obecnej tylko nasz zespół wykazał epigenetyczny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności CIF w ludzkich komórkach raka piersi [19]. Nasze badania wskazują, że inkubacja komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 z CIF silnie hamuje ich wzrost w sposób zależny od czasu ekspozycji i dawki leku. W badaniach nad wpływem CIF na metylację i ekspresję genów zastosowano 96-godzinny czas hodowli oraz stężenia CIF równe wyznaczonym wcześniej wartościom IC<sub>50</sub>, wynoszącym odpowiednio 640 nM dla komórek MCF7 i 50 nM dla komórek MDA-MB-231. W przypadku obu linii nowotworowych, CIF prowadziła do obniżenia stanu metylacji i zwiększenia poziomu ekspresji genów *PTEN* i *RARB*, jak również do zwiększenia ekspresji genu *CDKN1A* (ang. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A; P21*). Ponadto w nieinwazyjnych komórkach linii MCF7 zmiany te były związane ze zmniejszeniem ekspresji genu *DNMT1* [19].

Nasze badania wskazują na istotną rolę CIF w epigenetycznej regulacji transkrypcji wybranych genów supresorowych w ludzkich komórkach raka piersi. Wydaje się, że jest to nowy, ważny element przeciwnowotworowej aktywności CIF i może wskazywać na potencjalną skuteczność tego leku w terapii epigenetycznej guzów litych, zwłaszcza we wczesnych stadiach nowotworzenia.

Sporadyczny rak piersi jest często związany z zaburzeniami prawidłowego wzoru metylacji DNA, które są odwracalne i wrażliwe na działanie czynników środowiskowych, w tym diety. Coraz więcej publikacji naukowych wskazuje na wysoką skuteczność bioaktywnych związków roślinnych (fitozwiązków) w prewencji chorób nowotworowych,

oraz w terapii wspomagającej konwencjonalną chemoterapię (terapii skojarzonej). Najnowsze badania opisane przez nas i innych autorów, wskazują, że bioaktywne fitozwiązki, m.in. izotiocyjaniiny z warzyw krzyżowych (np. sulforafan, SFN), katechiny z zielonej i białej herbaty (np. galusan epigallokatechiny, EGCG), fitoestrogeny z roślin strączkowych (np. genisteina) i z czerwonych winogron (np. resweratrol, RSV), modyfikują stan metylacji i poziom ekspresji genów hipermetylowanych w komórkach nowotworowych, co stanowi epigenetyczny mechanizm ich przeciwnowotworowego działania [3-5, 20, 21].

Ponadto, nasz zespół badawczy wykazał wspomagające, chemoprewencyjne działanie wybranych fitozwiązków, RSV i ATRA (kwas całkowicie trans-retinowy, metabolit witaminy A), w skojarzeniu z 2CdA i F-ara-A, w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231. RSV i ATRA, zastosowane w stężeniach zbliżonych do wartości  $IC_{50}$ , istotnie wzmacniały przeciwnowotworowy, epigenetyczny efekt działania 2CdA i F-ara-A, szczególnie we wczesnym stadium raka piersi (komórki linii MCF7), oraz powodowały silniejsze zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych w porównaniu do efektu działania badanych związków użytych osobno [4, 5].

Wiele zespołów badawczych na świecie z dużą intensywnością prowadzi badania nad skojarzoną terapią epigenetyczną, z zastosowaniem naturalnych i syntetycznych związków o działaniu chemoprewencyjnym.

W Zakładzie Chemii Biomedycznej od wielu lat zajmujemy się badaniem przeciwnowotworowych właściwości nukleozydowych i nienukleozydowych inhibitorów procesu metylacji DNA, zastosowanych samodzielnie oraz w skojarzeniu.

W niniejszym autoreferacie przedstawiam moje badania dotyczące epigenetycznej aktywności przeciwnowotworowej oraz molekularnych mechanizmów działania nowych skojarzeń antymetabolitu, klofarabiny (CIF), z wybranymi fitozwiązkami, tj. SFN, EGCG i genisteiną, w modelu *in vitro* ludzkich komórek raka piersi.

## II. Cel i zakres badań

### Celem pracy było:

1. Zbadanie epigenetycznej aktywności przeciwnowotworowej nowych skojarzeń klofarabiny (CIF) i bioaktywnych fitozwiązków (SFN, EGCG, genisteina) w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231, wybranych jako eksperymentalny model *in vitro* nowotworów litych, o różnej inwazyjności:
  - MCF7 (nieinwazyjne, estrogeno-zależne komórki raka piersi, ATCC HTB-22),
  - MDA-MB-231 (inwazyjne, estrogeno-niezależne komórki raka piersi, ECACC 92020424).
- 1.1. Określenie mechanizmu działania badanych skojarzeń poprzez ocenę ich wpływu na:
  - wzrost komórek nowotworowych,
  - proces apoptozy,
  - stan metylacji regionów promotorowych wybranych genów supresorowych,
    - analiza bioinformatyczna publicznie dostępnych danych z baz The National Cancer Institute (NCI's) Genomic Data Commons (GDC) Data Portal oraz Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets – weryfikacja roli wybranych fragmentów regionów promotorowych w regulacji transkrypcji badanych genów



supresorowych na podstawie analizy danych z mikromacierzy Illumina Infinium HumanMethylation450 (Illumina 450K) oraz z bazy TRANSFAC.

- poziom ekspresji wybranych genów supresorowych,
    - analiza bioinformatyczna publicznie dostępnych danych z baz Oncomine oraz GEO DataSets,
  - transkrypcyjną aktywność genów *DNMT1*, *CDKN1A (P21)* i *TP53*, kodujących białka zaangażowane w regulację procesu metylacji DNA.
    - Decytabina (5-aza-2'-deoksytydyna, DAC), silny inhibitor DNMT1, zastosowana w analizie metylacji i/lub ekspresji badanych genów jako związek referencyjny.
2. Określenie synergistycznego działania badanych skojarzeń.
    - W badanych kombinacjach z CIF ( $IC_{50}$ ) naturalne związki bioaktywne (SFN, EGCG, genisteina) zostały zastosowane w stężeniu istotnym fizjologicznie równym 10  $\mu$ M.
  3. Wyselekcjonowanie skojarzeń o największym przeciwnowotworowym potencjale epigenetycznym.
    - 3.1. Porównanie zakresu zmian, obejmujących zahamowanie wzrostu i indukcję apoptozy komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 po inkubacji z badanymi skojarzeniami, do poziomu tych zmian w komórkach badanych linii nowotworowych po inkubacji: bez badanych związków (kontrola negatywna, 0,1% DMSO (dimetylosulfotlenek)), z decytabiną (DAC, kontrola pozytywna), oraz z badanymi związkami zastosowanymi osobno.
    - 3.2. Porównanie zakresu zmian metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych w komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 po inkubacji z badanymi skojarzeniami, do poziomu tych zmian w komórkach badanych linii nowotworowych po inkubacji: bez badanych związków (kontrola negatywna, 0,1% DMSO), z DAC (kontrola pozytywna), oraz z badanymi związkami zastosowanymi osobno.
    - 3.3. Porównanie zakresu zmian metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych w komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 po inkubacji z badanymi skojarzeniami do poziomu ich metylacji i ekspresji w ludzkich komórkach nabłonkowych piersi linii MCF10A (komórki immortalizowane), zastosowanych jako model komórek prawidłowych gruczołu sutkowego.
      - Ocena kierunku zmian profilu metylacji i ekspresji badanych genów supresorowych – z profilu charakterystycznego dla komórek nowotworowych na profil obserwowany w komórkach prawidłowych.

### III. Omówienie wyników badań

Konwencjonalna terapia przeciwnowotworowa oparta jest głównie na syntetycznych związkach (lekach) cytotoksycznych. Liczne działania niepożądane i duża toksyczność tych chemoterapeutyków, a także wrodzona lub nabyta oporność komórek nowotworowych na stosowane leki, przyczyniają się do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Obecnie coraz większe nadzieje pokłada się w zastosowaniu przeciwnowotworowej terapii skojarzonej, opartej między innymi na jednoczesnym podawaniu co najmniej dwóch związków o różnym mechanizmie działania. Liczne badania wykazały, że taka terapia skojarzona, w tym

epigenetyczna terapia skojarzona, znacznie zwiększa skuteczność leczenia oraz zmniejsza działania niepożądane [4, 5]. Naukowcy i lekarze podejmują próby zastosowania różnych kombinacji związków, między innymi łączenia znanych chemoterapeutyków z nowymi związkami pochodzenia syntetycznego, jak również coraz częściej ze znanymi i/lub nowymi bioaktywnymi związkami pochodzenia naturalnego.

Jak dotąd pojawiło się niewiele prac na temat synergistycznego działania bioaktywnych związków roślinnych stosowanych w skojarzeniu z lekiem przeciwnowotworowym, CIF. Synergistyczne działanie przeciwnowotworowe RSV w połączeniu z CIF wykazano w badaniach *in vitro* z zastosowaniem komórek wybranych linii międzybłonniaka [22-26].

Włączając się w nurt poszukiwań nowych strategii epigenetycznej terapii przeciwnowotworowej, badałam, czy wybrane bioaktywne fitozwiązki (SFN, EGCG i genisteina) mogą wzmacniać przeciwnowotworowe działanie CIF w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231. Otrzymane wyniki opublikowałam w opisanych poniżej pracach, dzięki współpracy z członkami zespołów badawczych Zakładu Chemii Biomedycznej, Zakładu Hematologii Doświadczalnej oraz Zakładu Biochemii Medycznej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz laboratorium dr Barbary Stefanskiej na Uniwersytecie Purdue w Stanach Zjednoczonych Ameryki.

H1. **Lubecka-Pietruszewska K**, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K. (2015) Sulforaphane Alone and in Combination with Clofarabine Epigenetically Regulates the Expression of DNA Methylation-Silenced Tumour Suppressor Genes in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 8(2): 91-101. doi: 10.1159/000439111

Celem niniejszej pracy było zbadanie synergistycznego działania przeciwnowotworowego klofarabiny (CIF) w połączeniu z bioaktywnym izotiocyjanianem z brokułów, sulforafanem ( $C_6H_{11}NOS_2$ , biologicznie aktywny izomer L-sulforafan, SFN), w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231.

Wcześniejsze badania prowadzone w naszym zespole wykazały wpływ CIF na epigenetyczną regulację transkrypcyjnej aktywności wybranych genów supresorowych w ludzkich komórkach raka piersi [19]. W 1992 roku pojawiła się pierwsza publikacja, którą można było wyszukać, wpisując w bazie PubMed hasło „sulforaphane” [27]. Intensywne badania prowadzone w ostatnich trzech dekadach wskazują na wielokierunkową, chemoprewencyjną aktywność SFN na wszystkich etapach procesu nowotworzenia. W fazie poprzedzającej nowotworzenie mechanizm działania SFN polega na modulowaniu aktywności enzymów zaangażowanych w regulację I i II etapu biotransformacji niektórych ksenobiotyków, co zapobiega powstawaniu adduktów DNA, które mogłyby dać początek mutacji. Ponadto wykazano, że SFN wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe, regulując liczne procesy komórkowe, obejmujące proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Ogromny potencjał przeciwnowotworowy SFN może wynikać również z jego aktywności w epigenetycznym mechanizmie regulacji ekspresji genów. Wiele badań wskazuje, że epigenetyczne efekty chemoprewencyjnego działania SFN w komórkach różnych typów nowotworów są związane z allosteryczną inhibicją aktywności deacetylaz histonów (HDAC), co prowadzi do zwiększenia acetylacji białek histonowych w obrębie regionów promotorowych genów supresorowych i w konsekwencji do reaktywacji ekspresji tych genów, np. genu *CDKN1A*

(P21). Dane literaturowe wskazują także na rolę SFN w pośredniej regulacji ekspresji i/lub aktywności metylotransferaz DNA (DNMT) [3, 28].

W pracy tej badałam, czy SFN zastosowany w stężeniu istotnym fizjologicznie (10  $\mu\text{M}$ ) może wzmacniać przeciwnowotworowe efekty działania CIF zastosowanej w stężeniu równym wartości  $\text{IC}_{50}$  w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231 (odpowiednio 640 nM i 50 nM), reprezentujących odpowiednio wczesne i późne stadium rozwoju raka piersi.

W celu określenia wpływu badanych związków, CIF ( $\text{IC}_{50}$ ), SFN (10  $\mu\text{M}$ ) i SFN ( $\text{IC}_{50}$ , 22  $\mu\text{M}$  (MCF7) i 46  $\mu\text{M}$  (MDA-MB-231)), użytych osobno, jak i w skojarzeniu (CIF( $\text{IC}_{50}$ )+SFN(10  $\mu\text{M}$ )), na przeżywalność komórek MCF7 i MDA-MB-231, zastosowano metodę mikroskopowej analizy komórek barwionych błękitem trypanu oraz metodę podwójnego znakowania komórek mieszaniną Aneksyna V-FITC/jodek propidyny. 96-godzinna inkubacja z badanymi związkami zastosowanymi osobno powodowała istotne zahamowanie wzrostu komórek obu linii raka piersi w sposób zależny od stężenia, co pozwoliło na wyznaczenie ww. wartości  $\text{IC}_{50}$ . W przeciwieństwie do CIF ( $\text{IC}_{50}$ ), SFN znacząco indukował apoptozę nieinwazyjnych komórek raka piersi linii MCF7, przy obu badanych stężeniach SFN równych 10  $\mu\text{M}$  i 26  $\mu\text{M}$ . Testy skojarzone (CIF+SFN) wykazały addytywną i/lub synergistyczną inhibicję wzrostu komórek linii MCF7 i MDA-MB-231, oraz uwrażliwienie komórek linii MCF7 na indukcję procesu apoptozy, co było związane z istotnym wzrostem ekspresji genu *TP53* (ang. *Tumor Protein P53*). Różnice w zakresie obserwowanych zmian w przeżywalności komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 po ekspozycji na badane związki mogą wynikać z odmiennej charakterystyki wybranych linii raka piersi. Nieinwazyjne estrogeno-zależne komórki raka piersi linii MCF7 wykazują ekspresję prawidłowego białka supresorowego P53 oraz funkcjonalną delecję genu kodującego kaspazę 3 (ang. *Caspase 3*; *CASP3*), podczas gdy w inwazyjnych estrogeno-niezależnych komórkach MDA-MB-231 ze zmutowanym P53 wykazano aktywność kaspazy 3.

W prezentowanej pracy oceniałam również efekty działania CIF, SFN oraz skojarzenia CIF z SFN na metylację i ekspresję wybranych genów supresorowych w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231. Do badań wybrano geny supresorowe ważne dla regulacji cyklu komórkowego i/lub procesu apoptozy komórek (*CDKN1A*, *RARB*, *TP53*), regulacji wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału (*PTEN*, *RARB*), oraz gen *DNMT1* kodujący główną metylotransferazę DNA, metylotransferazę DNA 1 (DNMT1), która katalizuje reakcję metylacji DNA. Geny *DNMT1* i *CDKN1A* (P21), kodują białka, które współzawodniczą o miejsce wiązania do antygeny jądrowego proliferujących komórek (ang. *Proliferating cell nuclear antigen*; PCNA) [29, 30]. Geny supresorowe *PTEN* i *RARB* kodują białka, które poprzez negatywną regulację onkogennego szlaku przekazu sygnału MAPK/AP-1 (białko PTEN) oraz inhibicję aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 (białko RARB), mogą pośrednio wpływać na transkrypcyjną aktywność genu *DNMT1*. Dane literaturowe wskazują, że czynnik transkrypcyjny AP-1 reguluje ekspresję genu *DNMT1*, zawierającego w regionie promotorowych sekwencję sygnałową dla AP-1 [31]. Ponadto wcześniejsze badania wykazały, że komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 różnią się istotnie stanem metylacji promotorów genów supresorowych *PTEN* i *RARB*, oraz poziomem ich ekspresji, pozwalając na rozróżnienie komórek raka piersi o różnym stopniu inwazyjności [4, 5].

Stan metylacji wybranych fragmentów promotorów genów *PTEN* i *RARB* oznaczano w oparciu o analizę restrykcyjną wrażliwą na metylację (ang. *methylation-sensitive restriction*

*analysis*; MSRA), według metody Iwase *i wsp.* [32]. Ilościową ocenę ekspresji genów *PTEN* i *RARB*, oraz *DNMT1*, *CDKN1A* i *TP53* na poziomie mRNA wykonano techniką PCR w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR), a analizę wyników przeprowadzano w oparciu o metodę Pfaffl *i wsp.*, która przewiduje korekcję danych pod kątem różnic w wydajności PCR [33].

Zarówno w komórkach MCF7, jak i MDA-MB-231, CIF i SFN zastosowane samodzielnie prowadziły do obniżenia metylacji promotorów genów *PTEN* i *RARB* przy jednoczesnym zwiększeniu ich ekspresji. Ponadto, nasze badania po raz pierwszy wykazały, że SFN wzmacnia przeciwnowotworowy, epigenetyczny efekt działania CIF, szczególnie we wczesnym stadium raka piersi (komórki MCF7). W przypadku reaktywacji ekspresji genu *RARB*, obserwowany efekt po ekspozycji na kombinację CIF+SFN (37-krotny wzrost poziomu mRNA) był aż 2 razy silniejszy niż w przypadku ekspozycji na samą CIF (18-krotny wzrost ekspresji). Może to sugerować, że w regulację biologicznej aktywności genu *RARB* mogą być zaangażowane również inne mechanizmy epigenetyczne, np. deacetylacja histonów [34].

Ponadto obserwowanym zmianom metylacji i ekspresji genów supresorowych *PTEN* i *RARB* towarzyszył istotny wzrost ekspresji genu *CDKN1A* w przypadku komórek obu linii raka piersi, a w komórkach MCF7 również znaczący spadek ekspresji genu *DNMT1*.

Według naszej najlepszej wiedzy w pracy tej po raz pierwszy wykazano wspomagające, chemoprewencyjne działanie SFN w skojarzeniu z CIF w ludzkich komórkach raka piersi.

Uzupełnieniem tematycznym opisanych przeze mnie badań jest praca przeglądowa, w której omówiliśmy epigenetyczny aspekt chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych właściwości SFN.

H2. Kaufman-Szymczyk A<sup>#</sup>, Majewski G<sup>#</sup>, **Lubecka-Pietruszewska K**, Fabianowska-Majewska K. (2015) The Role of Sulforaphane in Epigenetic Mechanisms, Including Interdependence between Histone Modification and DNA Methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 29732-29743. doi: 10.3390/ijms161226195.

<sup>#</sup> równy udział autorów

Celem tej pracy przeglądowej było podsumowanie najnowszej wiedzy na temat roli SFN w regulacji epigenetycznych modyfikacji, obejmujących potranslacyjne modyfikacje białek histonowych i reakcję metylacji DNA, które mogą wpływać na transkrypcyjną aktywność wielu genów. W pracy omówiono dwa ww. mechanizmy epigenetycznej regulacji ekspresji genów oraz ich współzależność w kontroli ekspresji genów. Dokonano również przeglądu najważniejszych syntetycznych związków modulujących wymienione procesy epigenetyczne, między innymi inhibitory deacetylaz histonów (HDACi), tj. trichostatyna A (TSA), worinostat (kwas suberanilohydroksamowy, SAHA), kwas walproinowy oraz maślan sodu, jak również inhibitory DNMT oraz reakcji metylacji DNA, tj. 5-aza-C i DAC.

Ważnym aspektem pracy było przedstawienie najnowszych badań dotyczących chemoprewencyjnych właściwości SFN, które częściowo mogą wynikać z jego roli w regulacji epigenetycznych modyfikacji. Liczne dane literaturowe wskazują na rolę SFN jako bezpośredniego allosterycznego inhibitora aktywności HDAC, których zwiększona ekspresja jest często odnotowywana w komórkach różnych typów nowotworów. Nowym aspektem chemoprewencyjnej aktywności SFN, zastosowanego indywidualnie, jak i w skojarzeniu z innymi związkami pochodzenia naturalnego i/lub syntetycznego, jest jego udział w pośredniej regulacji procesu metylacji regionów promotorowych genów hipermetylowanych

i wyciszonych w komórkach nowotworowych. Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że wpływ SFN na ekspresję *DNMT* na poziomie mRNA i/lub białka może być zależny od typu komórek nowotworowych oraz od czasu ekspozycji i stężenia tego fitozwiązku, oraz od interakcji/współdziałania z innymi związkami w skojarzeniu.

Ponadto w pracy zwrócono uwagę na różnice w biodostępności izotiocyjanianów podczas spożycia produktów naturalnych, tj. roślin krzyżowych (w tym brokułów), oraz podczas spożycia ekstraktów z brokułów lub innych roślin krzyżowych w postaci suplementów diety. Podkreślono istotną rolę aktywności enzymu mirozynazy, zawartej w surowych roślinach krzyżowych, niezbędnej do hydrolizy glukozynolanów do bioaktywnych izotiocyjanianów, jak również rolę innych czynników wpływających na absorpcję SFN z produktów roślinnych, między innymi na kompozycję spożywanych posiłków.

Kolejna praca (**H3**) omówiona poniżej stanowi pierwszą publikację oryginalną, która jest wynikiem intensywnej pracy badawczej członków zespołu laboratorium dr Barbary Stefanskiej oraz członków zespołów innych laboratoriów współpracujących z dr Stefanską, w trakcie pierwszego roku mojego stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Purdue (Department of Nutrition Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA). Pozwoliłam sobie umieścić ten artykuł w prezentowanym cyklu publikacji, ponieważ innowacyjna praca eksperymentalna, którą realizowałam w ramach danego projektu badawczego, stała się inspiracją do kontynuacji nowatorskich badań nad chemoprewencyjną aktywnością fitozwiązków w skojarzeniu z syntetycznymi analogami nukleozydów w Zakładzie Chemii Biomedycznej.

**H3. Lubecka K**, Kurzava L, Flower K, Buvala H, Zhang H, Teegarden D, Camarillo I, Suderman M, Kuang S, Andrisani O, Flanagan JM, Stefanska B. (2016) Stilbenoids remodel the DNA methylation patterns in breast cancer cells and inhibit oncogenic NOTCH signaling through epigenetic regulation of *MAML2* transcriptional activity. *Carcinogenesis*, 37(7): 656-668. doi: 10.1093/carcin/bgw048

Celem tej pracy było zbadanie wpływu bioaktywnych polifenoli z grupy stilbenów, resweratrolu (3,5,4'-trihydrokso-*trans*-stilben, RSV) i jego metoksyłowej pochodnej, pterostilbenu (3,5-dimetoksy-4'-hydrokso-*trans*-stilben, PTS), zawartych w czerwonych winogronach i borówkach amerykańskich, na profil metylacji DNA w ludzkich komórkach raka piersi o różnej inwazyjności, MCF10CA1h i MCF10CA1a.

Nieinwazyjne komórki raka piersi linii MCF10CA1h i inwazyjne komórki linii MCF10CA1a zostały wyprowadzone (laboratorium dr Dorothy Teegarden, Purdue University) z mysiego modelu heteroprzeszczepu komórek linii MCF10AT. Komórki linii MCF10AT stanowią przednowotworową linię komórkową uzyskaną z komórek linii MCF10A (immortalizowane, prawidłowe komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego) poprzez ich transformację aktywowanym onkogenem HRAS (ang. *HRas Proto-Oncogene, GTPase*). Komórki MCF10CA1h i MCF10CA1a tworzą w mysim modelu heteroprzeszczepu odpowiednio dobrze zróżnicowane (ang. *well-differentiated*) i słabo zróżnicowane (ang. *poorly-differentiated*) guzy nowotworowe [35].

Stilbenoidy, RSV i PTS należą do naturalnych fitoaleksyn o działaniu ochronnym, które syntetyzowane są przez rośliny w odpowiedzi na stres oksydacyjny, zagrzybienie, uszkodzenie struktur oraz działanie promieniowania UV. Stilbeny znane są ze swych właściwości

przeciwwzapalnych, przeciwnowotworowych, kardioprotekcyjnych i neuroprotekcyjnych. RSV i PTS występują w dwóch formach stereoizomerycznych, *cis* i *trans*. Wyższą bioaktywność antyoksydacyjną i przeciwnowotworową wykazują izomery *trans*. RSV i PTS ze względu na strukturalne podobieństwo do syntetycznego agonisty endogennego estrogenu, tj. dietylostilbestrolu, jak i zdolności do reagowania z receptorami estrogenowymi, zaliczane są do fitoestrogenów. Liczne badania wskazują na epigenetyczny mechanizm chemoprewencyjnego działania tych polifenoli, obejmujący redukcję metylacji i zwiększenie ekspresji genów supresorowych, m.in. *BRCA1*, *CDKN2A* (ang. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*; *P16*), *ESR1* (ang. *Estrogen Receptor 1*; *ERα*), *PTEN* i/lub *RARB*, w komórkach różnych linii nowotworowych, obejmujących między innymi komórki raka piersi, prostaty i/lub przełyku [3-5, 36].

W ramach realizowanego projektu badawczego wykonano pierwsze i dotychczas jedyne badanie profilu metylacji DNA całego genomu (Epigenome-wide association study (EWAS)) w ludzkich komórkach raka piersi po 4-dniowej i 9-dniowej ekspozycji na RSV, zastosowanego w stężeniu zbliżonym do wartości  $IC_{50}$ , równym 15  $\mu$ M. Analiza danych metylacji DNA w całym genomie, uzyskanych przy zastosowaniu mikromacierzy Illumina 450K ujawniła, że RSV zmienia wzór metylacji DNA w komórkach raka piersi, zarówno po 4-dniowej, jak i 9-dniowej ekspozycji (Nr Gene Expression Omnibus (GEO): GSE80794).

Odnotowano, że spośród genów, których profil metylacji istotnie uległ zmianie po inkubacji komórek raka piersi z RSV, średnio 75% tych genów ma zwiększoną metylację, a geny te charakteryzują się głównie potencjałem onkogennym. Jednym z genów hipermetylowanych pod wpływem RSV był gen *MAML2* (ang. *Mastermind Like Transcriptional Coactivator 2*), koaktywator w szlaku onkogennym NOTCH. Dalsze badania z zastosowaniem pirosekwencjonowania i qPCR wykazały, że w komórkach obu linii raka piersi w odpowiedzi na RSV, *MAML2* ulega jednocześnie metylacji w obrębie sekwencji wzmacniającej (wzmacniacz transkrypcji, ang. *enhancer*) i transkrypcyjnemu wyciszeniu. Prawdopodobnie, obserwacje te mogą wyjaśniać obniżenie poziomu ekspresji docelowych genów (ang. *downstream targets*) szlaku NOTCH, między innymi genów *HES1* (ang. *Hes Family BHLH Transcription Factor 1*), *HEY1* (ang. *Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1*) i *NOTCH1* (ang. *Notch 1*), w komórkach MCF10CA1h i MCF10CA1a po inkubacji z RSV.

Kolejne eksperymenty z wykorzystaniem metody transfekcji komórek z użyciem siRNA (ang. *small interfering RNA*), pozwoliły na „wyciszenie” genu *MAML2* i zbadanie funkcyjnej roli genu *MAML2* w regulacji szlaku onkogennego NOTCH w komórkach linii MCF10CA1a. Ponadto zastosowanie metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) z qPCR ujawniło w regionie hipermetylowanego wzmacniacza genu *MAML2* zmiany w modyfikacjach histonów, wskazujące na skondensowaną i transkrypcyjnie nieaktywną strukturę chromatyny. Obecność heterochromatyny w badanym regionie regulatorowym genu *MAML2* związana była ze zwiększonym wiązaniem metylotransferazy *de novo* DNMT3B w badanym fragmencie genu *MAML2* oraz z osłabionym wiązaniem czynnika transkrypcyjnego OCT1 (ang. *POU domain, class 2, transcription factor 1*; PO2F1) do sekwencji sygnałowej dla OCT1. Sugeruje to, że metylotransferaza DNMT3B może być odpowiedzialna za hipermetylację *MAML2* w komórkach raka piersi pod wpływem RSV. Podobne wyniki otrzymano dla analogu RSV, pterostilbenu (PTS), przy dwukrotnie niższym stężeniu równym 7  $\mu$ M, w komórkach obu linii

raka piersi. Może to wynikać ze znacznie wyższej biodostępności PTS (80% biodostępność) w porównaniu do RSV (20% biodostępność).

W powyższej pracy po raz pierwszy wykazano chemoprewencyjne działanie RSV i PTS w komórkach raka piersi, obejmujące hipermetylację i wyciszenie onkogenu *MAML2*, prowadząc do inhibicji powiązanych wewnątrzkomórkowych, onkogennych szlaków przekazu sygnału, w tym szlaku NOTCH.

W ramach realizacji tego projektu badawczego uczestniczyłam w wykonaniu eksperymentów, obejmujących: hodowle komórkowe, testy MTT, testy inwazyjności i klonogenności komórek, transfekcje komórek z użyciem siRNA, izolacje DNA i RNA, bisulfitową konwersję DNA, konwersję RNA na cDNA, reakcje qPCR, reakcje pirosekwencjonowania, oraz immunoprecypitacje chromatyny (ChIP) z qPCR. Ponadto uczestniczyłam w wykonaniu analizy profilu metylacji DNA całego genomu (ang. *genome-wide DNA methylation analysis*) na podstawie danych uzyskanych metodą mikromacierzy Illumina 450K, przy wykorzystaniu programów do analiz bioinformatycznych, takich jak: Genome Studio Illumina software, RStudio, DAVID knowledgebase, IGV i TRANSFAC.

Poznane innowacyjne metody badawcze oraz zdobyte umiejętności, w tym przede wszystkim wykonywanie analiz bioinformatycznych danych Illumina 450K oraz danych z baz NCI's GDC Data Portal, GEO DataSets i Oncomine, wykorzystywałam w kolejnych badaniach realizowanych w Zakładzie Chemii Biomedycznej, których rezultatem są dwie publikacje (**H4** i **H5**) omówione poniżej.

**H4. Lubecka K, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2018) Inhibition of breast cancer cell growth by the combination of clofarabine and sulforaphane involves epigenetically mediated *CDKN2A* upregulation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 37(5): 280-289. doi: 10.1080/15257770.2018.1453075**

Celem niniejszej pracy była kontynuacja badań podjętych w publikacji **H1**, w której badałam rolę klofarabiny (CIF) w skojarzeniu z bioaktywnym izotiocyjanianem z brokułów, sulforafanem (SFN), w mechanizmie regulacji metylacji i ekspresji genów supresorowych *PTEN* i *RARB* w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231.

Wyniki naszych wcześniejszych badań (publikacja **H1**) wskazują, że SFN (w stężeniu 10  $\mu$ M) zastosowany w skojarzeniu z CIF (w stężeniu  $IC_{50}$ ) powoduje silniejsze zahamowanie wzrostu komórek obu linii raka piersi, oraz uwrażliwia nieinwazyjne komórki raka piersi linii MCF7 na proapoptotyczne działanie CIF, w porównaniu do efektów działania badanych związków zastosowanych osobno. Obserwacje te mogą być związane z istotnym obniżeniem stanu metylacji promotorów genów supresorowych *PTEN* i *RARB*, oraz z ich jednoczesną wzmożoną reaktywacją w komórkach badanych linii nowotworowych.

Powyższe wyniki przyczyniły się do poszukiwania nowych mechanizmów epigenetycznej aktywności chemoprewencyjnej badanego skojarzenia CIF+SFN w modelu *in vitro* ludzkich komórek raka piersi. W prezentowanej pracy zbadałam wpływ kombinacji związków CIF i SFN na stan metylacji i poziom ekspresji genu supresorowego *CDKN2A* (*P16*) w komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231. Gen *CDKN2A* koduje białko supresorowe CDN2A (ang. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), które poprzez negatywną regulację wewnątrzkomórkowego, onkogenego szlaku przekazu sygnału RB (ang. *Retinoblastoma-associated protein*)/E2F (ang. *Transcription factor E2F*) może pośrednio wpływać

na transkrypcyjną aktywność genu *DNMT1*. Dane literaturowe wskazują, że czynnik transkrypcyjny E2F reguluje ekspresję genu *DNMT1*, zawierającego w regionie promotorowych sekwencję sygnałową dla E2F [31].

Ponadto liczne dane literaturowe oraz wyniki wykonanej przeze mnie analizy bioinformatycznej publicznie dostępnych danych z baz The NCI's GDC Data Portal oraz Oncomine, wskazują na jednoczesną zmniejszoną ekspresję genu supresorowego *CDKN2A* i hipermetylację jego promotora w komórkach tkanki nowotworowej gruczołu sutkowego w porównaniu do komórek tkanki zdrowej (tkanki sąsiadującej). Dalsza analiza wybranego (hipermetylowanego) fragmentu regionu promotorowego genu *CDKN2A*, znajdującego się w obrębie wyspy CpG (region bogaty w sekwencje dinukleotydydowe CpG), przy zastosowaniu programu TRANSFAC, pozwoliła na identyfikację licznych sekwencji sygnałowych dla czynników transkrypcyjnych, m.in. AP2A (ang. *Transcription factor AP-2-alpha*) i SP1 (ang. *Transcription factor Sp1*), które nie rozpoznają charakterystycznych dla nich sekwencji w DNA, gdy sekwencje te są metylowane lub gdy metylacja występuje w pobliżu tych sekwencji. Powyższe dane wskazują na potencjalną rolę metylacji w wybranym fragmencie promotora genu *CDKN2A* w regulacji transkrypcji tego genu.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że 96-godzinna inkubacja komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 z badanymi związkami zastosowanymi samodzielnie, CIF (IC<sub>50</sub>), SFN (10 μM), i DAC (IC<sub>50</sub>, odpowiednio 600 nM i 4 μM; związek referencyjny), powodowała istotne zwiększenie poziomu transkryptu genu *CDKN2A*. Jednak jedynie po zastosowaniu CIF w komórkach MCF7 i/lub DAC w komórkach obu linii nowotworowych, obserwowanym zmianom ekspresji genu *CDKN2A* towarzyszył jednoczesny spadek metylacji w regionie promotorowym tego genu. Największy, prawie 3-krotny wzrost ekspresji genu *CDKN2A* zaobserwowano po ekspozycji komórek linii MCF7 na kombinację związków, CIF+SFN, co było związane z istotnym statystycznie obniżeniem poziomu metylacji promotora genu *CDKN2A* (o około 15%), oraz obniżeniem ekspresji genu *DNMT1* (o około 20%).

Zakres zmian metylacji i ekspresji genu supresorowego *CDKN2A* w komórkach obu linii raka piersi po inkubacji z badanymi związkami zastosowanymi samodzielnie i/lub w skojarzeniu wskazuje, że w kontrolę transkrypcyjnej aktywności genu *CDKN2A* mogą być zaangażowane również inne niż metylacja DNA mechanizmy regulatorowe, m.in. modyfikacje histonów. SFN jako silny inhibitor HDAC może zwiększać poziom acetylacji histonów w obrębie regionu promotorowego genu *CDKN2A*, co pozwala na rozluźnienie struktury chromatyny i aktywację transkrypcji genu.

W pracy tej wykazałam po raz pierwszy, że obserwowane istotne zahamowanie wzrostu komórek raka piersi pod wpływem skojarzenia CIF+SFN może być częściowo związane z epigenetyczną, transkrypcyjną reaktywacją genu supresorowego *CDKN2A*, szczególnie w przypadku nieinwazyjnych komórek raka piersi linii MCF7.

H5. **Lubecka K**, Kaufman-Szymczyk A, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Szemraj J, Fabianowska-Majewska K. (2018) Novel Clofarabine-Based Combinations with Polyphenols Epigenetically Reactivate Retinoic Acid Receptor Beta, Inhibit Cell Growth, and Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). pii: E3970. doi: 10.3390/ijms19123970



Celem tej pracy była kontynuacja poszukiwania nowych skojarzeń CIF z bioaktywnymi fitozwiązkami o silnym potencjale chemoprewencyjnym. Jako pierwsza badałam, czy wybrane polifenole, EGCG (galusan epigallokatechiny z zielonej i białej herbaty) i genisteina (4',5,7-trihydroksyizoflawnon, fitoestrogen zawarty w roślinach strączkowych, np. soi), zastosowane w stężeniu istotnym fizjologicznie (10  $\mu\text{M}$ ), mogą wzmacniać przeciwnowotworowe działanie CIF w komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231.

EGCG i genisteina to dobrze znane roślinne flawonoidy o wielokierunkowym działaniu przeciwkancerogennym. Liczne badania *in vitro* wykazały epigenetyczny mechanizm aktywności chemoprewencyjnej EGCG i genisteiny, obejmujący regulację transkrypcyjnej aktywności genów supresorowych poprzez hamowanie procesu metylacji DNA, ale także stymulację reakcji acetylacji histonów, powodując zahamowanie wzrostu i indukcję apoptozy komórek raka piersi, szyjki macicy, prostaty, przelyku i/lub jelita grubego [3, 20, 21]. Zarówno EGCG, jak i genisteina to silne bezpośrednie i pośrednie inhibitory ekspresji i/lub aktywności metylotransferaz DNA (DNMT) [3, 21].

EGCG jest doskonałym substratem dla reakcji metylacji katalizowanych przez katecholową-O-metylotransferazę (COMT, ang. *cathecol-O-methyltransferase*), co powoduje uszczuplenie puli SAM (donor grup metylowych w reakcjach metylacji) i akumulację SAH, która przyczynia się do hamowania reakcji metylacji DNA w wyniku inhibicji zwrotnej. Ponadto EGCG może inaktywować DNMT na skutek wiązania się do centrum katalitycznego enzymu [3, 21]

Epigenetyczną aktywność genisteiny, silnego fitoestrogenu, można przypisać jej zdolności do stymulacji ekspresji genu supresorowego *CDKN1A* poprzez sekwencję ERE (ang. *estrogen response element*) w jego promotorze, a także poprzez tłumienie aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 w wyniku zwiększenia ekspresji genu *PTEN* na poziomie mRNA i białka, jako negatywnego regulatora szlaku onkogenego MAPK/AP-1 [3, 20, 21]. W 2014 roku Xie *i wsp.* wykazali, że genisteina może również bezpośrednio oddziaływać z domeną katalityczną DNMT1 i hamować wiązanie hemimetylowanego DNA do tej domeny [37].

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że 96-godzinna inkubacja komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 z badanymi fitozwiązkami, EGCG i genisteiną, zastosowanymi osobno, powoduje zahamowanie wzrostu komórek obu linii nowotworowych w sposób zależny od stężenia, przy niskiej cytotoksyczności badanych polifenoli. Liczba komórek nekrotycznych nie przekraczała 10% wszystkich komórek, zarówno po hodowli z genisteiną w stężeniach niższych i/lub równych wartościom  $\text{IC}_{50}$  (26  $\mu\text{M}$  dla komórek MCF7 i 28  $\mu\text{M}$  dla komórek MDA-MB-231), jak i dla całego badanego zakresu stężeń EGCG (10-100  $\mu\text{M}$ , nie osiągnięto wartości  $\text{IC}_{50}$ ). Zarówno EGCG w stężeniach 10  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ , jak i genisteina w stężeniu równym  $\text{IC}_{50}$  (26  $\mu\text{M}$ ), znacząco indukowały apoptozę nieinwazyjnych komórek raka piersi linii MCF7.

Testy skojarzone CIF ( $\text{IC}_{50}$ ) z EGCG i/lub genisteiną, zastosowanymi w stężeniu istotnym fizjologicznie, równym 10  $\mu\text{M}$ , wykazały odpowiednio synergistyczną (CIF+EGCG) i/lub addytywną (CIF+Genisteina) inhibicję wzrostu komórek linii MCF7 i MDA-MB-231, oraz w przypadku nieinwazyjnych komórek raka piersi również wzmożony efekt proapoptotyczny, w porównaniu z efektem uzyskanym dla badanych związków użytych osobno. Obserwowane zmiany w komórkach MCF7 nie były jednak związane z reaktywacją ekspresji genu *TP53*, jak obserwowano w przypadku skojarzenia CIF+SFN (praca H1).

Inwazyjne komórki MDA-MB-231 okazały się odporne na proapoptotyczne działanie badanych związków, chociaż badane skojarzenia CIF+EGCG oraz CIF+Genisteina powodowały istotny 10% wzrost liczby komórek z aktywną kaspazą 3.

W prezentowanej pracy oceniałam również efekty działania CIF, EGCG, genisteiny oraz skojarzeń CIF z EGCG i/lub z genisteiną na metylację i ekspresję wybranych genów supresorowych w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231. W badaniach uwzględniono geny analizowane w pracy **H1**, m.in. oceniono stan metylacji genów supresorowych *RARB* i *PTEN* oraz ekspresję tych genów, jak również ekspresję genów *DNMT1*, *CDKN1A* i *TP53*.

W celu weryfikacji regulatorowej roli wybranych fragmentów regionów promotorowych badanych genów supresorowych wykonałam analizę bioinformatyczną publicznie dostępnych danych z baz GEO DataSets (badanie Illumina 450K o numerze GSE66695) i Oncomine. Wyniki analizy zilustrowane w pracy **H5** dla genu *RARB* wskazują na obniżoną ekspresję genu w komórkach tkanek wielu typów nowotworów w porównaniu do komórek tkanek zdrowych (tkanek sąsiadujących). Ponadto dalsza analiza wybranego (hipermetylowanego) fragmentu regionu promotorowego genu *RARB*, znajdującego się w obrębie sekwencji wzmacniającej (ang. *enhancer*) przy zastosowaniu programu TRANSFAC, pozwoliła na identyfikację w pobliżu badanej sekwencji CpG (cg06720425, oddalona od miejsca startu transkrypcji o -139 pz) licznych sekwencji sygnałowych dla czynników transkrypcyjnych związanych z aktywnością wzmacniacza transkrypcji, m.in. C/EBPA (ang. *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*) i C/EBPB (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein beta*).

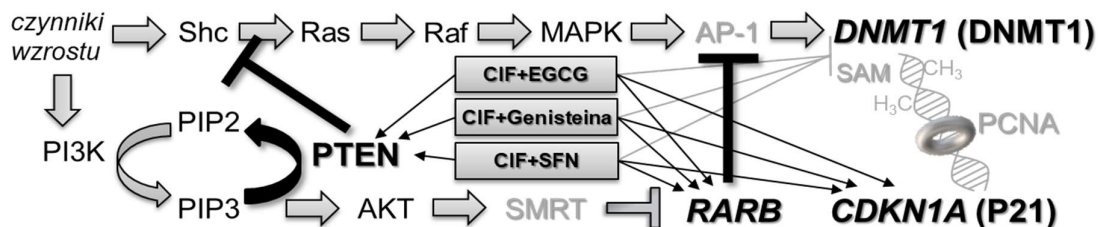
Podobnie jak w pracy **H1**, stan metylacji wybranych fragmentów promotorów genów *RARB* i *PTEN* oznaczano w oparciu o metodę MSRA [32], a ilościową ocenę ekspresji genów *RARB*, *PTEN* oraz *DNMT1*, *CDKN1A* i *TP53* na poziomie mRNA wykonano techniką *real-time* PCR [33]. Zarówno w komórkach MCF7, jak i MDA-MB-231, CIF, EGCG i genisteina zastosowane osobno prowadziły do obniżenia metylacji promotorów genów *RARB* i *PTEN* przy jednoczesnym zwiększeniu ich ekspresji. Co ciekawe, silniejszy efekt epigenetyczny, tj. obniżenie metylacji i reaktywacja ekspresji genów *RARB* i *PTEN*, zaobserwowano po inkubacji komórek MCF7 i MDA-MB-231 z EGCG i/lub genisteiną w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  niż w stężeniach wyższych (EGCG w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  i genisteina w stężeniach odpowiednio 26  $\mu\text{M}$  i 28  $\mu\text{M}$ ). Podobne obserwacje odnotowano również w pracach innych zespołów badawczych [3].

Nasze badania po raz pierwszy wykazały, że szczególnie EGCG istotnie wzmacnia przeciwnowotworowy, epigenetyczny efekt działania CIF, zarówno w komórkach MCF7 i MDA-MB-231. W nieinwazyjnych komórkach raka piersi obserwowane zmiany w metylacji i ekspresji genów supresorowych *RARB* i *PTEN* pod wpływem skojarzenia CIF+EGCG były związane z silniejszą stymulacją ekspresji genu *CDKN1A* oraz ze zwiększonym wyciszeniem transkrypcyjnej aktywności genu *DNMT1*. Obserwowany wielokrotny wzrost ekspresji genu *CDKN1A*, kodującego białko P21, które współzawodniczy z białkiem DNMT1 o wiązanie z PCNA, może przyczyniać się do inhibicji procesu metylacji DNA poprzez zakłócanie interakcji między białkami DNMT1 i PCNA [29, 30]. Ponadto podobnie jak pod wpływem skojarzenia CIF+SFN, także po ekspozycji na skojarzenie CIF+EGCG, w komórkach MCF7 odnotowano wielokrotny wzrost poziomu mRNA genu *RARB*, nieadekwatny do demetylacji jego promotora. Może to sugerować, że w modulację biologicznej aktywności genu *RARB* mogą być zaangażowane inne pośrednie mechanizmy regulatorowe, np. poprzez reaktywację

białka PTEN. Wykazano, że białko supresorowe PTEN poprzez negatywną regulację szlaku onkogenego PI3K/AKT, hamuje rekrutację SMRT (ang. *corepressor mediator for retinoic and thyroid hormone receptors*) w obrębie promotora genu *RARB*, zwiększając poziom acetylacji histonów H3 i H4, i jednocześnie transkrypcyjną aktywność genu *RARB* [34].

Według naszej najlepszej wiedzy w pracy tej po raz pierwszy wykazano wspomagające, chemoprewencyjne działanie EGCG i genisteiny w skojarzeniu z CIF w ludzkich komórkach raka piersi. Ponadto nasze badania wskazują, że skojarzenia CIF+EGCG oraz CIF+Genisteina mogą zmieniać profil metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych, z profilu charakterystycznego dla komórek nowotworowych (MCF7 i/lub MDA-MB-231) na profil obserwowany w komórkach prawidłowych (MCF10A).

Poniżej prezentuję schemat, który podsumowuje najważniejsze wyniki badań opisane w pracach **H1**, **H2**, **H4**, i **H5**, oraz obrazuje potencjalne zależności pomiędzy badanymi genami i białkami kodowanymi przez te geny.



**Schemat.** Rola badanych skojarzeń CIF z EGCG, genisteiną i/lub SFN w potencjalnej inhibicji ekspresji i/lub aktywności DNMT1 w ludzkich komórkach raka piersi. Rola białek supresorowych PTEN i RARB w negatywnej regulacji wewnątrzkomórkowych onkogennych szlaków przekazu sygnału, w tym szlaków MAPK/AP-1 oraz PI3K/AKT. Współzawodnictwo enzymu DNMT1 i białka supresorowego P21 o wiązanie do PCNA. Skróty: Shc, ang. *SH2-containing collagen-related proteins*; MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*; AP-1, ang. *activator protein 1*; PI3K, ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*; PIP2, ang. *phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*; PIP3, ang. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*; SMRT, ang. *thyroid-, retinoic-acid-receptor-associated corepressor*; SAM, ang. *S-adenosyl-L-methionine*; PCNA, ang. *proliferating cell nuclear antigen (H5)*.

#### IV. Wnioski

Badania *in vitro* przeprowadzone na komórkach dwóch linii raka piersi o różnej inwazyjności wykazały, że nowe skojarzenia CIF z wybranymi fitozwiązkami, EGCG, genisteiną i SFN, hamują wzrost i indukują apoptozę komórek nowotworowych oraz prowadzą do demetylacji i reaktywacji ekspresji genów supresorowych, kodujących białka o kluczowej roli w rozwoju i progresji raka piersi. Obecnie badania te są kontynuowane w Zakładzie Chemii Biomedycznej i stały się podstawą do przygotowania projektu badawczego OPUS-16 do Narodowego Centrum Nauki (NCN). Założeniem przedłożonego projektu jest innowacyjny wgląd w mechanizm działania naturalnych oraz syntetycznych związków modulujących ekspresję enzymów epigenetycznych, jako skutecznych czynników przeciwnowotworowych, przywracających równowagę sieci epigenetycznej w różnych typach komórek nowotworowych.

**Do najważniejszych osiągnięć swojej pracy zaliczam wykazanie po raz pierwszy, że:**

1. Wszystkie badane skojarzenia, CIF+SFN, CIF+EGCG oraz CIF+Genisteina, istotnie hamują wzrost komórek raka piersi, zarówno we wczesnym, jak i późnym stadium rozwoju raka piersi, odpowiednio komórek linii MCF7 i MDA-MB-231.
2. Kombinacja CIF+EGCG powoduje najsilniejszą, synergistyczną inhibicję wzrostu komórek linii MCF7 i MDA-MB-231, a kombinacje CIF+Genisteina i/lub CIF+SFN wykazują efekt addytywny.
3. Wszystkie badane fitozwiązki zastosowane w połączeniu z CIF uwrażliwiają nieinwazyjne komórki raka piersi linii MCF7 na proapoptotyczne działanie CIF, najsilniej w przypadku skojarzeń CIF+EGCG i CIF+Genisteina, które zwiększają także aktywność kaspazy 3 w inwazyjnych komórkach raka piersi linii MDA-MB-231.
4. Wszystkie badane fitozwiązki wzmacniają przeciwnowotworowy, epigenetyczny efekt działania CIF, szczególnie we wczesnym stadium raka piersi (komórki linii MCF7).
5. Badane skojarzenia powodują jednoczesne, silniejsze obniżenie poziomu metylacji i zwiększenie ekspresji na poziomie mRNA badanych genów supresorowych, głównie *PTEN* i *RARB*, w komórkach obu linii raka piersi, w porównaniu do efektów działania badanych związków zastosowanych osobno.
6. Obserwowane zmiany w metylacji i ekspresji badanych genów supresorowych pod wpływem testowanych skojarzeń są związane z silną reaktywacją ekspresji genu supresorowego *CDKN1A* w obu liniach nowotworowych, a w nieinwazyjnych komórkach raka piersi również z obniżeniem ekspresji genu *DNMT1*, najsilniejszym dla kombinacji CIF+EGCG.
7. Skojarzenia CIF+EGCG oraz CIF+Genisteina mogą zmieniać profil metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych, z profilu charakterystycznego dla komórek nowotworowych (MCF7 i/lub MDA-MB-231) na profil obserwowany w komórkach prawidłowych (MCF10A).

**5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

**Dane bibliometryczne dla pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor*: **26,402** (prace oryginalne – **25,739**),  
w tym jako pierwszy autor: **14,882** (prace oryginalne)

Suma punktów MNiSW: **254** (prace oryginalne – **235**),  
w tym jako pierwszy autor: **140** (prace oryginalne)

Łącznie **150** cytowań, indeks Hirscha wynosi **6**  
(Źródło: ISI Web of Science)

Łącznie **168** cytowań, indeks Hirscha wynosi **6**  
(Źródło: Scopus)

## Pozostałe osiągnięcia naukowe

### Prace oryginalne:

- P1. Beetch M<sup>#</sup>, **Lubecka K<sup>#</sup>**, Kristofzski H, Suderman M, Stefanska B. (2018) Subtle Alterations in DNA Methylation Patterns in Normal Cells in Response to Dietary Stilbenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*, May 24: e1800193. doi: 10.1002/mnfr.201800193  
**Wskaźnik IF: 5,151, MNiSW: 45**, <sup>#</sup> równy udział autorów  
**Back cover:** <https://doi.org/10.1002/mnfr.201870076>
- P2. **Lubecka K**, Flower K, Beetch M, Qiu J, Kurzava L, Buvala H, Ruhayel A, Gawrieh S, Liangpunsakul S, Gonzalez T, McCabe G, Chalasani N, Flanagan JM, Stefanska B. (2018) Loci-specific differences in blood DNA methylation in HBV-negative populations at risk for hepatocellular carcinoma development. *Epigenetics*, 13(6): 605-626. doi: 10.1080/15592294.2018.1481706  
**Wskaźnik IF: 4,918, MNiSW: 40**
- P3. Choudhury SR, Cui Y, **Lubecka K**, Stefanska B, Irudayaraj J. (2016) CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*. 7(29): 46545-46556. doi: 10.18632/oncotarget.10234  
**Wskaźnik IF: 5,168, MNiSW: 35**
- P4. Abramczyk H, Surmacki J, Kopeć M, Olejnik AK, **Lubecka-Pietruszewska K**, Fabianowska-Majewska K. (2015) The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *Analyst*, 140(7): 2224-2235. doi: 10.1039/c4an01875c  
**Wskaźnik IF: 4,033, MNiSW: 40**
- P5. **Lubecka-Pietruszewska K\***, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K. (2014) Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumour suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 723: 276-287. doi: 10.1159/000439111  
**Wskaźnik IF: 2,532, MNiSW: 30**, \* autor korespondencyjny
- P6. **Lubecka-Pietruszewska K<sup>\*\*</sup>**, Kaufman-Szymczyk A<sup>#</sup>, Stefanska B, Fabianowska-Majewska K. (2013) Folic acid enforces DNA methylation-mediated transcriptional silencing of *PTEN*, *APC* and *RARBeta2* tumour suppressor genes in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(2): 623-628. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.103  
**Wskaźnik IF: 2,281, MNiSW: 20**, <sup>#</sup> równy udział autorów, \* autor korespondencyjny
- P7. **Lubecka-Pietruszewska K\***, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2011) Clofarabine influence on methylation and expression of *RARB $\beta$ 2* and *PTEN* genes in MCF 7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines. *Onkologia Polska*, 14(4): 169-173.  
**MNiSW: 5**, \* autor korespondencyjny

- P8. Majda K, Kaufman-Szymczyk A, **Lubecka-Pietruszewska K**, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. (2010) Influence of clofarabine on transcriptional activity of *PTEN*, *APC*, *RARBeta2*, *ZAP70* genes in K562 cells. *Anticancer Research*, 30(11): 4601-4606.

**Wskaźnik IF: 1,656, MNiSW: 20**

#### **Prace poglądowe:**

- P9. Majewski G, **Lubecka-Pietruszewska K**, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2012) Anticancer properties of selected plant polyphenols from the group of flavonoids and stilbenes. *Zdrowie Publiczne*, 122(4): 434-439.

**MNiSW: 4**

- P10. Majda K, **Lubecka K**, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2011) Clofarabine (2- chloro-2'-fluoro-2'-deoxyarabinosyladenine) - biochemical aspects of anticancer activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68(4): 459-466.

**Wskaźnik IF: 0,663, MNiSW: 15**

#### **Rozdział w książce:**

- P11. Beetch M, Bai Y, **Lubecka K**, Stefanska B, Lelièvre SA. (2018) Chapter 24 - Aberrant DNA Methylation Patterns in Gynecologic Cancers: Implications for Prevention and Therapy. Editor(s): Trygve O. Tollefsbol. In *Translational Epigenetics, Epigenetics in Human Disease (Second Edition)*, Academic Press, Volume 6: 751-780.

#### **Prace oryginalne w przygotowaniu:**

- P12. Kaufman-Szymczyk A, Majda K, Szulawska-Mroczek A, Fabianowska-Majewska K, **Lubecka K**. Clofarabine-ATRA combination exposure in CML cells inhibit DNA methylation machinery, upregulate tumor suppressor genes and promote caspase-dependent apoptosis. *Molecules*, Special Issue: *Recent Development of Nucleic Acid Analogs* (w przygotowaniu).

**Wskaźnik IF: 3,098, MNiSW: 30**

- P13. **Lubecka K**, Kaufman-Szymczyk A, Jakubik J, Szulawska-Mroczek A, Fabianowska-Majewska K. Folic acid supplementation remodels DNA methylation profile in maternal blood DNA dependently on *MTHFR* genotype. *Nutrients*, Special Issue: *Dietary Folate and Human Health* (w przygotowaniu).

**Wskaźnik IF: 4,196, MNiSW: 35**

#### **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Tematyka mojej dotychczasowej działalności naukowej obejmuje kilka kierunków:

- **Badanie *in vitro* roli klofarabiny (CIF) w mechanizmie regulacji metylacji i ekspresji wybranych genów w ludzkich komórkach linii białaczkowych (P8, P10).**

Pracę naukową rozpoczęłam w 2006 roku w zespole prof. dr hab. n. med. Krystyny Fabianowskiej-Majewskiej w Zakładzie Chemii Biomedycznej na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, jako studentka drugiego roku jednolitych studiów magisterskich na kierunku Zdrowie Publiczne i przewodnicząca Studenckiego Koła

Naukowego przy Zakładzie Chemii Biomedycznej. W początkowym okresie współpracowałam z dr n. med. Barbarą Stefanską oraz dr n. med. Katarzyną Majdą, a następnie również z dr. inż. Agnieszką Kaufman-Szymczyk, uczestnicząc w badaniach nad przeciwnowotworowymi właściwościami klofarabiny (CIF). Badania były przeprowadzone z wykorzystaniem modelu *in vitro*, ludzkich komórek białaczki erytrocytarnej linii K-562, reprezentujących komórki przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myeloid leukaemia*, CML).

Celem badań była ocena roli klofarabiny w mechanizmie regulacji metylacji DNA i ekspresji wybranych genów w komórkach linii K-562. Moim zadaniem była pomoc w ocenie wpływu klofarabiny na zahamowanie wzrostu komórek przy zastosowaniu testu barwienia komórek błękitem trypanu oraz na indukcję apoptozy komórek z użyciem cytometrii przepływowej.

Wykazano, że CIF po 72-godzinnej i/lub 96-godzinnej inkubacji w stężeniu równym 8 nM hamuje wzrost komórek linii K-562 w 50% względem komórek kontrolnych, hodowanych w medium bez leku, i nieznacznie indukuje apoptozę komórek K-562. Zaobserwowano po raz pierwszy, że CIF powoduje demetylację i reaktywację ekspresji wybranych genów supresorowych, przy prawie 30% spadku poziomu mRNA genu *DNMT1* w komórkach K-562 (P8). Poza współudziałem w badaniach eksperymentalnych jestem również współautorką artykułu przeglądowego dotyczącego mechanizmów przeciwnowotworowego działania CIF (P10).

- **Badanie *in vitro* roli kwasu foliowego w regulacji transkrypcyjnej aktywności wybranych genów w ludzkich komórkach linii białaczkowych oraz raka piersi (P6).**

Od 2007 roku, z pomocą dr Barbary Stefanskiej, a następnie dr Agnieszki Kaufman-Szymczyk zostałam zaangażowana w badania nad rolą kwasu foliowego w mechanizmie regulacji metylacji i ekspresji wybranych genów supresorowych w ludzkich komórkach linii nowotworowych. Badane linie nowotworowe obejmowały komórki linii K-562 (CML) oraz dwie linie raka piersi, nieinwazyjną hormono-zależną MCF7 oraz wysoce inwazyjną, hormono-niezależną MDA-MB-231.

Moje zadania badawcze objęły hodowlę komórek, oraz inkubację komórek z kwasem foliowym w różnych stężeniach i przy różnym czasie ekspozycji. Następnie izolowałam DNA i RNA z osadów komórkowych badanych linii nowotworowych. Nauczyłam się metody konwersji RNA na cDNA przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy. Uzyskany materiał DNA i cDNA pozwolił mi odpowiednio na ocenę stanu metylacji regionów promotorowych wybranych genów supresorowych metodą MSRA [32] oraz ocenę ekspresji na poziomie mRNA badanych genów metodą *real-time* PCR [33].

Ku naszemu zaskoczeniu, otrzymane wyniki badań nie potwierdziły postawionych hipotez badawczych o chemoprewenyjnych właściwościach kwasu foliowego w modelu *in vitro* ludzkich komórek raka piersi, MCF7 i MDA-MB-231. Kwas foliowy zastosowany w stężeniach równych 4 mg/dm<sup>3</sup> i 8 mg/dm<sup>3</sup> zwiększał już wysoki poziom metylacji, prowadząc do dalszego spadku ekspresji genów supresorowych w komórkach badanych linii nowotworowych, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Otrzymane wyniki opisałam w pracy magisterskiej pt.: „*Rola kwasu foliowego w epigenetycznej regulacji aktywności genów*”, której promotorem była prof. Krystyna

Fabianowska-Majewska. W lipcu 2009 roku obroniłam pracę magisterską, która została wyróżniona Nagrodą Rektora.

W kolejnych latach kontynuowałam projekt badawczy, pt.: „*Rola kwasu foliowego w epigenetycznej regulacji aktywności wybranych genów supresorowych w ludzkich komórkach linii nowotworowych*”, finansowany przez Uniwersytet Medyczny (UM nr 502-03/6-099-01/502-64-057). Otrzymane wyniki badań opublikowałyśmy w pracy oryginalnej (P6).

- **Badanie *in vitro* roli analogów nukleozydów (CIF, DAC) i naturalnych związków bioaktywnych (EGCG, genisteina, SFN) w mechanizmie regulacji metylacji i ekspresji wybranych genów w ludzkich komórkach raka piersi (P4, P5, P7, P9).**

W latach 2009-2014 jako doktorantka w Zakładzie Chemii Biomedycznej, pod opieką prof. Krystyny Fabianowskiej-Majewskiej, realizowałam badania *in vitro*, których celem była ocena wpływu klofarabiny (CIF) i wybranych polifenoli w mechanizmie regulacji metylacji i ekspresji wybranych genów w ludzkich komórkach raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231. W roku 2011 otrzymałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (NCN), w ramach konkursu PRELUDIUM-1 (NCN nr 2011/01/N/NZ2/01697), na realizację projektu badawczego pt.: „*Rola roślinnych polifenoli i klofarabiny w epigenetycznej regulacji transkrypcji wybranych genów supresorowych w komórkach linii raka piersi*”, w którym pełniłam rolę kierownika i głównego wykonawcy projektu.

W ramach ww. projektu badałam wpływ klofarabiny i wybranych polifenoli (galusan epigallokatechiny, genisteina i sulforafan) na przeżywalność komórek raka piersi, obserwując zahamowanie wzrostu i indukcję apoptozy komórek obu linii raka piersi, zależne od dawki badanych związków. Wykazałam, że syntetyczny antymetabolit, CIF hamuje wzrost komórek raka piersi w 50% (IC<sub>50</sub>) względem komórek kontrolnych już w nanomolowych (nM) stężeniach, w porównaniu do naturalnych związków bioaktywnych zastosowanych w stężeniach mikromolowych (µM). Ponadto oceniłam wpływ badanych związków na metylację promotorów wybranych genów supresorowych i ekspresję tych genów w komórkach badanych linii nowotworowych. W badaniach po raz pierwszy wykazano rolę CIF w epigenetycznej regulacji transkrypcyjnej aktywności wybranych genów supresorowych w komórkach raka piersi o różnej inwazyjności.

Wyniki powyższych badań opublikowano w dwóch pracach oryginalnych (P5, P7), których uzupełnieniem była praca przeglądowa na temat przeciwnowotworowych właściwości wybranych roślinnych polifenoli (P9). W lutym 2014 roku obroniłam pracę doktorską, która została wyróżniona Nagrodą Rektora.

W roku 2013, w ramach współpracy prof. Krystyny Fabianowskiej-Majewskiej z prof. Haliną Abramczyk, brałam udział w realizacji projektu badawczego, pt.: „*Zastosowanie spektroskopii wibracyjnej i spektroskopii femtosekundowej w diagnostyce onkologicznej ludzkiego gruczołu piersiowego*” (UMO-2012/07/B/ST4/01588). Zostałam zaangażowana w prowadzenie hodowli komórkowych linii nowotworowych (MCF7, MDA-MB-231) i nienowotworowych (MCF10A), zarówno bez leku, jak i z lekiem (CIF), wykorzystywanych do analiz pojedynczych komórek metodą spektroskopii ramanowskiej, oraz porównania rozmieszczenia i zagęszczenia „kropli lipidowych” w komórkach ww. linii nowotworowych



i nienowotworowych. Współpraca z prof. Haliną Abramczyk oraz Jej Zespołem była dla mnie okazją do poznania nowych metod badawczych, w tym spektroskopii Ramana, w Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej na Wydziale Chemicznym, Politechniki Łódzkiej. Wyniki powyższych badań opublikowano w pracy oryginalnej (P4).

W kolejnych latach kontynuowałam badania rozpoczęte podczas pracy doktorskiej, w ramach zadania badawczego finansowanego z działalności statutowej naszego zakładu pt: „*Badanie mechanizmu cytotoksyczności analogów nukleozydów w komórkach ludzkich linii nowotworowych*” oraz w ramach projektu badawczego uczelni służącego rozwojowi młodych naukowców, pt.: „*Epigenetyczne mechanizmy działania wybranych naturalnych związków bioaktywnych w prewencji i terapii chorób nowotworowych*”, finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (UM nr 502-03/6-099-01/502-64-133; rodzaj pracy: habilitacyjna). Otrzymane i opublikowane wyniki badań dotyczących nowych skojarzeń kłofarabiny z wybranymi fitozwiązkami i ich epigenetycznych mechanizmów przeciwnowotworowego działania w komórkach raka piersi stanowią podstawę mojego wniosku habilitacyjnego.

W latach 2014-2017 w ramach stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Purdue miałam przyjemność ponownie pracować z dr Barbarą Stefanską, w Jej laboratorium Nutriepigenomiki (Department of Nutrition Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA).

W trakcie stażu podoktorskiego byłam zaangażowana w realizację szeregu projektów badawczych, m.in.

- **Badanie *in vitro* wpływu roślinnych polifenoli, w tym stilbenów z czerwonych winogron i borówek amerykańskich (resweratrol i pterostilben) oraz polifenoli z kawy (kwas chlorogenowy i kwas kawowy), na profil metylacji i ekspresji genów w ludzkich komórkach linii raka piersi i wątroby oraz komórkach linii nienowotworowych (prawidłowych) (H3, P1, P3).** (Nr GEO: GSE80794 oraz GSE113299)
- **Badanie profilu metylacji DNA w krwi pacjentów przed i po diagnozie pierwotnego raka wątroby, w celu identyfikacji i walidacji epigenetycznych biomarkerów wczesnej detekcji tego nowotworu (P2).** (Nr GEO: GSE113409 oraz GSE113392)
- **Bioinformatyczna analiza danych uzyskanych z zastosowaniem metod mikromacierzy i sekwencjonowania całego genomu (Illumina 450K, RNA-Seq, ChIP-Seq), przy użyciu oprogramowania Genome Studio Illumina software, RStudio, SAS software, Galaxy, DAVID knowledgebase, oraz TRANSFAC (H3, P1, P2, P11).**

W ww. projektach badawczych byłam odpowiedzialna za wykonanie następujących eksperymentów, obejmujących: hodowle komórkowe (linie MCF10CA1h, MCF10CA1a, MCF10A, HMEC, MCF7, MDA-MB-231, HepG2, SkHep1, Hep3B, prawidłowe hepatocyty), testy MTT, testy inwazyjności i klonogenności komórek, transfekcje komórek z użyciem siRNA, izolacje DNA i RNA, bisulfitową konwersję DNA, konwersję RNA na cDNA, reakcje qPCR, reakcje pirosekwencjonowania, immunoprecypitację chromatyny (ChIP) z qPCR, oraz wykonanie analiz profilu metylacji DNA całego genomu na podstawie danych uzyskanych metodą mikromacierzy Illumina 450K.

W trakcie stażu poznałam szereg zaawansowanych i innowacyjnych metod badawczych, m.in. mikromacierz Illumina 450K, pirosekwencjonowanie, immunoprecypitacja chromatyny (ChIP), CRISPR-dCas9 (P3), RNA-Seq, ChIP-Seq. Nauczyłam się również obsługi programów do analiz bioinformatycznych danych uzyskanych z mikromacierzy Illumina 27K, 450K i/lub 850K, oraz po sekwencjonowaniu całego genomu (RNA-Seq i ChIP-Seq), m.in. Genome Studio Illumina software, Galaxy, DAVID knowledgebase, JASPAR, TRANSFAC, RStudio oraz SAS software.

Ponadto w latach 2014 i 2016 odbyłam szkolenia z zakresu pracy badawczej na modelach zwierzęcych w jednostce The U.S. Food and Drug Administration's National Center for Toxicological Research (NCTR, Jefferson, AR, USA) oraz w ramach spotkań Laboratory Animal Program (LAP) na Uniwersytecie Purdue (West Lafayette, IN, USA). Szkolenia te pozwoliły mi współuczestniczyć w następujących projektach:

- **Badanie epigenetycznych mechanizmów polifenoli (RSV, PTS, kwas chlorogenowy) w prewencji pierwotnego raka wątroby w szczurzym modelu *in vivo* (P1)**
- **Badanie epigenetycznych mechanizmów polifenoli w prewencji zapalenia i nowotworów okrężnicy w mysim modelu *in vivo*** (projekt we współpracy z Dr Heather M. O'Hagan, Assistant Professor of Medical & Molecular Genetics, Indiana University, Bloomington, IN, USA).

Wyniki powyższych badań opublikowano w czterech pracach oryginalnych (H3, P1, P2, P3), oraz zaprezentowano w ramach 23 konferencji krajowych i/lub międzynarodowych, w 35 komunikatach zjazdowych. W 3 z tych 4 publikacji jestem pierwszym autorem.

Od października 2017 roku pełnię obowiązki (p.o.) Kierownika Zakładu Chemii Biomedycznej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W Zakładzie, razem z dr. inż. Agnieszką Kaufman-Szymczyk, dr n. med. Anną Klimczak-Bitner oraz dr n. med. Agatą Szulawską-Mroczek, realizujemy następujące projekty badawcze:

- **Badanie wpływu naturalnych i syntetycznych związków bioaktywnych na profil metylacji i ekspresji całego genomu przy zastosowaniu analiz bioinformatycznych publicznie dostępnych danych z bazy GEO DataSets (P12, P13, w przygotowaniu).**
- **Badanie epigenetycznych mechanizmów działania CIF i kwasu foliowego w komórkach różnych linii białaczkowych (P12, P13, w przygotowaniu).**
- **Identyfikacja i walidacja potencjalnych epigenetycznych biomarkerów prognostycznych raka piersi przy zastosowaniu dostępnego modelu *in vivo* (FFPE) oraz danych bioinformatycznych** (W dniu 5 września 2017 roku otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - Nr RNN/294/17/KE).
- **Identyfikacja oraz walidacja potencjalnych epigenetycznych biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych raka piersi w modelu *in vivo*, obejmującym próbki krwi żyłnej** (W dniu 19 grudnia 2017 roku otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - RNN/370/17/KE).

- **Ocena ekspresji wybranych genów związanych z powstawaniem nowotworu przelyku** (W dniu 5 września 2017 roku otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - Nr RNN/293/17/KE).

Wyniki dotychczasowych badań stały się podstawą do przygotowania dwóch prac oryginalnych (**P12, P13**).

## 6. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje **15** publikacji pełnotekstowych, w tym **12** prac oryginalnych i **3** artykuły poglądowe, oraz **1** rozdział w książce. W **9** z tych **15** publikacji jestem pierwszym autorem.

### Dane bibliometryczne

Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor*: **40,770**  
w tym jako pierwszy autor: **25,993**

Suma punktów MNiSW: **384**,  
w tym jako pierwszy autor: **240**

Łącznie **190** cytowań, indeks Hirscha wynosi **8**  
(Źródło: ISI Web of Science Core Collection)

Łącznie **218** cytowania, indeks Hirscha wynosi **8**  
(Źródło: Scopus).

## 7. Piśmiennictwo

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68: 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Holliday DL, Speirs V. (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13: 215. doi: 10.1186/bcr2889.
3. Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, Haslberger A. (2012) Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components – the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol.* 167: 279-297. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02002.x.
4. Stefanska B, Rudnicka K, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. (2010) Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 638: 47-53. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.032.
5. Stefanska B, Salamé P, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. (2012) Comparative effects of retinoic acid, vitamin D and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues on methylation and expression of phosphatase and tensin homologue tumour suppressor gene in breast cancer cells. *Br J Nutr.* 107: 781-790. doi: 10.1017/S0007114511003631.
6. Cantley LC, Neel BG. (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 4240-4245.

7. Gu J, Tamura M, Yamada KM. (1998) Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* 143: 1375-1383.
8. Balch C, Montgomery JS, Paik H-I, Kim S, Huang TH-M, Nephew KP. (2005) New anti-cancer strategies: epigenetic therapies and biomarkers. *Front Biosci.* 10: 897-1931.
9. Chiang PK. (1998) Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther.* 77: 115-134.
10. Fabianowska-Majewska K, Ruckemann K, Duley JA, Simmonds HA. (1998) Effect of cladribine, fludarabine, and 5-aza-deoxycytidine on S-adenosylmethionine (SAM) and nucleotides pools in stimulated human lymphocytes. *Adv Exp Med Biol.* 431: 531-535.
11. Galmarini CM, Popowycz F, Joseph B. (2008) Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy. *Curr Med Chem.* 15: 1072-1082.
12. Bonate PL, Arthaud L, Cantrell WR Jr, Stephenson K, Secrist JA 3rd, Weitman S. (2006) Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. *Nature Rev.* 5: 855-863. doi: 10.1038/nrd2055.
13. Xie KC, Plunkett W. (1996) Deoxynucleotide pool depletion and sustained inhibition of ribonucleotide reductase and DNA synthesis after treatment of human lymphoblastoid cells with 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl) adenine. *Cancer Res.* 56: 3030-3037.
14. Genini D, Adachi S, Chao Q, Rose DW, Carrera CJ, Cottam HB, Carson DA, Leoni LM. (2000) Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood.* 96: 3537-3543.
15. Majda K, Lubecka K, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. (2011) Clofarabine (2- chloro-2'-fluoro-2'-deoxyarabinosyladenine) - biochemical aspects of anticancer activity. *Acta Pol Pharm.* 68: 459-466.
16. Majda K, Kaufman-Szymczyk A, Lubecka-Pietruszewska K, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. (2010) Influence of clofarabine on transcriptional activity of *PTEN*, *APC*, *RARBeta2*, *ZAP70* genes in K562 cells. *Anticancer Res.* 30: 4601-4606.
17. Lin F, Xiao D, Kolluri SK, Zhang X. (2000) Unique anti-activatorprotein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res.* 60: 3271-3280.
18. Polakis P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14: 1837-1851.
19. Lubecka-Pietruszewska K, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K. (2014) Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumour suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 723: 276-287. doi: 10.1159/000439111
20. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. (2005) Reversal of hypermethylation and reactivation of *p16INK4a*, *RARBeta*, and *MGMT* genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res.* 11: 7033-7041. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0406.
21. Fang M, Chen D, Yang CS. (2007) Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr.* 137: 223S-228S. doi: 10.1093/jn/137.1.223S.
22. Lee YJ, Im JH, Lee DM, Park JS, Won SY, Cho MK, Nam HS, Lee YJ, Lee SH. (2012) Synergistic inhibition of mesothelioma cell growth by the combination of clofarabine and resveratrol involves Nrf2 downregulation. *BMB Rep.* 45: 647-652.
23. Lee YJ, Lee YJ, Im JH, Won SY, Kim YB, Cho MK, Nam HS, Choi YJ, Lee SH. (2013) Synergistic anti-cancer effects of resveratrol and chemotherapeutic agent clofarabine against human malignant mesothelioma MSTO-21 IH cells. *Food Chem Toxicol.* 52: 61-68. doi: 10.1016/j.fct.2012.10.060.

24. Lee YJ, Hwang IS, Lee YJ, Lee CH, Kim SH, Nam HS, Choi YJ, Lee SH. (2014) Knockdown of Bcl-xL enhances growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects of resveratrol and clofarabine in malignant mesothelioma H-2452 cells. *J Korean Med Sci.* 29: 1464-1472. doi: 10.3346/jkms.2014.29.11.1464.
25. Lee YJ, Park IS, Lee YJ, Shim JH, Cho MK, Nam HS, Park JW, Oh MH, Lee SH. (2014) Resveratrol contributes to chemosensitivity of malignant mesothelioma cells with activation of p53. *Food Chem Toxicol.* 63: 153-160. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.004.
26. Lee YJ, Lee YJ, Lee SH. (2015) Resveratrol and clofarabine induces a preferential apoptosis-activating effect on malignant mesothelioma cells by Mcl-1 down-regulation and caspase-3 activation. *BMB Rep.* 48: 166-171.
27. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2399-23403.
28. Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E. (2011) Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res.* 55: 999-1009. doi: 10.1002/mnfr.201000547
29. Chuang LS, Ian HI Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. (1997) Human DNA-(cytosine-5)-methyl-transferase-PCNA complex as a target for p21 WAF1. *Science.* 277: 1996-2000.
30. Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka, H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T. (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells.* 7: 997-1007.
31. Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, Araujo FD, Szyf M. (2000) Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene. *Gene.* 242: 407-418.
32. Iwase H, Omoto Y, Iwata H, Toyama T, Hara Y, Ando Y, Ito Y, Fujii Y, Kobayashi S. (1999) DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancers. *Br J Cancer.* 80: 1982-1986.
33. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: 1-10.
34. Lefebvre B, Brand C, Flajollet S, Lefebvre P. (2006) Down-regulation of the tumour suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3- kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol.* 20: 2109-2121. doi: 10.1210/me.2005-0321.
35. Strickland LB, Dawson PJ, Santner SJ, Miller FR. (2000) Progression of premalignant MCF10AT generates heterogeneous malignant variants with characteristic histologic types and immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat.* 64: 235-240.
36. Kala R, Tollefsbol TO. (2016) A Novel Combinatorial Epigenetic Therapy Using Resveratrol and Pterostilbene for Restoring Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) Expression in ER $\alpha$ -Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 11: e0155057. doi: 10.1371/journal.pone.0155057
37. Xie Q, Bai Q, Zou LY, Zhang QY, Zhou Y, Chang H, Yi L, Zhu JD, Mi MT. (2014) Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 53, 422-431. doi: 10.1002/gcc.22154.

Katarzyna Lubecka