

**dr Aneta Balcerczyk**

# **AUTOREFERAT**

**Katedra Biofizyki Molekularnej**

**Instytut Biofizyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**

**Uniwersytet Łódzki**

Łódź, grudzień 2017

### 1. Imię i nazwisko

Aneta Balcerczyk

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 23.09.2005** stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biofizyki nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 25 października 2005; Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka wybranych źródeł reaktywnych form tlenu i elementów bariery antyoksydacyjnej komórek śródbłónka” – Promotor: Prof. dr hab. Mirosław Soszyński; Rozprawa wyróżniona nagrodą Rektora UŁ
- 26.06.2001** dyplom ukończenia stacjonarnych 5-letnich studiów wyższych (magisterskich) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego; tytuł magistra biologii w zakresie biofizyki; Tytuł pracy magisterskiej: „Rola białka MRP1 w indukowaniu oporności na stres oksydacyjny” – Promotor: Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.08.2011 – do obecnie** adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze Biofizyki Molekularnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego
- 01.10.2008 – 31.07.2011** Senior Research Officer in Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Baker IDI Heart&Diabetes Research Institute, Melbourne, Australia (01.01.2010 – 31.07.2011 – pracownik naukowy Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Baker IDI Heart&Diabetes Research Institute; 01.10.2008 – 31.12.2009 – pobyt w jednostce badawczej ramach stypendium programu “Kolumb” Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej)
- 01.11.2005 – 30.09.2008** adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze Biofizyki Molekularnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego
- 01.10.2005 – 31.10.2005** asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Biofizyki Molekularnej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego

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. nr 65, poz. 595, ze zm.):

(4a) Tytuł osiągnięcia naukowego

**Potranslacyjne modyfikacje białek histonowych w regulacji metabolizmu  
komórek śródbłonna naczyniowego**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 9 publikacji z lat 2010-2016, których sumaryczny IF (wg roku publikacji) wynosi **73,004**, a liczba punktów MNiSzW wynosi **360**. Wskazany cykl publikacji był cytowany łącznie **343** razy.

Oświadczenia współautorów publikacji zawiera [Załącznik 4](#).

(4b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania)

**Prace badawcze:**

**4b1.** Balcerczyk A, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, El-Osta A. (2016) „Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells” *Biochem Pharmacol* 121:18-32.

IF = 4,581; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 0

*Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na opracowaniu jej koncepcji, wyborze metodyki badań, wykonaniu większości oznaczeń (analizie proliferacji HMEC-1, migracji, tworzenia struktur kapilarnych na podłożu Matrigel™, badaniu uwalniania cytokin/chemokin regulujących proces angiogenezy) i asystowaniu przy analizach immunocytofluorescencyjnych (przygotowywaniu komórek do inkubacji z wybranymi przeciwciałami), analizie i opracowywaniu wyników badań, sformułowaniu wniosków, przygotowywaniu pracy do druku i dyskusji z uwagami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**4b2.** Okabe J, Fernandez A, Ziemann M, Keating S, Balcerczyk A, El-Osta A. (2014) "Endothelial transcriptome in response to pharmacological methyltransferase inhibition" *ChemMedChem* 9 (8):1755-62.

IF = 2,968; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 4

*Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na: (i) opracowywaniu koncepcji pracy dotyczącej wpływu farmakologicznej inhibicji metylotransferaz lizynowych i argininowych na metabolizm komórek śródbłonna naczyniowego, (ii) planowaniu i wykonaniu doświadczeń z udziałem AMI-1 i AMI-5 (hodowla komórek; przygotowywanie próbek RNA do sekwencjonowania – izolacja RNA, przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS; przygotowanie próbek cDNA do potwierdzenia wyników z RNAseq, analiza poziomu metylacji H3K4, H3K9 w HMEC-1 poddanych działaniu inhibitorów AMI-1 i AMI-5 techniką Western blotting, poprzedzoną kwasową izolacją frakcji białek histonowych), (iii) przygotowywaniu stabilnych knockout'ów Set7 (HMEC-1 Set7KD), (iv) interpretacji otrzymanych wyników badań z panelu biochemicznego i po analizie bioinformatycznej*

wykonanej przez bioinformatyków, (v) uczestniczeniu w przygotowywaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

**4b3.** Rafahi H, **Balcerczyk A**, Lunke L, Kaspi A, Ziemann M, Harikrishnan KN, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du X-J, Chang L, Haviv I, Karagiannis TC, El-Osta A. (2014) "Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition" *Genome Research* 24(8):1271-842014.

IF = 14,630; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 27

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na (i) uczestniczeniu w opracowywaniu koncepcji pracy, (ii) planowaniu i wykonywaniu doświadczeń (hodowla komórkowa; sprawdzanie profilu acetylacji/metylacji białek histonowych poddanych działaniu inhibitorów deacetylaz histonów - TSA i SAHA; przygotowaniu próbek RNA i ChIP do sekwencjonowania NGS (RNAseq, ChIPseq); przygotowaniu próbek cDNA do zweryfikowania danych z RNAseq); scharakteryzowaniu profilu przeciwapalnego HMEC-1 pod wpływem farmakologicznej inhibicji HDACs; (iii) obróbce i interpretacji otrzymanych wyników badań, (iv) uczestniczeniu w interpretacji wyników po analizie bioinformatycznej oraz (v) uczestniczeniu w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

**4b4.** Pirola L\*, **Balcerczyk A\***, Tothill R, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, Karagiannis TC, Ziemann M, Tonna S, Kowalczyk A, Beresford-Smith B, Macintyre G, Kelong M, Hongyu Z, Jinfeng S, Zhu J, El-Osta A. (2011) "Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated histone acetylation and DNA methylation signatures of primary vascular cells" *Genome Research* 21:1601-1615. (\*równocenny udział w powstawaniu pracy)

IF = 13,608; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 87

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na (i) uczestniczeniu w opracowywaniu koncepcji pracy, (ii) planowaniu i wykonywaniu doświadczeń (hodowla komórkowa; izolacja RNA i przygotowywanie próbek do analiz na mikromacierzach ekspresyjnych; przygotowywanie próbek ChIP do sekwencjonowania; potwierdzeniu wyników z sekwencjonowania NGS (dla wybranych genów) metodą Real-Time PCR), (iii) obróbce i interpretacji wyników badań, oraz (iv) uczestniczeniu w przygotowaniu manuskryptu, a także (v) odpowiadaniu na uwagi recenzentów (przygotowanie próbek DNA do analizy profilu metylacji metodą sekwencjonowania NGS (hodowla bakteryjna, konwersja z wodorosiarczynem sodu). Mój udział procentowy szacuję na 30%.

**4b5.** Okabe J, Orłowski C, **Balcerczyk A**, Tikellis C, Thomas MC, Cooper M, El-Osta A. (2012) "Distinguishing Hyperglycemic Changes by Set7 in Vascular Endothelial Cells" *Circ Res* 110:1067-1076.

IF = 11,861; pkt. MNiSW = 50; Liczba cytowań = 63

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na (i) planowaniu i wykonywaniu doświadczeń polegających na wykazaniu roli metylotransferazy Set7/9 w aktywacji szlaku NFκB (przygotowywaniu stabilnych knockout'ów z wyciszoną ekspresją Set7 (system leniwirusowy) oraz z nadekspresją metylotransferazy (system adenowirusowy); charakterystyce biochemicznej otrzymanych transfektantów – sprawdzanie ekspresji Set7 na poziomie mRNA (Real-Time PCR) i

białka (Western blotting); sprawdzaniu reakcji transfektantów na warunki hiperglikemiczne – analiza ekspresji genów ‘odpowiadających’ na zmiany stężenia glukozy w medium zewnątrzkomórkowym), (ii) obróbce i interpretacji wyników badań oraz (iii) uczestniczeniu w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 23%.

**4b6.** Keating ST, Ziemann M, Okabe J, Khan AW, **Balcerczyk A**, El-Osta A. (2014) “Deep sequencing reveals novel Set7 networks” *CMLS* 71(22):4471-86.

IF = 5,808; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 8

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na (i) uczestniczeniu w opracowywaniu koncepcji pracy, (ii) przygotowywaniu komórek z wyciszoną ekspresją Set7 (HMEC-1 Set7KD) i scharakteryzowaniu otrzymanych KDs od strony biochemiczno-molekularnej (analiza ekspresji Set7 na poziomie mRNA i białka, analiza krzywej wzrostu transfektantów/cykladu komórkowego), (iii) opracowywaniu wyników badań i (iv) uczestniczeniu w przygotowaniach pracy do druku. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

#### **Prace przeglądowe:**

**4b7.** Kwa FAA, **Balcerczyk A**, Licciardi P, El-Osta A, Karagiannis TC. (2011) “Chromatin modifying agents – the cutting edge of anti-cancer therapy”. *Drug Discovery Today* 16:543-547.

IF = 6,828; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 19

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na napisaniu wstępnej wersji wprowadzenia do tematyki artykułu oraz rozdziału dotyczącego inhibitorów deacetylaz histonów, a także przygotowaniu schematu związków i uczestniczeniu w ostatecznym redagowaniu pracy i ustosunkowywaniu się do uwag recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

**4b8.** **Balcerczyk A**, Pirola L. (2010) “Therapeutic potential of activators and inhibitors of sirtuins” *Biofactors* 36:383-393.

IF = 2,793; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 32

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na napisaniu rozdziałów 1-5 oraz przygotowaniu schematów, modyfikacji manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

**4b9.** Pirola L, **Balcerczyk A**, Okabe J, El-Osta A. (2010) “Epigenetic links to diabetic complications” *Nature Rev. Endocrinol.* 6:665-675.

IF = 9,971; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 103

Mój wkład w powstanie wyżej wymienionej pracy polegał na napisaniu rozdziałów dotyczących wpływu kontroli poziomu glukozy w przebiegu cukrzycy, opisanie hipotezy kodu histonowego oraz w uczestniczeniu w przygotowywaniu schematów i pracy do złożenia w czasopiśmie. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

#### (4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

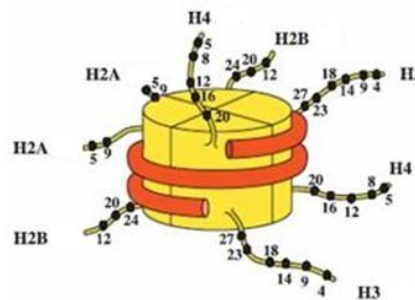
##### **Wprowadzenie do tematyki badań**

Mechanizmy epigenetyczne, odpowiedzialne na „kształt epigenomu”, regulujące zjawisko dziedziczenia pozagenowego, zostały zrozumiane całkiem niedawno i nadal są obiektem intensywnych badań. Kamieniem milowym w charakterystyce złożoności modyfikacji epigenetycznych odgrywających kluczową rolę w kontrolowaniu procesu ekspresji genów i dziedziczenia pozagenowego, było rozpoczęcie badań z zaangażowaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania NGS (ang. *genome-wide Next Generation Sequencing*). Niemniej jednak szereg aspektów funkcjonowania epigenomu, pozwalających na lepsze zrozumienie wpływu środowiska na organizm człowieka, procesu starzenia, czy niekontrolowanej ekspresji genów występującej w wielu stanach chorobowych, pozostaje ciągle niewyjaśnionych lub poznanych jedynie fragmentarycznie.

##### **Potranslacyjne modyfikacje histonów rdzeniowych**

Potranslacyjne modyfikacje białek histonowych, obok metylacji DNA oraz działalności niekodujących RNA, ncRNA (ang. *non-coding RNA*), stanowią jeden z mechanizmów epigenetycznych regulujących procesy reorganizacji struktury chromatyny.

Polegają one na przyłączeniu do histonów określonych grup chemicznych i dotyczą ogona aminokwasowego (Rys. 1), fragmentu białka bezpośrednio nie zaangażowanego w strukturę nukleosomu - podstawowej jednostki strukturalnej chromatyny [Dawson i Kouzarides 2012; Feinberg 2007].



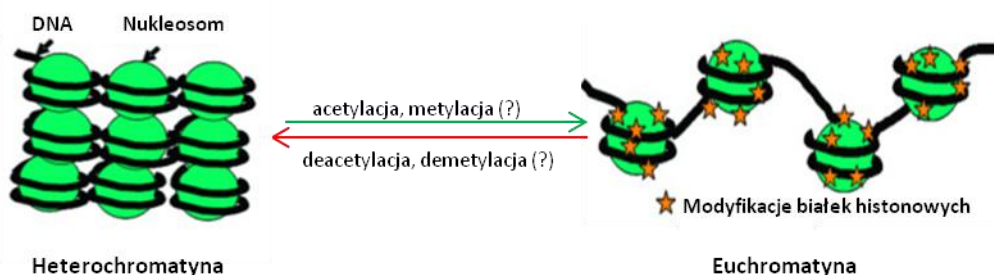
Rys. 1. Schemat budowy rdzenia nukleosomu uwzględniający lokalizację wybranych aminokwasów ulegających modyfikacjom potranslacyjnym [Dawson i Kouzarides 2012].

Wybrane reszty aminokwasowe ogonów białek histonowych mogą ulegać m.in. acetylacji, metylacji, fosforylacji oraz innym procesom wyszczególnionym w Tabeli 1. Modyfikacje te mają istotne znaczenie dla struktury chromatyny i powodują jej reorganizację, zarówno (i) bezpośrednio - wpływając na interakcje: histony-DNA, histon-histon, nukleosom-nukleosom, jak również (ii) pośrednio – poprzez ich działanie informacyjne - zaistnienie jednej modyfikacji może warunkować kolejną, jak również inicjować przyłączanie się do zmodyfikowanych histonów innych białek posiadających potencjał do dalszego modyfikowania chromatyny. Dzieje się tak np. w przypadku trimetylacji lizyny 9 czy 27 histonu 3 (H3K9me3, H3K27me3). Do tak zmodyfikowanych lizyn chętnie przyłączają się białka posiadające w swej strukturze chromodomenę, takie jak HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*), powodując lokalną kondensację chromatyny w danym obszarze. Z kolei reszty aminokwasowe ogonów histonowych, które uległy acetylacji, są preferencyjnie rozpoznawane przez białka zawierające bromodomenę, np. kompleks białkowy SWI/SNF (ang. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), dokonujący rearanżacji nukleosomów. Lokalne zmiany poziomu kondensacji chromatyny wpływają na dostęp czynników transkrypcyjnych do DNA, a w konsekwencji na ekspresję genów i procesy metaboliczne [Feinberg 2007; Handy i wsp. 2011; Liu i wsp. 2015; Wierzbicki 2004; Zhang i wsp. 2015].

Tabela 1. Modyfikacje potranslacyjne białek histonowych i ich potencjalne znaczenie dla metabolizmu komórki [Bannister i Kouzarides 2011; Bowman i Poirier 2015; Portela i Estlller 2010; Ren i wsp. 2011; Zhang i wsp. 2015].

Modyfikacja	Modyfikowana reszta aminokwasowa	Znaczenie biologiczne modyfikacji
Acetylacja (ac)	Lizyna (K)	Aktywacja transkrypcji, replikacja DNA, naprawa DNA, składanie chromatyny
Metylacja (me)	Lizyna (K): me1/me2/me3 Arginina (R): me1/me2s/me2a	Aktywacja/represja transkrypcji
Fosforylacja (p)	Seryna (S) Treonina (T) Tyrozyna (Y)	Aktywacja/represja transkrypcji, kondensacja i segregacja chromosomów, naprawa DNA, mitoza, apoptoza
Ubikwitynacja (ub)	Lizyna (K)	Aktywacja transkrypcji, mejoza
Sumoilacja (su)	Lizyna (K)	Represja transkrypcji
ADP-rybozylacja (ar)	Kwas glutaminowy (E)	Regulacja transkrypcji, relaksacja chromatyny, naprawa DNA, apoptoza
Deiminacja (cit)	Arginina (R)	Regulacja transkrypcji
Krotonylacja (cr)	Lizyna (K)	Regulacja transkrypcji, odpowiedź na uszkodzenia DNA
Biotynylacja (bio)	Lizyna (K)	Regulacja transkrypcji
Izomeryzacja prolin	Prolina (P): trans → cis	Regulacja transkrypcji

Spośród wyżej wymienionych modyfikacji (Tabela 1) największy wpływ na reorganizację chromatyny ma proces acetylacji i metylacji reszt aminokwasowych (lizyn, lizyn/arginin; odpowiednio) wolnych ogonów białek histonowych, (Rys. 2).

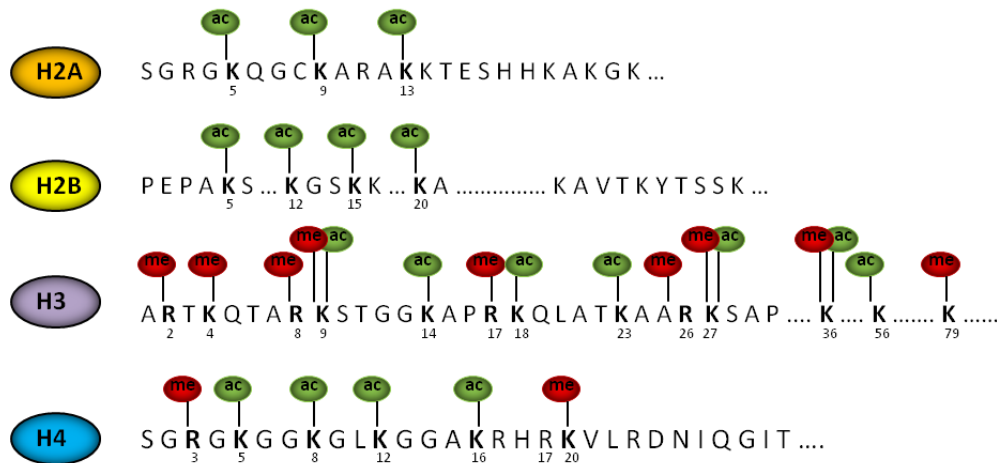


Rys. 2. Wpływ acetylacji i metylacji na konformację chromatyny [Adcock i wsp. 2006].

### Acetylacja histonów

Acetylacja obejmuje swym działaniem wszystkie 4 histony rdzeniowe nukleosomu: H2A, H2B, H3 i H4; (Rys. 3). Proces ten jest katalizowany przez acetylotransferazy histonowe HATs (ang. *histone acetyltransferases*) przenoszące grupę acetylową z acetylokoenzymu A na grupę aminową bocznego łańcucha lizyny. Acetylacja neutralizuje dodatni ładunek lizyny, co powoduje osłabienie oddziaływania DNA – histony i w konsekwencji prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny, ułatwienia dostępu czynników transkrypcyjnych do DNA oraz wielopodjednostkowych kompleksów odpowiedzialnych za reorganizację chromatyny np. SWI/SNF, ISWI, CHD czy Ino80,

i aktywacji transkrypcji [Krasnov i wsp. 2016]. Odłączenie grupy acetylowej (deacetylacja) odbywa się za pośrednictwem deacetylaz histonów HDACs (ang. *histone deacetylases*). Globalnie, deacetylacja białek histonowych, skutkuje zwiększeniem stopnia upakowania chromatyny i korelowana jest z wyciszeniem transkrypcji, (Rys. 2) [Bannister i Kouzarides 2011; Portela i Estlller 2010].



Rys. 3. Miejsca acetylacji i metylacji ogonów aminokwasowych histonów rdzeniowych [Adcock i wsp. 2006; Bannister i Kouzarides 2011].

### **Metylacja histonów: H3 i H4 (H3me, H4me)**

Metylacja białek histonowych polega na przyłączaniu reszt metylowych do lizyny i/lub arginy w procesach katalizowanych przez metylotransferazy lizynowe/argininowe, odpowiednio (ang. *protein lysine methyltransferases (PKMTs)/protein arginine methyltransferases (PRMTs)*). Zasięg metylacji ogranicza się do histonu H3 i H4, (Rys. 3). W odróżnieniu od acetylacji, metylacja może zarówno stymulować jak i hamować proces transkrypcji, w zależności od lokalizacji aminokwasu w łańcuchu oraz liczby przyłączonych grup metylowych (lizyna ulega mono-, di- lub trimetylacji - Kme1/Kme2/Kme3, arginina zaś maksymalnie może być dimetylowana - Rme1/Rme2). Badania genomu techniką NGS poprzez sekwencjonowanie próbek po immunoprecypitacji chromatyny (ChIPseq) wykazały, iż w obrębie miejsc promotorowych genów aktywnych transkrypcyjnie, obserwuje się wzmożoną metylację lizyny 4, 36 i 79, histonu 3 (H3K4me, H3K36me, H3K79me). Modyfikacje wskazanych powyżej lizyn uważa się za markery aktywacji transkrypcji. Natomiast metylację lizyny 9, 27 histonu 3 (H3K9me, H3K27me) oraz lizyny 20 histonu 4 (H4K20me) wskazuje się jako markery wyciszenia transkrypcji – modyfikacje te obserwuje się w regionach promotorowych genów nieaktywnych transkrypcyjnie. Jednakże nie zawsze wzór metylacji histonów można odczytywać jednoznacznie w kwestii aktywacji/wyciszenia transkrypcji. Liczne badania wskazują, iż metylacja w obrębie tej samej lizyny może wiązać się z przeciwnymi działaniami względem ekspresji genów, *Tabela 2*. Podczas gdy trimetylacja lizyn 9 i 27 histonu 3 oraz 20 histonu 4 (H3K9me3, H3K27me3 i K4K20me3) jest związana z represją transkrypcyjną i/lub lokalnym upakowaniem chromatyny (tworzeniem się heterochromatyny) [Bannister i Kouzarides 2011; Barski i wsp. 2007], monometylowanie tych aminokwasów (H3K9me1, H3K27me1 i K4K20me1) stwierdzono głównie w regionach euchromatynowych i związanych z aktywacją genów [Barski i wsp. 2007; Vakoc i wsp. 2006].



Wyjątek od przytoczonych powyżej „wzorców korelacji” zmetylowanych reszt lizyny związanych z aktywacją/wyciszeniem procesu transkrypcji, obserwuje się w genach, które regulują rozwój komórek macierzystych, w których H3K4me3 i H3K27me3 współistnieją jako "domeny dwuwartościowe", utrzymując kluczowe geny odpowiedzialne za różnicowanie w stanach gotowych do późniejszej aktywacji [Meissner i wsp. 2008].

Tabela 2. Charakterystyka struktur chromatyny uwzględniająca lokalizację epigenetycznych markerów aktywacji/wyciszenia transkrypcji, warunkowanych acetylacją i metylacją białek histonowych [Bannister i Kouzarides 2011; Barski i wsp. 2007; Portela i Esteller 2010].

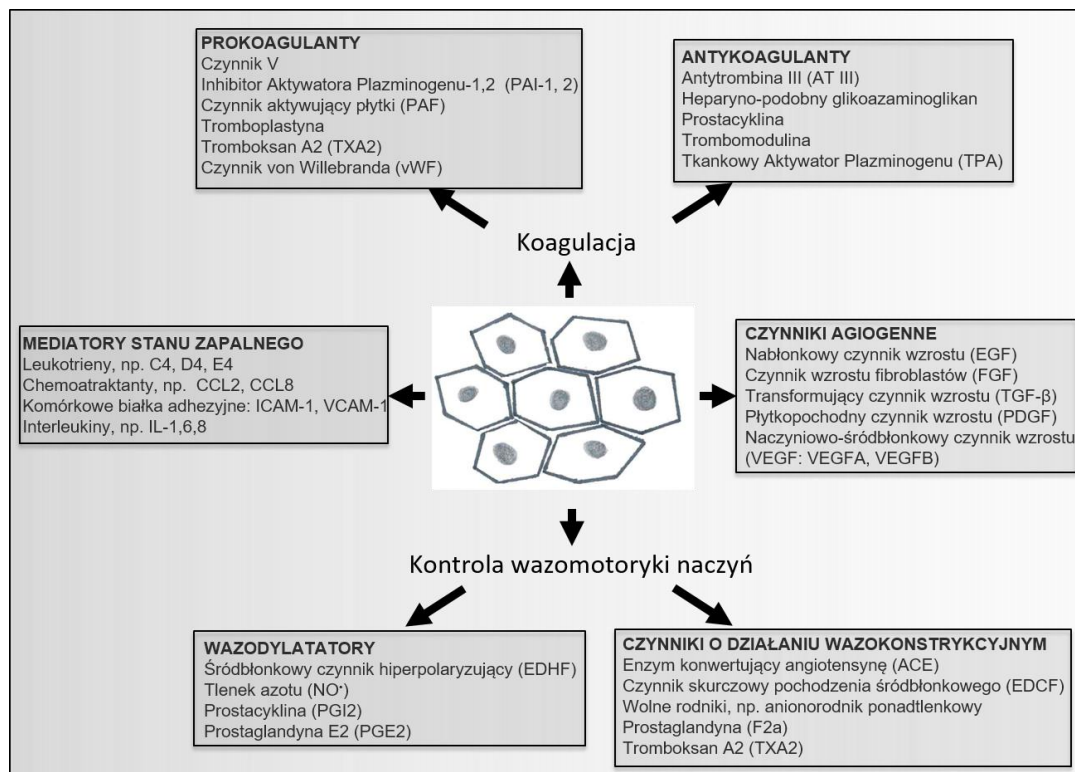
		<b>Euchromatyna</b>	<b>Heterochromatyna</b>
<b>Charakterystyka chromatyny</b>	<b>Struktura</b>	Niski poziom kondensacji, otwarta struktura, zwiększona dostępność czynników transkrypcyjnych do DNA	Wysoki poziom kondensacji, zamknięta struktura, niedostępna dla czynników transkrypcyjnych
	<b>Sekwencja DNA</b>	Bogata w geny aktywne transkrypcyjnie	Bogata w sekwencje niekodujące i sekwencje powtarzalne
	<b>Aktywność</b>	Aktywna transkrypcyjnie	Nigdy nieaktywna transkrypcyjnie (h. konstytutywna) lub warunkowo aktywna transkrypcyjnie w określonych fazach cyklu komórkowego (h. fakultatywna)
<b>Markery epigenetyczne</b>	<b>Acetylacja histonów</b>	Hiperacetylacja histonu 3 i 4 (H3ac, H4ac)	Hipoacetylacja histonu 3 i 4 (H3ac, H4ac)
	<b>Metylacja histonów</b>	H3K4me2, H3K4me3, H3K79me1; w mniejszym stopniu: H3K9me1, H3K27me1, H4K20	H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3

Uzyskiwane dane na temat roli postranslacyjnych modyfikacji histonów w regulacji: konformacji chromatyny > ekspresji genów > metabolizmu, przyczyniły się do postawienia hipotezy kodu histonowego [Lennartsson i Ekwall 2009]. Bez wątplenia modyfikacje histonów sterują różnymi aspektami aktywności wybranych fragmentów genomu, jednak wyodrębnienie uniwersalnego wzoru modyfikacji histonów, który determinowałby określoną aktywność transkrypcyjną genów, wydaje się być bardzo trudne i mało prawdopodobne. Nie umniejsza to jednak znaczenia modyfikacji histonów w epigenetycznej maszynerii kontrolującej metabolizm zarówno z poziomu fizjologicznego jak i licznych stanów patologicznych. Są one bowiem ważnymi markerami funkcji i stanu chromatyny.

### **Epigenetyka a funkcjonowanie śródbłónka naczyniowego**

Jak podają raporty Światowej Organizacji Zdrowia, pierwsze miejsce na liście chorób cywilizacyjnych zajmują schorzenia układu krążenia. Niejednokrotnie u podstaw zaburzeń funkcjonowania układu naczyniowo-sercowego leży dysfunkcja śródbłónka naczyniowego, warstwy komórek o grubości około 0,5-1  $\mu\text{m}$  wyściełające wewnątrz naczyń krwionośnych. Całe lata uważano, iż śródbłonek jest rodzajem biernej bariery pomiędzy krwią a otaczającymi naczynie tkankami [Cines i wsp. 1998]. Obecnie śródbłonek traktuje się jako „rozproszony organ endokrynnny” rozpościerający się na powierzchni około 7  $\text{m}^2$ . Jego zaangażowanie w szereg procesów metabolicznych kluczowych dla funkcjonowania całego organizmu, m.in. angiogenezę, procesy

krzepnięcia krwi i fibrylizy, regulację wazomotoryki naczyń i ciśnienia krwi, reakcje zapalne czy procesy odpornościowe, warunkowane jest mnogością syntezowanych i wydzielanych przez niego czynników aktywnych biologicznie [Rohlenova i wsp. 2017], (Rys. 4).



Rys. 4. Przegląd czynników syntezowanych i wydzielanych przez śródbłonek naczyniowy, warunkujących jego funkcjonowanie [Wojtala, Pirola, Balcerczyk 2016].

Ponad trzy dekady badań w dziedzinie epigenetyki ujawniły szereg mechanizmów regulacji ekspresji genów wynikających z oddziaływań czynników środowiskowych, pozagenowych, na organizm człowieka, w tym również na śródbłonek [Fish i wsp. 2005; Fraineau i wsp. 2015; Park i wsp. 2013]. Wyniki tych badań stanowią cenne źródło wiedzy dla zapobiegania/leczenia wielu chorób układu krążenia, identyfikacji potencjalnych markerów stanów patologicznych, projektowania nowych leków [Man i wsp. 2016; Matouk i Marsden 2008; Wallace i wsp. 2017; Yan i wsp. 2010].

Szacuje się, że w około 50% ekspresja genów jest regulowana przez mikroRNA (miR) [Fraineau i wsp. 2015]. Badania z użyciem mikromacierzy pozwoliły na wyodrębnienie cząsteczek, których ekspresja ulega modyfikacjom w różnego typu stanach patologicznych, np. w cukrzycy – miR-21, miR-27a, miR-27b, miR-126, miR-130a – wpływając m.in. na potencjał angiogeny śródbłonkowych komórek progenitorowych (EPCs) [Meng i wsp. 2012], czy w chorobie wieńcowej – miR-221, miR-222 – modulując odpowiedź dojrzałych komórek progenitorowych (ECFCs) na warunki hipoksji, działanie TGF-β [Chang i wsp. 2014]. Identyfikacja wyszczególnionych mikroRNA rodzi szereg dalszych pytań, chociażby o specyficzność czy możliwości manipulacji ekspresją miRNA w celu usuwania/minimalizowania zmian patologicznych w śródbłonku i skłania do kolejnych analiz.

Badania wpływu metylacji/demetylacji DNA na ekspresję genów warunkujących funkcjonowanie śródbłonka w dużej mierze oscylują wokół śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS). W oparciu o analizę metylacji promotora eNOS stwierdzono, że poza ważną funkcją regulatora napięcia/relaksacji naczyń czy angiogenezy, enzym ten może odgrywać kluczową rolę

w procesach różnicowania komórek. Wykazano, że farmakologiczna inhibicja metylacji DNA skutkuje (i) podwyższeniem ekspresji eNOS w komórkach mięśni gładkich naczyń (VSMCs) [Chen i wsp. 2004; Fish i wsp. 2005], oraz (ii) promuje różnicowanie mysich embrionalnych komórek macierzystych (mESCs) do komórek śródbłonna [Banerjee i Bacanamwo 2010]. Zaangażowanie eNOS w proces różnicowania potwierdzono również w odniesieniu do komórek ludzkich, wykazując że demetylacja eNOS oraz GATA-2, GATA-3 odwracalnie stymuluje różnicowanie ludzkich komórek macierzystych (hESCs) do komórek śródbłonna [Lagarkova i wsp. 2008, Lagarkova i wsp. 2010]. Metylacja DNA jak i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych są szczególnie intensywnie analizowane z uwagi na ich zaangażowanie w pamięć metaboliczną [Brasacchio i wsp. 2009; Mishra i wsp. 2016]. Oba wymienione powyżej typy modyfikacji epigenetycznych mogą z czasem stać się nieodwracalne, co tłumaczy długotrwałe szkodliwe działanie pamięci metabolicznej, m.in. powikłania naczyniowe w cukrzycy typu 2 (T2DM, ang. *type 2 diabetes mellitus*) nawet po poprawie kontroli glikemii [Prattichizzo i wsp. 2015; Reddy i Natarajan, 2013].

Badania skupiające się na maszynarii epigenetycznej odpowiedzialnej za potranslacyjne modyfikacje białek histonowych pokazują jej olbrzymi wkład w regulację metabolizmu komórek śródbłonna naczyniowego. W samych modyfikacjach wolnych ogonów aminokwasowych białek histonowych upatruje się swego rodzaju uniwersalnego kodu zawiadującego procesami transkrypcji. Analizy prowadzone z zastosowaniem inhibitorów m.in. procesu acetylacji/metylacji wykazały zaangażowanie specyficznych enzymów (deacetylaz/metylotransferaz histonów) w regulację kluczowych dla śródbłonna funkcji, determinujących jego udział w: angiogenezie [Balcerczyk i wsp. 2016; Diehl i wsp. 2007; Kaluza i wsp. 2011; Mottet i wsp. 2011], odpowiedzi na bodźce zapalne, [Chen i wsp. 2001; Guarani i wsp. 2011], procesach wazorelaksacji [Rossig i wsp. 2002] czy adhezji [Dreger i wsp. 2012]. Niemniej jednak konieczne są dalsze badania w celu szczegółowego scharakteryzowania potencjału terapeutycznego wybranych elementów maszynarii epigenetycznej, w szczególności dotyczącej potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych.

### **Cele/zadania badawcze**

Problematyka badań prowadzonych przeze mnie w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej dotyczy **analizy wpływu reorganizacji chromatyny warunkowanej acetylacją/metylacją reszt aminokwasowych ogonów histonowych na wybrane funkcje komórek śródbłonna naczyniowego**. Podjęte działania badawcze polegały na:

- (i) określeniu roli metylotransferaz lizynowych i arginiowych w funkcjonowaniu komórek śródbłonna,
- (ii) scharakteryzowaniu transkrypcyjno-biochemicznego profilu śródbłonna naczyniowego w konsekwencji farmakologicznej inhibicji deacetylaz histonów,
- (iii) zdefiniowaniu odpowiedzi acetylomu śródbłonna naczyniowego na warunki hiperglikemiczne.

### **Materiał badawczy**

Materiał do badań stanowiły komórki śródbłonna naczyniowego: (i) pierwotne, izolowane z żyły pępowinowej HUVECs (ang. *human umbilical vein endothelial cells*); (ii) pierwotne, z aorty HAECs (ang. *human aortic endothelial cells*); (iii) uniesmiertelnione, linia komórkowa śródbłonna mikronaczyniowego, HMEC-1 (ang. *human microvascular endothelial cells*) oraz myszy szczepu C57BL/6.

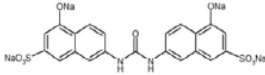
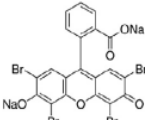
### **Wyniki**

#### **I. Rola metylotransferaz lizynowych i arginiowych w funkcjonowaniu komórek śródbłonna, ze szczególnym uwzględnieniem procesu angiogenezy**

- 4b1. **Balcerczyk A**, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, El-Osta A. (2016) „Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells” *Biochem Pharmacol* 121:18-32.
- 4b2. Okabe J, Fernandez A, Ziemann M, Keating S, **Balcerczyk A**, El-Osta A. (2014) "Endothelial transcriptome in response to pharmacological methyltransferase inhibition" *ChemMedChem* 9 (8):1755-62.
- 4b7. Kwa FAA, **Balcerczyk A**, Licciardi P, El-Osta A, Karagiannis TC. (2011) "Chromatin modifying agents – the cutting edge of anti-cancer therapy". *Drug Discovery Today* 16:543-547.

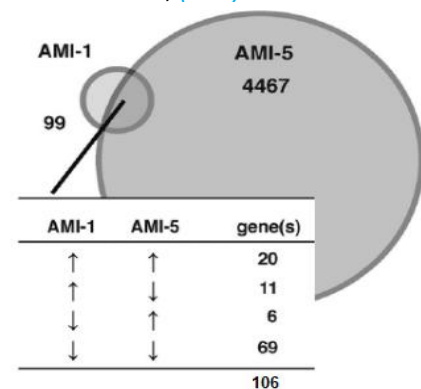
Pierwsze doniesienia dotyczące metylacji histonów i znaczenia  $\epsilon$ -N-metylacji lizyny pojawiły się w roku 1964. Od tego czasu, postęp wiedzy w zakresie biologii chromatyny dokonuje się poprzez charakterystykę poszczególnych metylotransferaz (ang. *MTases*) odpowiedzialnych za metylację wybranych lizyn/arginin, wiążąc je z regulacją procesu transkrypcji, a ostatnio przez zastosowanie sprawdzonych metod sekwencjonowanie wysokiej przepustowości w odniesieniu do genomu, jaki i proteomu. W prezentowanych badaniach dokonano oceny zaangażowania białkowych metylotransferaz arginiowych i lizynowych (PRMTs i PKMTs) w regulację metabolizmu komórek śródbłonna mikronaczyniowego HMEC-1. Jako narzędzie do badań wykorzystano inhibitory AMI-1 i AMI-5, wykazujące szerokie spektrum specyficzności (AMI-1 hamuje głównie aktywność PRMTs, podczas gdy AMI-5 – zarówno PRMTs, jak i HKMTs), *Tabela 3*. Doniesienia literaturowe charakteryzujące specyficzność zastosowanych inhibitorów zweryfikowano poprzez (i) analizę aktywności metylotransferazy Set7 (*4b2*), oraz (ii) analizę metylacji wybranych reszt aminokwasowych: H3K4me1/me2/me3, H3K9me3, H3K27me3, H3R17me2a – metodą Western blotting, jak i immunocytofluorescencyjnie – H3K4me3, H3K9m3, (*4b2*, *4b1*). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, iż poddanie komórek inkubacji z testowanymi inhibitorami obniża poziom metylacji analizowanych reszt lizynowych i reszty argininowej, jak również hamuje aktywność Set7 PKMT (AMI-5, ale nie AMI-1).

Tabela 3. Podsumowanie biochemicznych właściwości AMI-1 i AMI-5 (4b1).

Inhibitor	AMI-1 (Arginine N-methyltransferase inhibitor-1)	AMI-5 (Arginine and lysine N-methyltransferase inhibitor-5)
IUPAC name and molecular weight (MW)	7,7'-(carbonylbis(azanedyl))bis (4-oxidonaphthalene-2-sulfonate), sodium salt; MW: 592.4	2-(2,4,5,7-Tetrabromo-3-oxido-6-oxoxanthren-9-yl)benzoate disodium salt; MW: 754.9
Chemical formula		
<i>In vitro</i> inhibitory potency on PRMTs (target and IC <sub>50</sub> )	Yeast Type I PRMT Hmt1p, IC <sub>50</sub> = 3.0 μM Human PRMT1, IC <sub>50</sub> = 8.8 μM	Yeast Type I PRMT Hmt1p, IC <sub>50</sub> = 0.78 μM Human PRMT1, IC <sub>50</sub> = 1.4 μM
<i>In vitro</i> inhibitor potency toward lysine methyltransferases	Does not inhibit Suv39H1/2 nor SET7, nor DOT1 at 303 μM	Does not inhibit Suv39H1/2 at 257 μM
Inhibitor potency in a cell culture system	>50 μM (for 50% inhibition in a nuclear receptor reporter gene assay)	Fully inhibits SET7 and DOT1 at 257 μM IC <sub>50</sub> = 50 μM (for >50% inhibition of histone H3 lysine 4 monomethylation in HMEC-1)
Inhibitory mechanism	Independent from competition with the S-adenosyl L-methionine binding site	Competitive inhibitor of S-adenosyl L-methionine binding
Off-target or additional activities	Inhibits HIV-1 reverse transcriptase (IC <sub>50</sub> = 5 μM) Acts as antioxidant molecule, scavenging NADPH-oxidase-derived superoxide	Enables Oct4-induced reprogramming of mouse embryonic fibroblasts

Z poziomu funkcjonalnego stwierdzono, iż zaburzenie profilu metylacji histonów, działaniem AMI-1/AMI-5, powoduje istotne zmiany w konformacji chromatyny, o których wnioskowano w oparciu o wyniki analiz immunofluorescencyjnych. Badano rozmieszczenie (lokalizację) i ilość dwóch izoform białka heterochromatynowego HP-1 (ang. *heterochromatin protein-1*): α i γ. Izoforma HP-1α preferencyjnie znakuje heterochromatynę cetromerową, zaś izoforma HP-1γ wiąże się zarówno z frakcją heterochromatyny jak i euchromatyny w jądrze komórkowym, (4b1). Intensywność fluorescencji komórek wyznakowanych przeciwciałami anti-HP-1α, była znacznie większa pod wpływem inkubacji z inhibitorami (zarówno 200 μM AMI-1, jak i 80 μM AMI-5). Wyniki te sugerują, iż zmiana profilu metylacji białek histonowych, wywołana działaniem inhibitorów, daje sygnał do przemodelowania konformacji chromatyny i większego jej upakowania. Wyniki te korelują z barwieniem komórek analogiem tymidyny, 5-etyniolo-2'-deoksyurydyną (EdU), które wykazało zwiększoną ilość EdU we frakcji heterochromatyny, po inkubacji z AMI-1 i AMI-5, (4b1).

Epigenetyczne przemodelowanie struktury chromatyny, wywołane zaburzeniem aktywności metylotransferaz znalazło swoje odzwierciedlenie na poziomie transkryptomu. Sekwencjonowanie RNA wykonana techniką NGS (RNAseq), wykazało rozległe zmiany w ekspresji szeregu genów, Rys. 5. Zgodnie z przewidywaniami zaobserwowano zdecydowanie większy wpływ na transkryptom HMEC-1 inhibitora AMI-5, hamującego aktywność obu typów metylotransferaz, zarówno lizynowych jak i argininowych, (4b2). Pod wpływem AMI-5 stwierdzono zmiany w ekspresji 4 573 genów. Wśród nich znalazło się 106 genów, których ekspresja była modyfikowanych również przez inhibitor AMI-1. Jednakże kierunek zmian w poziomie ekspresji genów nie zawsze był zbieżny dla obu inhibitorów (Rys. 5).



Rys. 5. Podsumowanie rezultatów sekwencjonowania RNA, (4b2).

Analiza bioinformatyczna pokazała zmiany w poziomie ekspresji szeregu enzymów epigenetycznej maszyny odpowiedzialnej za modyfikowanie statusu metylacji białek, zarówno metylotransferaz jak i demetylaz, które nie były wcześniej wskazywane w literaturze jako cele dla AMI-1 czy AMI-5, Tabela 4. Stwierdzony obraz może być konsekwencją wtórnych efektów wywieranych przez testowane inhibitory i interakcji pomiędzy poszczególnymi elementami maszyny epigenetycznej. Czasem bowiem aktywność jednego enzymu warunkowana jest aktywnością innego, jak to ma miejsce np. w przypadku metylotransferaz Set7, EZH2, G9a.

Tabela 4. Zmiany ekspresji enzymów regulujących poziom metylacji reszt lizynowych i argininowych w komórkach HMEC-1 pod wpływem AMI-1/AMI-5, (4b2).

Gene	ENSG ID <sup>[a]</sup>	AMI-1		AMI-5		Description
		p <sup>[b]</sup>	FC <sup>[c]</sup>	p <sup>[b]</sup>	FC <sup>[c]</sup>	
<b>Arginine methyltransferase</b>						
PRMT1	00000126457.16	0.17	-1.14	7.9 × 10 <sup>-11</sup>	-1.26	Protein arginine N-methyltransferase 1
PRMT2	00000160310.12	0.94	-1.02	0.12	-1.07	Protein arginine N-methyltransferase 2
PRMT3	00000185238.8	0.98	-1.00	0.10	+1.10	Protein arginine N-methyltransferase 3
CARM1	00000142453.7	0.93	-1.02	2.3 × 10 <sup>-3</sup>	-1.13	Coactivator-Associated arginine methyltransferase 1
PRMT5	00000100462.11	0.58	-1.08	7.0 × 10 <sup>-4</sup>	-1.14	Protein arginine N-methyltransferase 5
PRMT6	00000198890.5	0.39	+1.14	0.05	-1.14	Protein arginine N-methyltransferase 6
PRMT7	00000132600.12	0.81	-1.06	2.0 × 10 <sup>-4</sup>	-1.23	Protein arginine N-methyltransferase 7
PRMT10	00000164169.8	0.91	+1.04	0.29	+1.08	Protein arginine N-methyltransferase 10
<b>H3K4 methyltransferase</b>						
SETD7	00000145391.7	0.99	-1.00	0.98	+1.00	SET domain containing 7
MLL3	00000055609.13	0.84	+1.05	0.36	+1.05	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3
MLL4	00000105663.9	0.78	-1.06	8.8 × 10 <sup>-13</sup>	-1.35	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4
MLL1	00000118058.15	0.81	+1.05	0.83	-1.01	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1
SMYD3	00000185420.14	0.85	-1.06	0.14	-1.11	SET and MYND domain-containing 3
SETMAR	00000170364.8	0.94	-1.04	0.02	+1.24	SET domain and mariner transposase fusion
WHSC1L1	00000147548.11	0.91	+1.03	0.19	+1.06	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1
SET1A	00000099381.12	0.82	-1.05	5.6 × 10 <sup>-3</sup>	-1.14	SET domain-containing 1a
SET1B	00000139718.5	0.66	-1.09	0.04	-1.13	SET domain-containing 1b
<b>H3K4 demethylase</b>						
LSD1	00000004487.10	0.90	-1.03	0.46	-1.04	Lysine-specific demethylase 1
LSD2	00000165097.8	0.55	+1.12	0.06	+1.13	Lysine-specific demethylase 2
KDMSA	00000073614.7	0.92	+1.03	0.25	+1.06	Lysine-specific demethylase 5A
KDMSD	00000012817.10	0.91	+1.05	0.73	-1.05	Lysine-specific demethylase 5D
KDMSB	00000117139.11	0.61	+1.08	0.87	+1.01	Lysine-specific demethylase 5B
KDMS5C	00000126012.7	0.87	-1.04	5.7 × 10 <sup>-14</sup>	-1.32	Lysine-specific demethylase 5C

[a] Ensembl gene identifier (ENSG ID); [b] Adjusted P value; [c] FC: fold change.

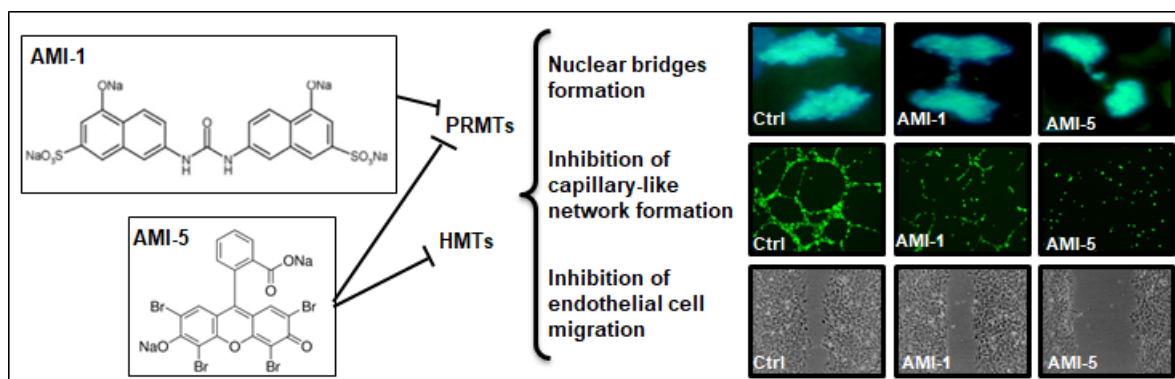
Analiza GSEA (ang. *gene set enrichment analysis*) z wykorzystaniem zdefiniowanych zestawów genów, pozwoliła na wyszczególnienie szlaków sygnałowych potencjalnie modyfikowanych zahamowaniem aktywności metylotransferaz lizynowych i argininowych przez AMI-1/AMI-5. Wśród nich znalazło się szereg procesów warunkujących podstawowe funkcje komórek śródbłonna, w tym angiogenezę (procesy istotne z punktu widzenia angiogenezy/waskulogenezy zaznaczono w Tabeli 5 kolorem czerwonym). Dalsze badania na poziomie biochemicznym potwierdziły wyniki analiz bioinformatycznych RNAseq oraz wpływ AMI-1/AMI-5 na tworzenie struktur kapilarnych *in vitro*, (4b1). Proces angiogenezy jest niezwykle ważny z fizjologicznego punktu widzenia, szczególnie na etapie formowania się układu krwionośnego, ale również ma olbrzymie znaczenie w patologii wielu schorzeń, m.in. chorobach nowotworowych i przerzutowaniu. Umiejętne kontrolowanie zdolności komórek śródbłonna do tworzenia nowych naczyń,

Tabela 5. Lista szlaków sygnałowych potencjalnie modyfikowanych działaniem AMI-1/AMI-5, (4b2).

IL6 Signaling (M14344)
Focal Adhesion (M7253)
Endothelial Biomarkers
Integrin1 Pathway (M18)
ECM Receptor Interaction (M7098)
Microtubule Cytoskeleton Organization (M2216)
IL8CXCR2 Pathway (M210)
E-Cadherin Stabilization Pathway (M232)
Notch Signaling Pathway (M7946)
HDAC Classi Pathway (M101)
Mitochondrial Membrane (M18146)
Collagen Formation (M631)
3'UTR Mediated Translational Regulation (M781)
Methyltransferase Activity (M8291)
AP1 Pathway (M167)
VEGF Signaling Pathway (M1749)
Actin Cytoskeleton (M5272)
GTPase Activator Activity (M701)
WNT Signaling (M5493)
MAPK Pathway (M13863)
Cell Migration (M6281)
P53 Regulation Pathway (M261)
Response To Oxidative Stress (M3223)
Insulin Receptor Signaling Pathway (M18583)
NFkb Pathway (M15285)
Apoptosis (M15303)
Endothelin Pathway (M9)
Vasculature Development (M4002)
Response To Stress (M14874)
Inflammatory Response (M10617)
Angiogenesis (M14493)
TGF Beta Signaling Pathway (M2642)
Cytokine Cytokine Receptor Interaction (M9809)
Cell Cycle Checkpoints (M16647)
Protein Ubiquitination (M584)
PPAR Signaling Pathway (M13088)
ATR Pathway (M46)
Cell Interactions At Vascular Wall (M16312)
Double Strand Break Repair (M15652)
Alanine Aspartate Glutamate Metabolism (M17758)

poprzez modulowanie metylacji kluczowych dla angiogenezy czynników, może w istotny sposób przyczynić się do zwiększenia efektywności leczenia wielu chorób.

Wykorzystując komórki śródbłonka mikronaczyniowego HMEC-1 jako model badawczy, dokonano analizy wszystkich etapów procesu angiogenezy *in vitro*: proliferacji, migracji i zdolności HMEC-1 do tworzenia struktur kapilarnych, w obecności inhibitorów AMI-1/AMI-5, (4b1). Stosując stężenia inhibitorów, które nie powodują zmian w przeżywalności komórek (test redukcji rezazuryny), a wpływają na poziom metylacji wybranych reszt aminokwasowych, stwierdzono istotne zmiany na każdym z analizowanych etapów procesu angiogenezy. Wykorzystując technikę cytometrii przepływowej stwierdzono, że 72 h inkubacja HMEC-1 z 200  $\mu$ M AMI-1/80  $\mu$ M AMI-5 zwiększa subpopulację komórek w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Analizę cyklu komórkowego uzupełniono barwieniem komórek (poddanych uprzednio inkubacji z inhibitorami AMI-1/AMI-5) 5-etynylo-2'-deoksyurydyną (EdU), co umożliwiło monitorowanie przebiegu replikacji DNA w fazie S. Poza typowymi parametrami charakterystycznymi dla fazy S (jednolicie wybarwionym jądrem komórkowym; silnym homogenym znakowaniem - specyficznym dla wczesnej fazy S; heterogennym znakowaniem frakcji heterochromatynowej) stwierdzono także istotne różnice w fakultatywnej frakcji heterochromatyny. Zarówno 24 h jak i 72 h inkubacja komórek z inhibitorami metylotransferaz spowodowały nasilenie procesu agregacji heterochromatyny widoczne w postaci zwiększenia intensywności fluorescencji EdU, jak i jej ilości (wyrażonej jako indeks znakowania). Efekt tworzenia się agregatów był znacznie lepiej widoczny dla wydłużonego czasu inkubacji z testowanymi związkami. Poza zaburzeniem procesu proliferacji komórek śródbłonka, stwierdzono znaczne upośledzenie zdolności migracyjnych HMEC-1 w aspekcie obniżonej aktywności metylotransferaz argininowych (działaniem AMI-1) oraz jednocześnie argininowych i lizynowych (działaniem AMI-5). Test mimikujący *in vitro* uszkodzenie-naprawę naczynia (ang. *wound-healing*) pokazał, że aktywność metylotransferaz jest istotnym czynnikiem regulującym ten proces, Rys. 6. Efekt zahamowania migracji HMEC-1 był stężeniowo-zależny i znacznie lepiej widoczny dla komórek poddanych działaniu AMI-5 (dla najwyższego stężenia AMI-5 (80  $\mu$ M) stwierdzono zahamowanie migracji o około 80% względem kontroli – HMEC-1; a w przypadku komórek pierwotnych HUVEC o około 50% względem kontroli). Analiza tworzenia struktur kapilarnych wykonana na wysokobiałkowym podłożu Matrigel™, pokazała wręcz 100% zahamowanie procesu, w przypadku komórek poddanych inkubacji z 80  $\mu$ M AMI-5 (w ramach kontrolowania żywotności komórek wykonano barwienie roztworem acetoksymetylokalceiny (ang. *calcein AM*)), Rys. 6. Niższe stężenia inhibitorów również znacząco upośledzały zdolności HMEC-1 do tworzenia kapilar, co pokazała nie tylko mikroskopowa, ale i parametryczna analiza wykonana przy użyciu programu ImageJ.



Rys. 6. Konsekwencje farmakologicznego zahamowania aktywności metylotransferaz lizynowych i argininowych działaniem AMI-1/AMI-5 dla komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1.

Angiostatyczny efekt związany z zahamowaniem aktywności metylotransferaz próbowano wyjaśnić na poziomie transkrypcyjnym dokonując analizy poziomu ekspresji szeregu czynników znanych z literatury jako regulatory procesu angiogenezy. Badania te nie dały jednak jednoznacznych wskazówek dla zaproponowania potencjalnego mechanizmu wyjaśniającego zmiany metabolizmu komórek śródbłonna pod wpływem AMI-1/AMI-5. Angiostatycznemu efektowi AMI-1/AMI-5, jakkolwiek interesującemu z punktu widzenia angiogenezy patologicznej, przy wydłużonej inkubacji (72 h) towarzyszyły zmiany w jądrze komórkowym, w postaci zwiększonej ilości mikrojąder oraz tworzenia się mostów nukleoplazmowych (Rys. 6), świadczące o niestabilności chromosomowej i genotoksyczności badanych związków, (4b1).

### Podsumowanie (I)

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej wskazują, że:

- (i) **Aktywność metylotransferaz argininowych/lizynowych jest czynnikiem limitującym proces angiogenezy (*in vitro*) na wszystkich jego etapach: (i) proliferacji, (ii) migracji, (iii) tworzenia struktur kapilarnych.**

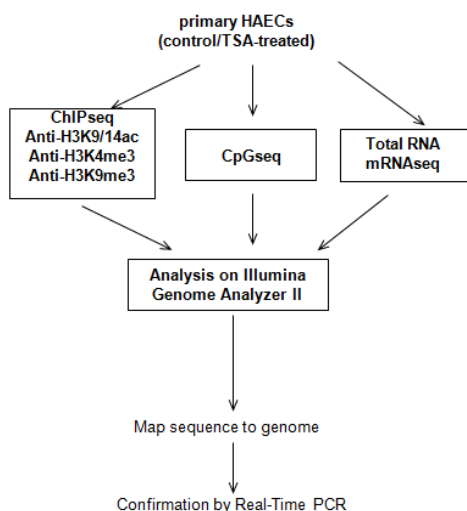
## **II. Analiza profilu funkcjonalnego śródbłonna naczyniowego w konsekwencji farmakologicznej inhibicji deacetylaz histonów**

4b3. Rafehi H, **Balcerczyk A**, Lunke L, Kaspi A, Ziemann M, Harikrishnan KN, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du X-J, Chang L, Haviv I, Karagiannis TC, El-Osta A. (2014) "Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition" *Genome Research* 24(8):1271-842014.

4b7. Kwa FAA, **Balcerczyk A**, Licciardi P, El-Osta A, Karagiannis TC. (2011) "Chromatin modifying agents – the cutting edge of anti-cancer therapy". *Drug Discovery Today* 16:543-547.

4b8. **Balcerczyk A**, Pirola L. (2010) "Therapeutic potential of activators and inhibitors of sirtuins" *Biofactors* 36:383-393.

Funkcjonujący powszechnie paradygmat dotyczący wpływu acetylacji histonów na chromatynę i ekspresję genów głosi, że proces ten powoduje rozluźnienie struktury chromatyny i zintensyfikowanie procesów transkrypcji wymuszone łatwiejszym dostępem czynników transkrypcyjnych do DNA. Zahamowanie aktywności deacetylaz histonów, z założenia powinno generować taki właśnie obraz: globalną acetylację i towarzyszący jej wzrost ekspresji genów.



Rys. 7. Schemat analiz NGS wykonanych w ramach charakterystyki acetyłomu HAECs, modyfikowanego działaniem TSA.

Jednak badania przeprowadzone na komórkach śródbłonna aorty HAECs, (Rys. 7) przy wykorzystaniu wysoko-przepustowego sekwencjonowania nowej generacji (NGS), nie do końca potwierdzają prezentowaną powyżej hipotezę, (4b3). Do analizy acetyłomu komórek śródbłonna aorty wykorzystano tichostatynę A (TSA) oraz SAHA (kwas suberanilohydroksamowy), inhibitory specyficzne względem I i II klasy deacetylaz histonów (HDACs). SAHA, znany również pod nazwą Vorinostat/Zolinaza, jako pierwszy inhibitor HDACs został dopuszczony przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) do wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej, (4b7).

Analiza Western blotting ekstraktu białkowego po kwasowej izolacji, z użyciem przeciwciał m.in. na acetylowaną lizynę 9 i 14 (H3K9/K14ac) pozwoliła na wybór



stężeń inhibitorów, które efektywnie hamowały deacetylazy (500 nM – TSA, 20  $\mu$ M – SAHA). Jednocześnie, w próbkach lizatów poddanych działaniu inhibitorów HDACs, stwierdzono istotny wzrost poziomu metylacji H3K4me3, oraz niewielki H3K9me3 – modyfikacji wskazywanych w literaturze jako markery aktywacji i wyciszenia transkrypcji, odpowiednio. „Wielowątkowe” sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (Rys. 7): RNA (RNAseq), próbek po immunoprecypitacji chromatyny (ChIPseq) oraz DNA (CpGseq) obrazujące zmiany w metylacji DNA, zgromadziło potężną bazę danych pozwalającą na analizę korelacji pomiędzy zmianami w <ekspresji genów > acetylacji/metylacji histonów < metylacji DNA >.

Sekwencjonowanie transkryptomu (RNAseq) pokazało, że zahamowanie aktywności deacetylaz histonów pochodnymi kwasu hydroksamowego, TSA i SAHA, powoduje zmiany w ekspresji około 30% genów (mniej więcej w równym procencie ulegających wzmożonej/obniżonej ekspresji, 14,5% vs 12,6 %, odpowiednio). Analiza poziomu acetylacji (H3K9/K14ac ChIPseq) i metylacji (H3K4 ChIPseq) w obrębie regionów promotorowych genów (analizowano fragmenty +/- 2 500 pz, od miejsca inicjacji transkrypcji) przeprowadzona w odniesieniu do poziomu ekspresji genów testem Fishera wykazała, że obniżona ekspresja genów z większym prawdopodobieństwem związana jest z obniżonym poziomem acetylowanej lizyny 9/14 (H3K9/14ac), jak i trimetylowanej lizyny 4 (H3K4me3) – iloraz szans (OR, ang. odds ratio) dla poszczególnych modyfikacji wynosił 2,47 i 3,41; odpowiednio, *Tabela 6*. Analogiczna analiza przeprowadzona dla genów o podwyższonym poziomie ekspresji pokazała korelację z podwyższonym poziomem acetylowanej lizyny 9/14 oraz trimetylowanej lizyny 4 histonu H3 dla analizowanych fragmentów DNA (OR dla poszczególnych modyfikacji wynosił 4,8 i 6,25; odpowiednio), *Tabela 6*.

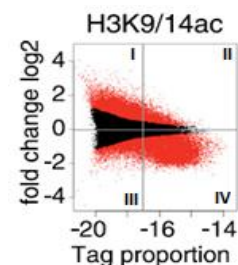
*Tabela 6. Analiza statystyczna obrazująca korelację pomiędzy ekspresją genów a wybranymi modyfikacjami epigenetycznymi (H3K9/K14ac, H3K4me3), indukowanymi działaniem TSA.*

Histone	P-value <sup>a</sup>	Odds ratio <sup>b</sup>	Decreased mRNA expression
↑H3K9/14ac	$4.64 \times 10^{-45}$	0.39	Increased H3K9/14ac less likely to occur in down-regulated genes
↓H3K9/14ac	$9.38 \times 10^{-71}$	2.47	Decreased H3K9/14ac more likely to occur in down-regulated genes
↑H3K4me3	$9.80 \times 10^{-124}$	0.17	Increased H3K4me3 less likely to occur in down-regulated genes
↓H3K4me3	$5.20 \times 10^{-3}$	3.41	Decreased H3K4me3 more likely to occur in down-regulated genes
Histone	P-value <sup>a</sup>	Odds ratio <sup>b</sup>	Increased mRNA expression
↑H3K9/14ac	$1.76 \times 10^{-218}$	4.80	Increased H3K9/14ac more likely to occur in up-regulated genes
↓H3K9/14ac	$3.04 \times 10^{-251}$	0.26	Decreased H3K9/14ac less likely to occur in up-regulated genes
↑H3K4me3	0	6.59	Increased H3K4me3 more likely to occur in up-regulated genes
↓H3K4me3	$3.75 \times 10^{-2}$	0.25	Decreased H3K4me3 less likely to occur in up-regulated genes

<sup>a</sup>Calculated using Fisher's exact test of differentially regulated genes and histone modification.

<sup>b</sup>Odds ratio < 1 indicates an inverse correlation.

Ponadto analiza danych z H3K9/K14ac ChIPseq pokazała, że zwiększoną acetylację histonów obserwowano dla fragmentów DNA (+/- 2 500 pz od miejsca inicjacji transkrypcji), które przez stymulacją komórek TSA, charakteryzowały się niskim poziomem modyfikacji lizyny 9/14 (*kwadrat I*, Rys. 8.). Natomiast fragmenty DNA hiperacetylowane przed zahamowaniem aktywności HDACs, po prezentowały niższy poziom acetylacji (*kwadrat IV*, Rys. 8). Dane te wskazują, iż zahamowanie aktywności deacetylaz histonów przez TSA indukuje nie tylko reakcje acetylacji, ale i deacetylacji reszt lizynowych białek. W próbach wyjaśniania mechanizmu deacetylacji indukowanego zahamowaniem deacetylaz klasy I i II przez TSA, posłukowano się wynikami analiz transkryptomu, które wykazały szereg zmian w ekspresji ko-regulatorów procesu transkrypcji, *Tabela 7*. Na liście enzymów



*Rys. 8. Zmiany poziomu acetylacji w HAECs indukowane działaniem TSA, (4b3).*

maszinerii epigenetycznej, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem TSA, znalazło się szereg deacetylaz jak i acetylotransferaz histonów, m.in. CREBBP i EP300.

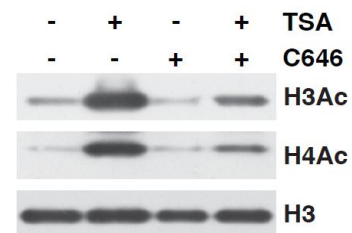
Tabela 7. Zmiany ekspresji ko-regulatorów procesu transkrypcji, (4b3).

Gene	Gene expression changes			Modification at TSS			Name and description
	Accession	Adj. P-value	FC	H3K9/14ac	H3K4me3	CpGm	Description
HDAC5	NM_001015053	$2.03 \times 10^{-17}$	+5.21	↓	↑	nc	Histone deacetylase 5
HDAC3	NM_003883	$6.02 \times 10^{-23}$	+4.96	↓	↑	nc	Histone deacetylase 3
HDAC11	NM_024827	$2.38 \times 10^{-4}$	+2.33	↓	↑	nc	Histone deacetylase 11
HDAC1	NM_004964	$1.59 \times 10^{-6}$	+2.11	↓	↑	nc	Histone deacetylase 1
HDAC7	NM_015401	$1.64 \times 10^{-7}$	-2.58	↓	nc	nc	Histone deacetylase 7
KAT2A	NM_021078	$4.94 \times 10^{-4}$	-0.95	↓	nc	nc	Histone acetyltransferase 2A
KAT2B	NM_003884	$2.29 \times 10^{-2}$	-0.75	↓	nc	nc	Histone acetyltransferase 2B
KAT5	NM_006388	$9.34 \times 10^{-3}$	-2.91	↓	nc	nc	Histone acetyltransferase 5
KAT6B	NM_012330	$7.67 \times 10^{-8}$	-2.91	↓	nc	nc	Histone acetyltransferase 6B
CREBBP	NM_001079846	$5.11 \times 10^{-10}$	-2.99	↓	nc	nc	CREB binding protein
EP300	NM_001429	$1.12 \times 10^{-3}$	-1.68	↓	nc	nc	E1A binding protein p300
NCOA6	NM_014071	$8.83 \times 10^{-7}$	-2.25	↓	nc	nc	Nuclear receptor coactivator 6
NCOA5	NM_020967	$1.93 \times 10^{-7}$	-2.39	↓	nc	nc	Nuclear receptor coactivator 5
NCOA2	NM_006540	$1.82 \times 10^{-5}$	-2.62	↓	nc	nc	Nuclear receptor coactivator 2
SMYD2	NM_020197	$2.69 \times 10^{-11}$	-3.56	↓	nc	nc	SMYD family member 2
SMYD3	NM_001167740	$1.46 \times 10^{-7}$	+2.69	↓	nc	nc	SMYD family member 3
SMYD5	NM_006062	$3.74 \times 10^{-7}$	-2.53	↓	nc	nc	SMYD family member 5
SUV39H1	NM_003173	$5.45 \times 10^{-11}$	-3.81	↓	nc	nc	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
SUV420H1	NM_017635	$6.29 \times 10^{-4}$	-2.27	↓	nc	nc	Suppressor of variegation 4-20 homolog 1
NSD1	NM_172349	$7.43 \times 10^{-16}$	-3.78	↓	nc	nc	Nuclear receptor binding SET domain protein 1
SETD1B	NM_015048	$2.71 \times 10^{-14}$	-4.26	↓	nc	nc	SET domain containing 1B
SETD7	NM_030648	$4.16 \times 10^{-28}$	-6.06	↓	nc	nc	SET domain containing 7

(↑) Increased, (↓) decreased, (nc) no change conferred by TSA stimulation, (FC) fold change, (CpGm) CpG methylation.

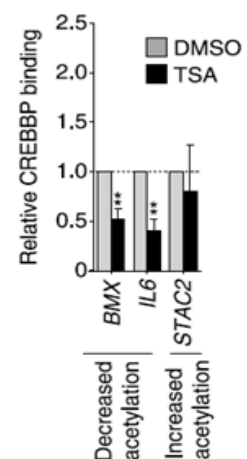
Analiza GSEA ujawniła silne powiązanie acetylotransferazy EP300 z deacetylacją histonów w obrębie regionów promotorowych genów, co zasugerowało, iż deacetylacja histonów i idący za nią spadek ekspresji genów, mogą być związane z obniżeniem wiązania acetylotransferazy do DNA.

Aby zweryfikować bioinformatyczne prognozowanie na temat roli EP300 i CREBBP w procesie deacetylacji histonów indukowanym przez TSA, wykonano eksperyment z użyciem inhibitora kompleksu EP300/CREBBP, C646. Zaangażowanie acetylotransferaz EP300/CREBBP w acetylację lizyn histonów 3 i 4 potwierdzono przez Western blotting, (Rys. 9).



Rys. 9. Wpływ C646 na acetylację H3 i H4 powodowaną obecnością TSA, (4b3).

Analiza Real-Time PCR pozwoliła na wyszczególnienie genów, których ekspresja jest warunkowana aktywnością kompleksu EP300/CREBBP. Zahamowanie aktywności acetylotransferaz działaniem C646 spowodowało obniżenie ekspresji: BMX, PALMD, IL-6, BRG1, NOS3, NEFH, H2AFV, NOX4, natomiast wzrost ekspresji: IL-8, IRS2, STAC2. Immunoprecypitacja chromatyny mająca na celu sprawdzenie ekspresji genów EP300/CREBBP-zależnych w obecności i nieobecności inhibitora deacetylaz histonów, potwierdziła wcześniejsze podejrzenia o zaangażowaniu kompleksu acetylotransferaz w proces deacetylacji indukowany działaniem TSA, Rys. 10. W przypadku genów, które ulegały deacetylacji pod wpływem TSA (BMX, IL-6), stwierdzono obniżone wiązanie CREBBP do DNA, skutkujące obniżeniem ekspresji genów na poziomie mRNA. Natomiast ekspresja STAC2, w obrębie którego zidentyfikowano poprzez H3K9/K14ac ChIPseq wzmożoną acetylację indukowaną działaniem TSA, nie ulegała zmianie, wskazując na brak zmian w wiązaniu CREBBP do DNA pod wpływem TSA, Rys. 10. Analiza bioinformatyczna danych z RNAseq (GSEA) pokazała, że geny których



Rys. 10. Analiza wiązania CREBBP do DNA modyfikowanego działaniem TSA w HAECs, (4b3).

poziom ekspresji jest modyfikowany w największym stopniu związane są z podstawowymi funkcjami śródbłonka naczyniowego: **angiogenezą** i **odpowiedzią komórek na reakcję zapalną**, Tabela 8.

Tabela 8. Ekspresja śródbłonkowo-specyficznych genów modyfikowanych działaniem TSA, (4b3).

Increased gene expression				Modification at TSS			Description
Gene	Accession	Adj. P-value	FC	H3K9/14ac	H3K4me3	CpGm	Endothelial and other cell functions
STC1	NM_003155	$2.59 \times 10^{-135}$	+229.1	↑	↑	nc	Blocks TNF permeability
CRISPLD2	NM_031476	$1.48 \times 10^{-124}$	+222.9	↑	↑	nc	LPS-binding protein regulates endotoxin function
CKB	NM_001823	$8.15 \times 10^{-121}$	+694.6	↑	↑	nc	Required for thrombin receptor signaling
TNFSF9	NM_003811	$3.26 \times 10^{-105}$	+177.3	↑	↑	nc	Cytokine
AQP3	NM_004925	$6.51 \times 10^{-92}$	+98.4	↑	↑	nc	Negative regulator of endothelial differentiation
CELSR2	NM_001408	$1.09 \times 10^{-64}$	+46.2	↑	↑	nc	Cadherin/EGF contact mediated communication
SORT1	NM_002959	$3.16 \times 10^{-61}$	+17.5	nc	↑	nc	Cardiovascular risk locus 1 p13.3
EFNA3	NM_004952	$3.69 \times 10^{-60}$	+41.4	nc	↑	nc	Regulation of angiogenesis and VEGFA signaling
MAPK8IP1	NM_005456	$3.18 \times 10^{-59}$	+36.5	↑	↑	nc	MAPK-pathway, type 2 diabetes candidate
CPA4	NM_001163446	$3.68 \times 10^{-58}$	+18.9	↑	↑	nc	Histone hyperacetylation pathway (transcript variant 2)
DUSP4	NM_004419	$1.77 \times 10^{-56}$	+14.4	↑	↑	nc	TNF induced regulation and MAPK-pathway
CPA4	NM_016352	$3.97 \times 10^{-56}$	+18.3	↑	↑	nc	Histone hyperacetylation pathway (transcript variant 1)
H1FO	NM_005318	$4.15 \times 10^{-55}$	+13.7	nc	↑	nc	Nucleosome structure
BAIAP2	NM_017450	$3.96 \times 10^{-52}$	+28.2	↑	↑	nc	Negative regulator of angiogenesis

Decreased gene expression				Modification at TSS			Description
Gene	Accession	Adj. P-value	FC	H3K9/14ac	H3K4me3	CpGm	Endothelial and other cell functions
PALMD	NM_017734	$1.11 \times 10^{-94}$	-76.1	↓	↓	nc	Membrane dynamics
TNFSF4	NM_003326	$1.98 \times 10^{-87}$	-60.1	↓	↓	nc	Cytokine
CLEC14A	NM_175060	$4.34 \times 10^{-81}$	-32.4	↓	nc	nc	Pro-angiogenic
NRP1	NM_003873	$1.30 \times 10^{-77}$	-24.1	↓	nc	nc	VEGFA-stimulation, endothelial cell migration
NNMT	NM_006169	$1.74 \times 10^{-70}$	-28.4	↓	nc	nc	S-adenosyl methionine, methyl donor
BMX	NM_001721	$3.23 \times 10^{-65}$	-38.9	↓	nc	nc	Transduction of VEGFA (transcript variant 2)
HMGGA2	NM_003483	$9.19 \times 10^{-65}$	-29.0	↓	nc	nc	Angiogenesis
BMX	NM_203281	$1.09 \times 10^{-64}$	-38.3	↓	nc	nc	Transduction of VEGFA (transcript variant 1)
SULT1B1	NM_014465	$2.10 \times 10^{-53}$	-23.9	↓	nc	nc	RORA mediated inflammation
TRIM22	NM_006074	$6.48 \times 10^{-51}$	-19.2	↓	nc	nc	Endothelial cell activation and inflammation
HTR1B	NM_000863	$5.76 \times 10^{-50}$	-21.3	↓	nc	nc	Angiogenesis
IL1RL1	NM_003856	$2.64 \times 10^{-49}$	-12.8	↓	nc	nc	Angiogenesis and vascular permeability
BCL6B	NM_181844	$1.39 \times 10^{-48}$	-13.3	↓	nc	nc	Mediates VEGFR-signaling in angiogenesis
TNFRSF10D	NM_003840	$4.54 \times 10^{-48}$	-10.7	↓	↓	nc	TNF-superfamily member

(↑) Increased, (↓) decreased, (nc) no change conferred by TSA stimulation, (FC) fold change, (CpGm) CpG methylation.

Przeprowadzony panel badań biochemicznych jednoznacznie wskazał, iż zahamowanie aktywności deacetylaz histonów działaniem Trichostatyny A, indukuje przeciwwzapalny profil aktywności komórek śródbłonka HAECs. Stwierdzono: (i) obniżoną adhezję limfocytów U937 do aktywowanych lipopolisacharydem (100 ng/ml LPS) komórek śródbłonka aorty; (ii) zmniejszoną, w obecności inhibitora deacetylaz histonów – 500 nM TSA produkcję reaktywnych form tlenu, zasymulowaną przez aktywację szlaku białkowej kinazy C (PMA, 100 ng/ml, 12h); (iii) silną redukcję uwalnia mediatorów stanu zapalnego, m.in. IL-6, CCL2, IL-25, IL-13, IL-16, IL-27, CXCL-11, CXCL12, przez komórki, które poddano preinkubacji z TSA a następnie inkubacji z LPS, (dot blot) – wyniki te potwierdzono na poziomie mRNA z zastosowaniem TNF- $\alpha$  do jako stymulatora odpowiedzi zapalnej, stwierdzając (iv) obniżenie ekspresji cytokin/chemokin stanu zapalnego (IL-6, IL-8, CCL-2, VCAM-1, CXCL-1) indukowanego TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 6h) przez zastosowanie preinkubacji z 500 nM TSA, (4b3).

### Podsumowanie (II)

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej wskazują, że:

- (i) **Inhibicja HDACs powoduje nadmierną acetylację genomu, ale również indukuje deacetylację histonów, najprawdopodobniej poprzez osłabienie wiązania acetylotransferaz histonów,**

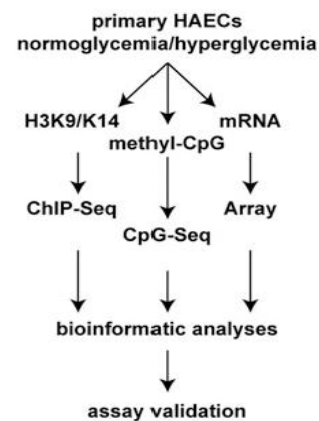
(ii) Zahamowanie aktywności deacetylaz histonów determinuje przeciwzapalny profil komórek śródbłonka naczyniowego.

**III. Acetylacja i metylacja wybranych reszt lizynowych białek histonowych w regulacji odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego aorty (HAECs) na warunki hiperglikemiczne**

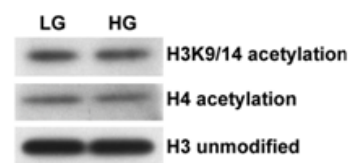
- 4b4. Pirola L\*, **Balcerczyk A\***, Tothill R, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, Karagiannis TC, Ziemann M, Tonna S, Kowalczyk A, Beresford-Smith B, Macintyre G, Kelong M, Hongyu Z, Jinfeng S, Zhu J, El-Osta A. (2011) "Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated histone acetylation and DNA methylation signatures of primary vascular cells" *Genome Research* 21:1601-1615. (\*równocenny udział w powstawaniu pracy)
- 4b5. Okabe J, Orłowski C, **Balcerczyk A**, Tikellis C, Thomas MC, Cooper M, El-Osta A. (2012) "Distinguishing Hyperglycemic Changes by Set7 in Vascular Endothelial Cells" *Circ Res* 110: 1067-1076.
- 4b6. Keating ST, Ziemann M, Okabe J, Khan AW, **Balcerczyk A**, El-Osta A. (2014) "Deep sequencing reveals novel Set7 networks" *CMLS* 71(22):4471-86.
- 4b9. Pirola L, **Balcerczyk A**, Okabe J, El-Osta A. (2010) "Epigenetic links to diabetic complications" *Nature Rev. Endocrinol.* 6: 665-675.

Niewłaściwa dieta oraz przedłużające się stany hiperglikemiczne są jednymi z najważniejszych czynników wskazywanych w etiologii cukrzycy typu 2 oraz związanych z nią mikro- i makro-naczyniowych powikłań, które stanowią główną przyczynę zachorowalności i śmiertelności na choroby układu krążenia. Badania kliniczne prowadzone w latach 90-tych w ramach projektu DCCT (ang. *Diabetes Control and Complications Trial*) i ich kontynuacja w programie EDIC (ang. *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) wykazały, że monitorowanie poziomu cukru zmniejsza ryzyko komplikacji naczyniowych prowadzących do wystąpienia m.in. retinopatii cukrzycowej czy nefropatii. Jednocześnie coraz szersze grono naukowców w oparciu o prowadzone badania zarówno kliniczne jak i podstawowe, podkreśla rolę pamięci metabolicznej i modyfikacji epigenetycznych jako czynników sprawczych dysfunkcji układu krążenia, (4b9).

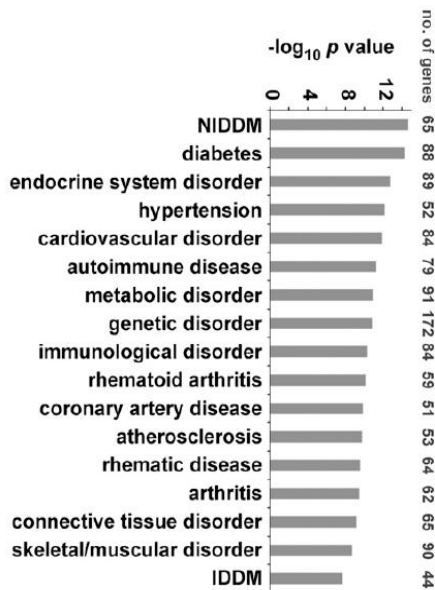
Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej stanowią próbę odpowiedzi na pytania dotyczące roli epigenetycznej maszyny stymulowanej głównie procesami acetylacji i metylacji wybranych reszt lizynowych histonu 3, w odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego na warunki hiperglikemiczne, Rys. 11. Analizowany układ eksperymentalny stanowiły pierwotne komórki śródbłonka naczyniowego aorty (HAECs) poddane 48 h inkubacji z 30 mM glukozą (HG; warunki hiperglikemiczne) lub 5,5 mM glukozą (LG; warunki normoglikemiczne, spełniane przez standardowe medium do hodowli komórek), (4b4). Wskoprzepustowe sekwencjonowanie NGS mające na celu zobrazowanie profilu acetylacji histonu 3 komórek śródbłonka aorty, bazujące na modyfikacji lizyny 9 i 14 (H3K9/K14ac ChIPseq), wykazało iż podwyższone stężenie glukozy powoduje wzrost acetylacji K9/K14 w 5076 regionach i spadek w 4698. Zmian w profilu acetylacji wybranych reszt lizynowych histonów (H3K9/K14ac, H4ac) nie udało się potwierdzić



Rys. 11. Schemat analiz wykonanych w ramach charakterystyki fragmentu epigenomu HAECs, w warunkach hiperglikemicznych, (4b4).



Rys. 12. Poziom acetylacji wybranych lizyn histonu H3 i H4 w warunkach normo- i hiper-glikemicznych, (4b4).



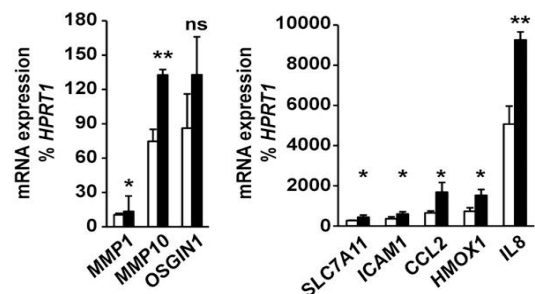
Rys. 13. Klasyfikacja genów ulegających hiper- lub hipo- acetytacji pod wpływem podwyższonego stężenia glukozy (30 mM) w aspekcie stanów patologicznych przebiegających z ich zaangażowaniem. Analizę wykonano przy użyciu oprogramowania Ingenuity Pathway. (NIDDM, IDDM – cukrzyca typu 1, 2; odpowiednio), (4b4).

W przeważającej ilości przypadków wzrost ekspresji skorelowany był z hiperacetylacją H3K9/K14. Największe zmiany zaobserwowano w przypadku: IL-8, HMOX-1, CCL-2, ICAM-1 – genów wskazywanych w literaturze jako zaangażowane w odpowiedź komórki na podwyższone stężenie glukozy, Rys. 14. Sekwencjonownie DNA mające na celu zobrazowanie zmian w metylacji wysp CpG pod wpływem 30 mM glukozy wykazało hipermetylację regionów DNA – 5 000 pz od miejsca inicjacji transkrypcji, jak również pozwoliło na dokonanie analiz porównawczych w temacie: ekspresja genów >>> acetylacja histonów (H3K9/K14ac) >>> metylacja DNA, w odpowiedzi komórek śródbłonna aorty na warunki hiperglikemiczne. Rozmiar modyfikacji indukowanych przez 30 mM glukozę nie był aż tak spektakularny jak w przypadku użycia inhibitorów deacetylaz histonów (TSA, SAHA, 4b3), gdzie zmiany w poziomie analizowanych elementów epigenomu były kilku-, kilkunastokrotne względem kontroli, niemniej jednak uzyskane dane pozwoliły na stwierdzenie, że hiperglikemia „kontroluje” aktywację genów poprzez stymulowanie procesu acetytacji histonów, niezależnie powodując zmiany w poziomie metylacji DNA i obniżenie ekspresji genów (stwierdzono, że powodowane hiperglikemią obniżenie poziomu metylacji genomu jest raczej skorelowane z hipoacetylacją H3K9/K14, zaś geny charakteryzujące się wysokim poziomem acetytacji raczej wykazują odwrotną korelację z poziomem metylacji wysp CpG).

na poziomie białka. Zastosowana do tego celu technika Western blotting okazała się być niewystarczająco czuła, Rys. 12.

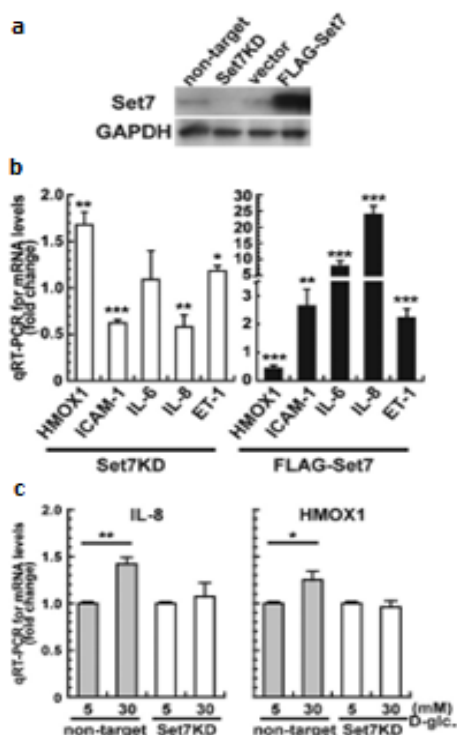
Analiza funkcjonalna genów ulegających hiper-/hipo-acetytacji pod wpływem 30 mM Glc, klasyfikująca modyfikowane geny w zależności od ich zaangażowania w przebieg różnego typu stanów patologicznych, pokazała iż spośród 17 wyszczególnionych zaburzeń, 7 odnosi się do układu krążenia. Na liście znalazły się m.in. cukrzyca (zarówno typu 2 jak i 1), miażdżyca i nadciśnienie, Rys. 13. Geny, ulegające hiperacetytacji w warunkach hiperglikemii (HMOX-1, NQO1, ADRB2, PTPRF, SMAD3, CFLAR, DUSP1), zidentyfikowano w analizie funkcjonalnej pod kątem zaangażowania w sygnaling komórkowy (*Ingenuity Pathway Analysis*) jako związane z regulacją procesu apoptozy i aktywacją szlaku NFκB.

Technika mikromacierzy ekspresyjnych wykorzystana do analizy transkryptomu w warunkach hiperglikemicznych pokazała zmiany w ekspresji 137 genów, z czego 78 ulegało wzmożonej ekspresji, (4b4).



Rys. 14. Poziom ekspresji wybranych genów (Real-Time PCR) w odpowiedzi komórek śródbłonna na warunki hiperglikemiczne (HG – czarne słupki; LG – białe słupki),  $n = 3$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , test t-Studenta, (4b4).

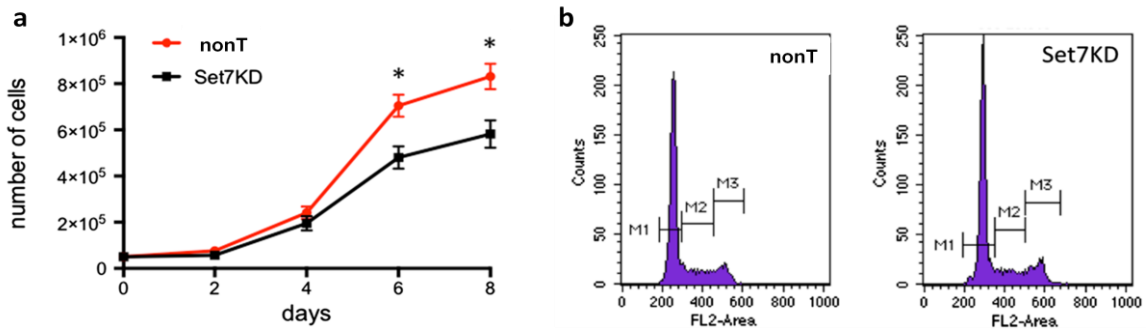
Z poziomu zmian w profilu metylacji, modyfikacje cytozyny w obrębie wysp CpG nie były jedynymi jakie stwierdzono a zainspirowały do kolejnych badań nad rolą metylotransferazy Set7 w odpowiedzi komórek na stres wywołany warunkami hiperglikemicznymi, (4b5). Enzym ten jest odpowiedzialny za monometylację lizyny 4 histonu 3 (H3K4me1), ale również szeregu białek niehistonowych takich jak p53, pRB, czy DNMT1 [Pradhan i wsp. 2009; Esteve i wsp. 2009], (4b9). Stwierdzone zmiany w profilu metylacji DNA pod wpływem podwyższonego stężenia glukozy (4b4), pośrednio zaznaczyły prawdopodobieństwo zaangażowania Set7 w analizowany parametr, z uwagi na wpływ metylotransferazy Set7 na aktywność DNMT1. Ponadto nasze wcześniejsze badania wykazały interakcję Set7 z regionem promotorowym podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NFκB [Brasacchio i wsp. 2009], regulującego odpowiedź komórki na czynniki o charakterze zapalnym, również warunki hiperglikemiczne. Analiza profilu ekspresji komórek HAEC poddanych działaniu 30 mM glukozy, wykonana techniką mikromacierzy, pokazała zmiany w wielu genach potencjalnie kontrolowanych aktywacją p65, m.in. CCL-2, IL-8, czy ICAM-1, (4b4). Dalsze badania skupiające się na określeniu roli metylotransferazy Set7 w odpowiedzi śródbłonna na warunki hiperglikemiczne przeprowadzono wykorzystując komórki z (i) nadekspresją białka (HMEC-1 FLAG-Set7) oraz (ii) transkrypcyjnie wyciszonym enzymem (HMEC-1 Set7KD), Rys. 15a. Analiza ekspresji genów, których liczba kopii uległa zmianie pod wpływem podwyższonego stężenia glukozy (30 mM), pokazała iż aktywność metylotransferazy Set7 jest czynnikiem silnie modulującym ich poziom już w warunkach normoglikemicznych (mRNA, Real-Time PCR), Rys. 15b. W przypadku warunków hiperglikemicznych stwierdzono, że obecność Set7 jest kluczowa dla wywołania reakcji (zmian w ekspresji) IL-8 i HMOX-1, co wykazano na modelu HMEC-1 z wyciszoną ekspresją metylotransferazy, Rys. 15c, (4b5).



Rys. 15. Analiza odpowiedzi komórek śródbłonna mikronaczyniowego HMEC-1 na środowisko hiperglikemiczne (30 mM glukoza, 48 h) w warunkach zmiennej aktywności metylotransferazy Set7: podwyższonej poprzez transfekcję komórek FLAG-Set7i wyciszonej za pomocą specyficznej sekwencji shRNA – Set7KD. (a) Poziom ekspresji metylotransferazy Set7 w komórkach z wyciszoną przez shRNA ekspresją białka - Set7KD oraz z nadekspresją enzymu FLAG-Set7. W obu przypadkach kontrolę stanowiły komórki transfekowane wektorem pozbawionym sekwencji kodującej oznaczone jako: non-target, vector, odpowiednio; (b) Profil ekspresji genów aktywowanych przez podwyższone stężenie glukozy, w komórkach z obniżoną ekspresją Set7 (wykres z lewej strony; Set7KD) oraz w komórkach z nadekspresją Set7 (wykres z prawej strony; FLAG-Set7). Analizę wykonano w warunkach hodowli (normoglikemicznych);  $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,005$ ,  $***p < 0,0001$ , test t-Studenta; (c) Poziom ekspresji genów w odpowiedzi na warunki hiperglikemiczne w komórkach o obniżonej ekspresji metylotransferazy Set7;  $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,005$ , test t-Studenta, (4b5).

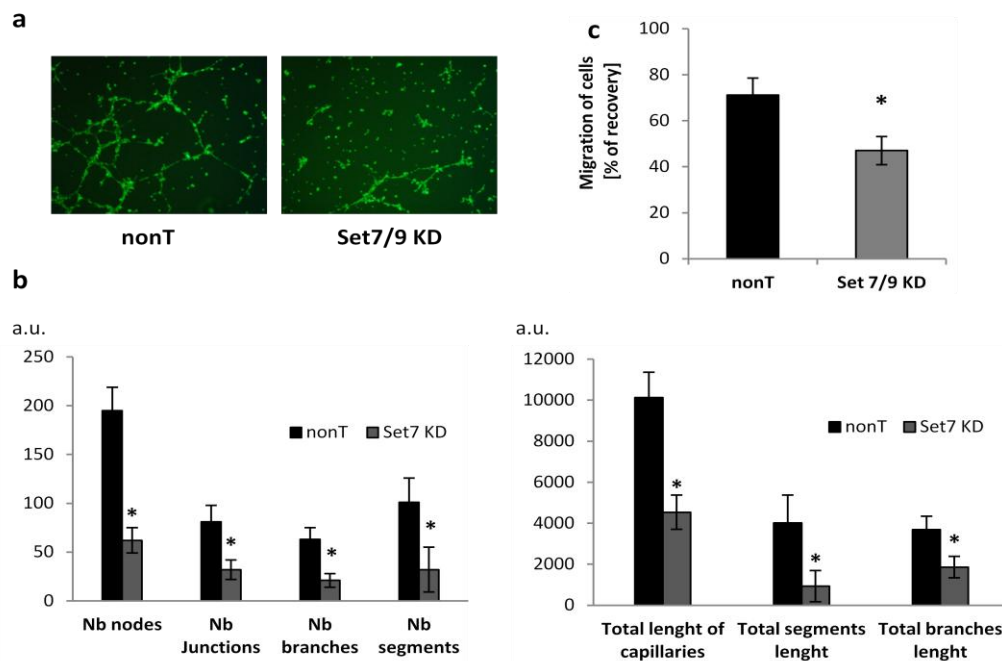
Kontrolowanie ekspresji IL-8 i HMOX-1 przez metylotransferazę Set7 w odpowiedzi komórek śródbłonna naczyniowego na warunki hiperglikemiczne to nie jedyna forma aktywności Set7 jaką stwierdzono w kwestii zaangażowania enzymu w metabolizm HMEC-1. Analiza profilu ekspresji genów komórek po transkrypcyjnym wyciszeniu Set7 (4b6), wykonana przez sekwencjonowanie

mRNA, pokazała globalne podwyższenie ekspresji genów regulujących m.in. procesy adhezji, proteolizy, organizacji cytoszkieletu. Z kolei stwierdzono spadek ekspresji szeregu genów klasyfikowanych do szlaków: odpowiedzi komórek na czynniki prozapalne, czy regulacji cyklu komórkowego, co potwierdzono w panelu badań biochemicznych (Rys. 16), przeprowadzając cytometryczną analizę cyklu komórkowego (Rys. 16b) i wykonując krzywą wzrostu komórek z wyciszoną ekspresją metylotransferazy Set7 (Rys. 16a).



Rys. 16. Wpływ metylotransferazy Set7 na proliferację komórek śródbłonna mikronaczyniowego HMEC-1. Analiza porównawcza: (a) krzywych wzrostu komórek kontrolnych (nonT) i komórek z wyciszoną ekspresją enzymu (Set7KD), (b) histogramów cyklu komórkowego. Analizę statystyczną przeprowadzono dla  $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ , test t-Studenta (4b6).

Transkrypcyjne wyłączenie aktywności Set7 w komórkach HMEC-1 (HMEC-1 Set7KD), poza spowolnieniem proliferacji przygotowanych knockoutów, Rys. 16a, w znaczącym stopniu wpłynęło na proces angiogenezy, co sugerowały wcześniej wykonane analizy transkryptomu, (4b6), a potwierdzają obecnie prowadzone przez mnie badania (Rys. 17), mające na celu zidentyfikowanie mechanizmu odpowiedzialnego za regulację tworzenia struktur kapilarnych, warunkowanego aktywnością metylotransferazy Set7.



Rys. 17. Wpływ wyciszenia ekspresji metylotransferazy Set7 na proces angiogenezy komórek śródbłonna mikronaczyniowego in vitro: (a) tworzenie sieci struktur pseudokapilarnych na podłożu Matrigel™, (b – analiza parametryczna analizowanego procesu w oprogramowaniu ImageJ) oraz (c) migrację komórek. Analizę statystyczną przeprowadzono dla  $n = 3$ ,  $*p < 0,05$ , test t-Studenta (dane niepublikowane).

**Podsumowanie (III)**

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej wskazują, że:

- (i) **Zmiany funkcjonalne zachodzące w śródbłonku pod wpływem warunków hiperglikemicznych (aktywacja profilu prozapalnego) są mediowane przez acetylację histonów, ale wydają się być limitowane aktywnością metylotransferazy Set7,**
- (ii) **Metylotransferaza Set7 jest istotnym regulatorem metabolizmu komórek śródbłonka naczyniowego.**

**Wnioski**

- Analizowane modyfikacje potranslacyjne białek histonowych, acetylacja i metylacja, z uwagi na swój potencjał do modulowania konformacji chromatyny (z poziomu modyfikacji ogonów aminokwasowych białek histonowych), determinujący dostęp czynników transkrypcyjnych do DNA, są niezwykle istotnymi czynnikami regulacji metabolizmu komórkowego.
- Przeprowadzone badania wskazują na potencjał terapeutyczny jaki tkwi w umiejętnym kontrolowaniu wybranych elementów maszynerii epigenetycznej odpowiedzialnej za metylację/acetylację białek histonowych i podkreślają konieczność dalszych analiz.



**Literatura**

- Adcock IM, Ford P, Ito K, Barnes PJ. Epigenetics and airways disease. *Respir. Res.* 7, 21- 40, 2006.
- Balcerczyk A, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, El-Osta A. Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 121:18-32, 2016.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381-395, 2011.
- Banerjee S, Bacanamwo M. DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells. *Exp Cell Res* 316, 172-180, 2010.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 18, 129, 823-837, 2007.
- Bowman GD, Poirier MG. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. *Chem Rev.* 115, 2274-2295, 2015.
- Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerczyk A, George P, Baker EK, Calkin AC, Brownlee M, Cooper ME, El-Osta A. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that co-exist on the lysine tail. *Diabetes* 58: 1229-1236, 2009.
- Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM & Marsden PA. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem* 279, 35087-35100, 2004.
- Chang TY, Huang TS, Wang HW, Chang SJ, Lo HH, Chiu YL, Wang YL, Hsiao CD, Tsai CH, Chan CH, You RI, Wu CH, Tsai TN, Cheng SM, Cheng CC. miRNome traits analysis on endothelial lineage cells discloses biomarker potential circulating microRNAs which affect progenitor activities. *BMC Genomics* 15, 802-814, 2014.
- Chen LF, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293, 1653-1657, 2001.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561, 1998.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* 150, 12-27, 2012.
- Diehl F, Rossig L, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C. The histone methyltransferase MLL is an upstream regulator of endothelial-cell sprout formation. *Blood* 109, 1472-1478, 2007.
- Dreger H, Ludwig A, Weller A, Stangl V, Baumann G, Meiners S, Stangl K. Epigenetic regulation of cell adhesion and communication by enhancer of zeste homolog 2 in human endothelial cells. *Hypertension* 60, 1176-1183, 2012.
- Estève PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranyake M, Horwitz GA, Jacobsen SE, Pradhan S. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5076-5081, 2009.
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics. *Nature* 447, 433-440, 2007.
- Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C & Marsden PA. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem* 280, 24824-24838, 2005.
- Fraigneau S, Palii CG, Allan DS, Brand M. Epigenetic regulation of endothelial-cell-mediated vascular repair. *FEBS J.* 282, 1605-1629, 2015.
- Guarani V, Deflorian G, Franco CA, Kruger M, Phng LK, Bentley K, Toussaint L, Dequiedt F, Mostoslavsky R, Schmidt MH, Zimmermann B, Brandes RP, Mione M, Westphal CH, Braun T, Zeiher AM, Gerhardt H, Dimmeler S, Potente M. Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase. *Nature* 473, 234-238, 2011.
- Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* 123, 2145-2156, 2011.
- Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, Yao TP, Boon RA, Hergenreider E, Tjwa M, Rossig L, Seto E, Augustin HG, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C. Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J* 30, 4142-4156, 2011.
- Krasnov AN, Mazina MY, Nikolenko JV, Vorobyeva NE. On the way of revealing coactivator complexes cross-talk during transcriptional activation. *Cell&Bioscience* 6, 15-29, 2016.
- Lagarkova MA, Volchkov PY, Philonenko ES, Kiselev SL. Efficient differentiation of hESCs into endothelial cells *in vitro* is secured by epigenetic changes. *Cell Cycle* 7, 2929-2935, 2010.

- Lagarkova MA, Shutova MV, Bogomazova AN, Vassina EM, Glazov EA, Zhang P, Rizvanov AA, Chestkov IV I Kiselev SL. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell Cycle* 9, 937-946, 2010.
- Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *BBA* 1790, 863-686, 2009.
- Liu L, Jin G, Zhou X. Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. *Nucleic Acid Res.* 43, 3873-3885, 2015.
- Man HS, Yan MS, Lee JJ, Marsden PA. Epigenetic determinants of cardiovascular gene expression: vascular endothelium. *Epigenomics*. 8, 959-979, 2016.
- Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res.* 102, 873-87, 2008.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766-770, 2008.
- Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1. *J Mol Cell Cardiol* 53,64-72, 2012.
- Mishra M, Kowluru RA. The role of DNA methylation in the metabolic memory phenomenon associated with the continued progression of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57, 5748-5757, 2016.
- Mottet D, Bellahcene A, Pirotte S, Waltregny D, Deroanne C, Lamour V, Lidereau R & Castronovo V. Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res* 101, 1237-1246, 2007.
- Murray K. The Occurrence of  $\epsilon$ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry*, 3 (1), pp 10-15, 1964.
- Park C, Kim TM & Malik AB. Transcriptional regulation of endothelial cell and vascular development. *Circ Res* 112, 1380-1400, 2013.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 28: 1057-1068, 2010.
- Pradhan S, Chin HG, Estève PO, Jacobsen SE. SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics* 4, 383-387, 2009.
- Prattichizzo F, Giuliani A, Ceka A, Rippo MR, Bonfigli AR, Testa R, Procopio AD, Olivieri F. Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clin Epigenetics.* 7, 56-57, 2015.
- Reddy MA, Natarajan R. Role of epigenetic mechanisms in the vascular complications of diabetes. *Subcell Biochem.* 61, 435-454, 2013.
- Ren X, McHale CM, Skibola CF, Smith AH, Smith MT, Zhang L. An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation in Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 111, 11-19, 2011.
- Rohlenova K, Veys K, Miranda-Santos I, De Bock K, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends Cell Biol.* doi: 10.1016/j.tcb.2017.10.010, 2017.
- Rossig L, Li H, Fisslthaler B, Urbich C, Fleming I, Forstermann U, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. *Circ Res* 91, 837-844, 2002.
- Wallace RG, Twomey LC, Custaud MA, Turner J, Moyna N, Cummins PM, Murphy RP. The role of epigenetics in cardiovascular health and aging: a focus on physical activity and nutrition. *Mech Ageing Dev.* 17, 30233-30236, 2017.
- Wierzbicki AT. Dziedziczenie epigenetyczne. *Kosmos* 53, 271-280, 2004
- Wojtala M, Pirola L, Balcerczyk A. Modulation of the vascular endothelium functioning by dietary components, the role of epigenetics. *Biofactors* 43, 5-16, 2017.
- Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol.* 26, 9185-9195, 2006.
- Yan MS, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol* (1985) 109, 916-926, 2010.
- Zhang T, Cooper S, Brockdorff . The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports* 16, 1467-1481, 2015.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### (5a) Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją przygodę z nauką rozpoczęłam na II roku studiów magisterskich, w ramach Studenckiego Koła Naukowego Młodych Biofizyków (1997-2001), skupiając się na badaniu transportu substratów białek ABC: kalceiny, fluoresceiny i jej pochodnych (BCECF, CF) przez błonę erythrocytu. Wyniki tych doświadczeń poszerzone o badania na ssących komórkach z nadekspresją białek ABC ukazały się w *Journal of Membrane Biology*, 2003. Rozpoczęte podczas studiów badania w dziedzinie oporności wielolekowej, będącej jedną z przyczyn niepowodzeń terapii przeciwnowotworowych kontynuowałam w pracy magisterskiej, zgłębiając zaangażowanie białka MRP1 w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym, nieodłącznym elementem tlenowego metabolizmu komórki *FRR*, 2003. Po obronie magisterium podjęłam studia doktoranckie na UŁ w ramach Stacjonarnego Studium Biochemiczno-Biofizycznego. Moja uwaga skupiona była na homeostazie redoks komórek śródbłonki naczyniowej i zjawisku stresu oksydacyjnego w aspekcie działania leków przeciwzapalnych z grupy glukokortykoidów. W 2005 roku, z wyróżnieniem obroniłam rozprawę doktorską. W swojej pracy naukowej zajmowałam się również analizą mechanizmów stresu oksydacyjnego i metodami jego detekcji oraz działania antyoksydantów, wykazując m. in. przydatność sondy DAF-FM do detekcji metabolitów tlenku azotu (*FRBM*, 2005), czy też udział labilnej puli żelaza w utlenieniu 2',7',-DCF w komórkach (*FRR*, 2007).

### Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora:

#### i) artykuły naukowe

1. **Balcerczyk A**, Soszynski M, Bartosz G. (2005) "On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide" *Free Radic. Biol. Med.* 39:327-335.  
IF = 4,971; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 82
2. **Balcerczyk A**, Soszynski M, Rybaczek D, Przygodzki T, Karowicz-Bilinska A, Maszewski J, Bartosz G. (2005) "Induction of apoptosis and modulation of production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyleneiodonium" *Biochem. Pharmacol.* 69:1263-1273.  
IF = 3,617; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 23
3. **Balcerczyk A**, Grzelak A, Soszynski M, Bartosz G. (2004) "Pro-oxidative effects of Tempo in systems containing oxidants" *Redox Report.* 9:153-159.  
IF = 1,724; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 3
4. Łuczak K, **Balcerczyk A**, Soszynski M, Bartosz G. (2004) "Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells *in vitro*" *Cell Biol. Int.* 28: 483-486.  
IF = 1,015; pkt. MNiSW = 15; Liczba cytowań = 49
5. **Balcerczyk A**, Łuczak K, Soszynski M, Bartosz G. (2004) "Prooxidative effects of TEMPO on human erythrocytes" *Cell Biol. Int.* 28:483-486.  
IF = 1,015; pkt. MNiSW = 15; Liczba cytowań = 3

6. Rychlik B, **Balcerczyk A**, Klimczak A, Bartosz G. (2003) "The role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) in transport of fluorescent anions across the human erythrocyte membrane" *J. Membrane Biol.* 193: 89-90.  
IF = 2,200; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 25
7. **Balcerczyk A**, Bartosz G. (2003) "Thiols are Main Determinants of Total Antioxidant Capacity of Cellular Homogenates" *Free Radical Research* 37:537-541.  
IF = 2,740; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 36
8. **Balcerczyk A**, Rychlik B, Kruszewski M, Burchell B, Bartosz G. (2003) "MRP1-transfected cells do not show increased resistance against oxidative stress" *Free Radical Research* 37:189-195.  
IF = 2,740; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 9
9. **Balcerczyk A**, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszałek M, Rychlik B, Soszynski M, Bilinski T, Bartosz G. (2003) "Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity" *Biofactors* 17:75-83.  
IF = 1,850; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 21
10. Grzelak A, **Balcerczyk A**, Mateja A, Bartosz G. (2001) "Hemoglobin can nitrate itself and other proteins" *Biochim Biophys Acta* 1528:97-100.  
IF = 4,663; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 35

#### ii) doniesienia konferencyjne

1. **Balcerczyk A**, Koziol S, Bartosz G. (XXXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin, 19-23 września 2005) – "Specificity of reaction of fluorogenic probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species H<sub>2</sub>DCF and DAF-FM". Prezentacja ustana 11.1.
2. **Balcerczyk A**, Robaszkiewicz A, Pułaski Ł, Soszyński M, Bartosz G. (IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Łódź, 15-17 września 2005) – "Influence of glucocorticoids on the antioxidant defense of endothelial cells". *Folia Histochemica et Cytobiologica* 43 (Suppl. 1), pp. 93.
3. **Balcerczyk A**, Pułaski Ł, Soszyński M, Kieda C, Bartosz G. (15th IUBAP, 15th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier le Corum, Francja, 27 sierpnia – 1 września 2005) – "Profile of expression of peroxiredoxins in human endothelial cells treated with glucocorticoids". *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 6 (34), P-305, pp. 658.
4. **Balcerczyk A**, Rychlik B, Rybaczek D, Soszyński M, Bartosz G. (30<sup>th</sup> FEBS Congress, 9<sup>th</sup> IUBMB Conference, Budapeszt, Węgry, 2-7 lipca 2005) – "Effects of glucocorticoids on proliferation and apoptosis induced by hydrogen peroxide in endothelial cells". *The FEBS Journal* 272 (1), K3-00P, pp. 481.
5. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Bartosz G. (5<sup>th</sup> Parnas Conference – Molecular Mechanism of Cellular Signalling, Kijów, Ukraina, 26-29 kwietnia 2005) – "Specificity of DAF-FM as a probe for nitric oxide".
6. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Bartosz G. (15<sup>th</sup> EARCR Meeting, Murten, Szwajcaria, 21-25 kwietnia 2005) – "Prooxidative effect of ferrocyanide and Tempo on erythrocyte".

7. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Bartosz G. (Free Radical School 2004 "Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology", Spetses, Grecja, 20 sierpnia – 1 września **2004**) – "Effect of transient serum deprivation on proliferation of human endothelial cells".
8. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Rybaczek D, Bartosz G. (XII Conference of Polish Biophysical Society, Wrocław, 15-17 września **2004**) – "Relation between proapoptotic action of diphenyleneiodonium and redox homeostasis of human endothelial cells". *Current Topics Biophysics* 2004, 28 (Suppl A), pp. 17.
9. **Balcerczyk A**, Przygodzki T, Soszyński M, Bartosz G. (Summer Meeting SFRR-Europe "Reactive oxygen species and antioxidants", Łódź, 2-5 lipca **2004**) – "Glucocorticoids do not stimulate human endothelial cells HUVEC-ST to reactive oxygen species production", pp 95.
10. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Przygodzki T, Bartosz G. (29<sup>th</sup> FEBS Congress, Warszawa, 26 czerwca – 1 lipca **2004**) – "Modulation of reactive oxygen and nitrogen species in human endothelial cells by DPI". *The FEBS Journal* 271 (1), 2004, P4.1-42, pp 139.
11. **Balcerczyk A**, Grzelak A, Kozioł S, Rychlik B, Bartosz G. (6<sup>th</sup> Workshop on EPR Applications in Biology and Medicine, Kraków, 5-10 października **2004**) – "Formation of reactive oxygen species in extracellular media".
12. Majak J, Jakubowski W, **Balcerczyk A**, Niedzielski P, Walkowiak B. (Summer School: Biomedical applications of carbon surfaces, Wysowa, 21-25 września **2004**) – "Changes in antioxidative capacity of fibroblast after contact with selected biomaterials", pp. 19.
13. Soszyński M, Klimczak A, Grzelak A, **Balcerczyk A**, Bartosz G. (4th International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, Konstanz, Germany, 27-31 lipca **2004**) – "Peroxynitrite as a hemolytic agent and its possible mechanism of action", pp. 8.
14. **Balcerczyk A**, Soszyński M, Bartosz G. (XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk, 16-20 września **2003**) – "Prooxidative effects of Tempo in reactions with oxidants and glutathione". *Acta Biochimica Polonica* 50 (1), 2003, pp. 46.
15. **Balcerczyk A**, Grzelak A, Bartosz G. (XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław, 18-22 września **2002**) – "Prooksydacyjny wpływ Tempo na erytrocyt".
16. **Balcerczyk A**, Rychlik B, Bartosz G. (XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław, 18-22 września **2002**) – "Białka oporności wielolekowej a stres oksydacyjny".
17. **Balcerczyk A**, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Kozioł S, Marszałek M, Rychlik B, Soszyński M, Bartosz G. (NATO Advanced Workshop "Thiols in the Regulation of Cellular Metabolism", Pisa, Italy, 10-13 kwietnia **2002**) – "Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity".
18. Rychlik B, **Balcerczyk A**, Klimczak A, Bartosz G. (X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Lublin, 2-4 września **1998**) – "Transport fluoresceiny i jej pochodnych przez błonę krwinki czerwonej".

**(5b) Kontynuacja pracy naukowej – po uzyskaniu stopnia doktora**

W roku 2005 i 2006 zostałam laureatką programu 'START' dla Młodych Naukowców, FNP. Po jego zakończeniu skupiłam się nad możliwością odbycia stażu podoktorskiego. Uzyskując 3-miesięczne stypendium z HFSPO, wyjechałam do Baker IDI Heart&Diabetes Institute w Melbourne, do laboratorium Prof. Assam El-Osta, do którego wróciłam na dłuższy pobyt, już jako stypendystka FNP, w ramach programu Kolumb. Mój pobyt na Antypodach trwał łącznie 3 lata. W tym czasie zajmowałam się głównie badaniem mechanizmu epigenetycznej pamięci metabolicznej. Model do badań stanowiły głównie komórki śródbłonka naczyniowego (ECs; ang. endothelial cells) poddane warunkom hiperglikemii, zaś do analiz *in vivo* wykorzystywano – myszy ApoE KO. Dynamikę zjawisk epigenetycznych analizowałam z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w odniesieniu do metylacji DNA i acetylacji lizyn: 9 i 14 histonu 3 (H3K9/K14ac), które to modyfikacje są uznawane za markery aktywacji ekspresji genów. Badania te ujawniły dodatnią korelację pomiędzy ekspresją genów a poziomem acetylacji H3K9/K14 i odwrotny efekt w odniesieniu do poziomu metylacji wysp CpG w warunkach hiperglikemicznych (*Genome Res.*, 2011; *Diabetes*, 2008). Ponadto wykazały, że stymulacja ECs podwyższonym stężeniem glukozy (30 mM vs 5 mM), globalnie, prowadzi do aktywacji ekspresji genów, zaś korelacja pomiędzy zaobserwowanymi zmianami acetylacji H3 i metylacji DNA w obrębie regionów promotorowych genów, może być traktowana jako jedna z przesłanek do stwierdzenia patologii w śródbłonku. Kolejne badania pokazały, że epigenetyczna regulacja odpowiedzi komórek śródbłonka na stres indukowany przez warunki hiperglikemiczne, jest częściowo regulowana przez metylotransferazę Set7 (*Circ. Res.* 2012, *Diabetes* 2008).

Obecnie epigenetyczna regulacja funkcji śródbłonka, warunkowana poziomem metylacji wybranych reszt lizynowych i argininowych białek histonowych, stanowi mój główny nurt badań. Doświadczenie jakie zdobyłam w dziedzinie epigenetyki podczas stażu wykorzystałam ubiegając się o finansowanie projektów badawczych (Opus, Iuventus Plus). Poznanie wpływu metylacji na funkcje śródbłonka może istotnie przyczynić się do identyfikowania dysfunkcji śródbłonka naczyniowego/schorzeń układu naczyniowo-sercowego. Metody jakie wykorzystuję w swojej pracy badawczej obejmują dziedzinę biochemii/biologii molekularnej/epigenetyki: wyciszenie ekspresji genów przy wykorzystaniu shRNA w komórkach pierwotnych jak i immortalizowanych, badanie cytotoksyczności, spektrofotometryczna ocena parametrów homeostazy redoks, analiza ekspresji genów na poziomie mRNA/białka (Real-Time PCR/WB/barwienia immunocytofluorescencyjne), badanie interakcji białko-białko poprzez immunoprecypitację białka (IP) i białko-DNA poprzez immunoprecypitację chromatyny (ChIP), sekwencjonowanie genome-wide (NGS – ChIPseq, RNAseq), w mniejszym stopniu - badanie metylacji DNA w modyfikacji wodorosiarczynem sodu (intensywnie w okresie stażu podoktorskiego).

**Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora:****i) artykuły naukowe**

1. Wojtala M, Macierzyńska-Piotrowska E, Rybaczek D, Pirola L, **Balcerczyk A. (2017)** „Pharmacological and transcriptional inhibition of the histone G9a methyltransferase suppresses proliferation and modulates redox homeostasis in human microvascular endothelial cells” *Pharmacological Research* (doi: 10.1016/j.phrs.2017.10.014.)

IF = 4,482; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 0

2. Papiewska-Pajak I, **Balcerczyk A**, Stec-Martyna E, Koziółkiewicz W, Boncela J. (2017) "Vascular endothelial growth factor-D modulates oxidant-antioxidant balance of human vascular endothelial cells" *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2017 21(6):1139-1149.  
IF = 4,014; pkt. MNiSW = 35; Liczba cytowań = 0
3. Majerczyk J, Grandys M, Duda K, Zakrzewska A, **Balcerczyk A**, Kołodziejski Ł, Szymoniak-Chochół D, Smoleński RT, Bartosz G, Chłopicki S, Żołądź JA. (2017) "Moderate-intensity endurance training preserves endothelial glycocalyx layer in humans" *Experimental Physiology* 102(1):70-85.  
IF = 2,818; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 0
4. Wojtala M, Pirola L, **Balcerczyk A**. (2017) "Modulation of the vascular endothelium functioning by the dietary components, the role of epigenetics" *Biofactors* 2;43(1):5-16.  
IF = 3,236; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 2
5. **Balcerczyk A**, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Okabe J, El-Osta A. (2016) „Pharmacological inhibition of arginine and lysine methyltransferases induces nuclear abnormalities and suppresses angiogenesis in human endothelial cells" *Biochem Pharmacol* 121:18-32.  
IF = 4,581; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 0
6. Majerczak J, Duda K, Chłopicki S, Bartosz G, **Balcerczyk A**, Zakrzewska A, Smoleński RT, Żołądź JA. (2016) „A single bout of strenuous physical exercise does not disturb glycocalyx integrity in young, healthy men" *Physiological Research* 20;65(2):281-91.  
IF = 1,293; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 1
7. Rybaczek D, Musiałek MW, **Balcerczyk A**. (2015) „Caffeine-induced premature chromosome condensation results in the apoptosis-like cell death in root meristems of *Vicia faba*" *PLoS One* 10(11):e0142307.  
IF = 3,234; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 4
8. **Balcerczyk A**, Gajewska A, Macierzyńska-Piotrowska E, Pawelczyk T, Bartosz G, Szemraj J. (2014) „Enhanced antioxidant capacity and anti-ageing biomarkers after diet micronutrient supplementation" *Molecules* 19:14794-14808.  
IF = 2,416; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 8
9. Keating ST, Ziemann M, Okabe J, Khan AW, **Balcerczyk A**, El-Osta A. (2014) "Deep sequencing reveals novel Set7 networks" *CMLS* 71(22):4471-86.  
IF = 5,808; pkt. MNiSW = 40; Liczba cytowań = 8
10. Okabe J, Fernandez A, Ziemann M, Keating S, **Balcerczyk A**, El-Osta A. (2014) "Endothelial transcriptome in response to pharmacological methyltransferase inhibition" *ChemMedChem* 9 (8):1755-62.  
IF = 2,968; pkt. MNiSW = 30; Liczba cytowań = 4
11. Rafahi H, **Balcerczyk A**, Lunke L, Kaspi A, Ziemann M, Harikrishnan KN, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du X-J, Chang L, Haviv I, Karagiannis TC, El-Osta A. (2014) "Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition" *Genome Research* 24(8):84271-842014.

IF = 14,630; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 27

12. **Balcerczyk A**, Bartosz G, Drzewinska J, Piotrowski L, Pulaski L, Stefek M. (2014) "Antioxidant action of SMe1EC2, the low-basicity derivative of the pyridoindole stobadine, in cell free chemical models and at cellular level". *Interdiscip Toxicol.* 7(1):27–32.

IF = 0; pkt. MNiSW = 0; Liczba cytowań = 1

13. Rafahi H, Ververis K, **Balcerczyk A**, Ziemann M, Ooi J, Hu S, Kwa FA, Loveridge SJ, Georgiadis GT, El-Osta A, Karagiannis TC. (2012) "Investigation of the biological properties of Cinnulin PF in the context of diabetes: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis". *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2. doi: 10.3402/pba.v2i0.11905. Epub 2012 Feb 22.

IF = 0; pkt. MNiSW = 0; Liczba cytowań = 5

14. Okabe J, Orłowski C, **Balcerczyk A**, Tikellis C, Thomas MC, Cooper M, El-Osta A. (2012) "Distinguishing Hyperglycemic Changes by Set7 in Vascular Endothelial Cells" *Circ Res* 110:1067-1076.

IF = 11,861; pkt. MNiSW = 50; Liczba cytowań = 63

15. Licciardi PV, Kwa F.A, Ververis K, Di Costanzo N, **Balcerczyk A**, Tang ML, El-Osta A, Karagiannis T. (2012) "Influence of natural and synthetic histone deacetylase inhibitors on chromatin" *Antioxidant Redox Signal.* 15;17(2):340-54

IF = 7,189; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 8

16. Rafahi H, Smith AJ, **Balcerczyk A**, Ziemann M, Ooi J, Loveridge S.J, Baker E.K, El-Osta A, Karagiannis TC. (2011) "Investigation into the biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis" *Genes Nutr* 7:343-55.

IF = 2,507; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 17

17. Pirola L\*, **Balcerczyk A\***, Tothill R, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, Karagiannis TC, Ziemann M, Tonna S, Kowalczyk A, Beresford-Smith B, Macintyre G, Kelong M, Hongyu Z, Jinfeng S, Zhu J, El-Osta A. (2011) "Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated histone acetylation and DNA methylation signatures of primary vascular cells" *Genome Research* 21:1601-1615.

**\*równocenne współautorstwo**

IF = 13,608; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 87

18. Kwa FAA, **Balcerczyk A**, Licciardi P, El-Osta A, Karagiannis TC. (2011) "Chromatin modifying agents – the cutting edge of anti-cancer therapy". *Drug Discovery Today* 16:543-547.

IF = 6,828; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 19

19. Pirola L, **Balcerczyk A**, Okabe J, El-Osta A. (2010) "Epigenetic phenomena links to diabetic complications" *Nature Rev. Endocrinol.* 6:665-675.

IF = 9,971; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 103

20. **Balcerczyk A**, Pirola L. (2010) "Therapeutic potential of activators and inhibitors of sirtuins" *Biofactors* 36:383-393.

IF = 2,793; pkt. MNiSW = 20; Liczba cytowań = 32



21. Taha HM, Skrzypek K, Guevara I, Nigisch A, Mustafa S, Grochot-Przeczek A, Ferdek P, Was H, Kotlinowski J, Kozakowska M, **Balcerczyk A**, Muchova L, Vitek L, Weigel G, Dulak J, Jozkowicz A. **(2010)** "Role of Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells. Lesson From the Promoter Allelic Variants" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1634-1641.  
IF = 7,215; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 46
22. Czerniak-Reczulska M, Niedzielski P, **Balcerczyk A**, Bartosz G, Mitura K. **(2010)** "The effect of sp2/sp3 ratio on endothelial cell compatibility of non-pyrolytic carbon thin films and particles" *J Nanosci Nanotechnol.* 10:1065-71.  
IF = 1,351; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 6
23. Taha HM, Grochot-Przeczek A, Was H, Kotlinowski J, Kozakowska M, Marek A, Lackowska B, **Balcerczyk A**, Mustafa S, Dulak J, Jozkowicz A. **(2009)** "Modulation of inflammatory response by pentoxiphylline is independent of heme oxygenase-1 pathway" *Journal of Physiology and Pharmacology* 60:3-12.  
IF = 1,489; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 6
24. Labieniec M, Milowska K, **Balcerczyk A**, Rucinska A, Sadowska M, Jokiel M, Brichon G, Gabryelak T. **(2009)** "Interactions of free copper (II) ions alone or in complex with iron (III) ions with erythrocytes of marine fish *Dicentrarchus labrax*" *Cell Biol. Int.* 33:941-8.  
IF = 1,800; pkt. MNiSW = 15; Liczba cytowań = 8
25. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, **Balcerczyk A**, George P, Baker EK, Calkin AC, Brownlee M, Cooper ME, El-Osta A. **(2009)** "Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that co-exist on the lysine tail" *Diabetes* 58:1229-1236.  
IF = 8,505; pkt. MNiSW = 45; Liczba cytowań = 254
26. Wiktorowska-Owczarek A, Namiecinska M, **Balcerczyk A**, Nowak JZ. **(2007)** "Human micro- and macrovessel-derived endothelial cells: a comparative study on the effects of adrenaline and a selective adenosine A(2)-type receptor agonist under normoxic and hypoxic conditions" *Pharmacol. Reports* 59:800-806.  
IF = 2,290; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 8
27. Robaszkiewicz A, **Balcerczyk A**, Bartosz G. **(2007)** "Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells" *Cell Biol. Int* 58:1229-1236.  
IF = 1,747; pkt. MNiSW = 15; Liczba cytowań = 122
28. **Balcerczyk A**, Sowa K, Bartosz G. **(2007)** "Metal chelators react also with reactive oxygen and nitrogen species" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 352:522-525.  
IF = 2,749; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 8
29. **Balcerczyk A**, Kruszewski M, Bartosz G. **(2007)** "Does the cellular labile iron pool participate in the oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein?" *Free Radic. Res.* 41:563-570.  
IF = 2,925; pkt. MNiSW = 25; Liczba cytowań = 5

**ii) doniesienia konferencyjne**

1. **Balcerczyk A**, Rybaczek D, Wojtala M, Pirola L, Dąbek A, Okabe J, El-Osta A. „Changes in chromatin structure, limited by pharmacological inhibition of histone methyltransferases, the consequences on angiogenesis process in human endothelial cells”, World Congress on Pharmacology”, October 09-11 **2017**, Tbilisi, Gruzja (**1 miejsce w konkursie prezentacji posterowych – dr Balcerczyk A**).
2. Wojtala M, Bartosz G, **Balcerczyk A**. „Terapeutyczne znaczenie procesu angiogenezy warunkowanej aktywności metylotransferaz histonów” VIII Sesji Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików (VIII SMiD ŁŚCh), 22 czerwca **2017**, Łódź (**wyróżnienie do konkursu prezentacji ustnych – mgr Wojtala M**).
3. Salamon A, Wojtala M, Dąbek A, **Balcerczyk A**. „Farmakologiczna inhibicja lizyno-specyficznej metylotransferazy Set7/9 a proces angiogenezy”, III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, BioOpen, Łódź, 12-14 maj **2017**
4. Wojtala, Sobalska-Kwapis M, Strapagiel D, **Balcerczyk A**. „Konsekwencje transkrypcyjnego wyciszenia lizynospecyficznej demetylazy 1 (LSD-1) na aktywność metaboliczną śródbłonna mikrowaskularnego”, III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, BioOpen, Łódź, 12-14 maj **2017**
5. Dąbek A, Wojtala M, Salamon A, **Balcerczyk A**. „Maślan vs hydroksymaślan, dodatkowa grupa hydroksylowa i wynikające z niej konsekwencje dla modulowania acetyloemu komórek śródbłonna mikrowaskularnego, HMEC-1”, VI Konferencja Biologii Molekularnej Koła Młodych Biofizyków Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 7-9 kwiecień **2017**
6. Salamon A, Wojtala M, Dąbek A, **Balcerczyk A**. „Epigenetyczna regulacja procesu angiogenezy komórek śródbłonna mikrowaskularnego, warunkowana aktywnością metylotransferazy Set7/9”, III Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej "Medycyna Personalizowana - GENOM, CZŁOWIEK, ŚWIAT, ZAGROŻENIA", Lublin 23-25 listopada **2016** (**2 miejsce w konkursie prezentacji posterowych – Salamon A**)
7. Wojtala M, Rybaczek D, **Balcerczyk A**. “The role of lysine specific demethylase 1 in shaping of the inflammatory reaction of endothelial cells”, (2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics - Bio2016 – Expanding beyond the limits”, Wrocław, 13-16 wrzesień **2016**), Acta Biochimica Polonica vol. 63 Supplement 2/2016, pp. 184
8. Ciszewski WM, Macierzyńska-Piotrowska E, Sobierajska K, **Balcerczyk A**, Niewiarowska J. „Validation of endothelial cell senescent model”, European Congress of Oncology Pharmacy, Dubrovnik, Croatia, 19-21 May **2016**
9. Salamon A, Wojtala M, **Balcerczyk A**. „Rola deacetylaz histonów (HDACs) w regulacji procesu nowotworzenia”, II Studencka Konferencja Genetyczna GENOMICA, Kraków, 20-21 maj **2016**
10. Wojtala M, Rybaczek D, Macierzyńska-Piotrowska E, Borkowska K, Gajewska A, **Balcerczyk A**. Rola metylotransferazy G9a w regulacji cyklu komórkowego śródbłonna mikrowaskularnego HMEC-1”, II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, BioOpen, Łódź, 12-14 maj **2016**

11. Ciszewski WM, Macierzyńska-Piotrowska E, Sobierajska K, **Balcerczyk A**, Niewiarowska J. „Validation of endothelial cell senescent model”, II Healthy Ageing Research Centre Conference on Translational Research in Healthy Ageing, Łódź, 11-13 maj **2016**
12. Dąbek A, Wojtala M, **Balcerczyk A**. “Modyfikacje potranslacyjne białek histonowych a funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego” V Konferencja Biologii Molekularnej Koła Młodych Biofizyków Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 7-9 kwiecień **2016**
13. Wojtala M, Borkowska K, Macierzynska-Piotrowska E, Bartosz G, **Balcerczyk A**. “Modulation of the lysine residues methylation status of histone proteins affects inflammatory response of human microvascular endothelial cells” International Cardiovascular Research Meeting, Bydgoszcz, 11-13 maj **2015**
14. Borkowska K, Macierzynska-Piotrowska E, Rybaczek D, Bartosz G, **Balcerczyk A**. “Regulation of HMEC-1 cell cycle progression conditioned by G9a methyltransferase activity” International Cardiovascular Research Meeting, Bydgoszcz, 11-13 maj **2015**
15. Fornalczyk K, Jung M, Bartosz G, **Balcerczyk A**. “The role of lysine-specific demethylase-1 (LSD-1) in the regulation of nitric oxide production of the microvascular endothelial cells” International Cardiovascular Research Meeting, Bydgoszcz, 11-13 maj **2015**
16. **Balcerczyk A**. “Changes in chromatin structure, limited to histone methylation, and its consequences on angiogenesis process regulation” II Ogólnopolskie Sympozjum Interdyscyplinarne Inter-Mix 2014 Wojanów, 20-23 listopada **2014**
17. Rafahi H, **Balcerczyk A**, Lunke L, Kaspi A, Ziemann M, Harikrishnan KN, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du X-J, Chang L, Haviv I, Karagiannis TC, El-Osta A. “Regulation of the inflammatory gene expression by histone acetylation and HDAC inhibition in human aortic endothelial cells” 83rd Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS), Glasgow, SCOTLAND; 22-25 March **2015**; ATHEROSCLEROSIS Volume: 241 Issue: 1 Pages: E6-E6 Meeting Abstract: EAS-0912; 2015
18. Borkowska K, Gajewska A, Macierzyńska-Piotrowska E, Solarska-Ściuk K, Bartosz G, **Balcerczyk A**. “Changes in inflammatory pathway and senescence symptoms of human endothelial cells after BIX-01294 treatment” The SFRR Spetses Summer School “Biochemical Basis of Healthy Ageing”, Spetses, Greece, September 22nd -28th **2014**
19. Borkowska K, Gajewska A, Macierzyńska-Piotrowska E, Solarska-Ściuk K, Bartosz G, **Balcerczyk A**. „Enhanced inflammatory reaction of human endothelial cells after G9a histone methyltransferase inhibition” 49 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa, 9-12 września **2014**
20. **Balcerczyk A**, Rybaczek D, Okabe J, Fornalczyk K, Bartosz G, El-Osta A. „Angiostatic ability of arginine protein and lysine methyltransferase inhibitors” 49 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa, 9-12 września **2014**
21. **Balcerczyk A** „Profil potranslacyjnych modyfikacji histonów a proces starzenia śródbłonna naczyniowego”, Spring Biogerontological Meeting: “Molecular targets of natural and synthetic agents for anticancer and antiaging therapy” 23-24 maja **2014**, Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych, Werynia (prezentacja ustna)
22. Papiewska-Pajak I, **Balcerczyk A**, Słapek M, et al. 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Saint Petersburg, RUSSIA, 06-11 July 2013 - The influence of VEGF-

- D on redox homeostasis of human endothelial cells; (FEBS JOURNAL Volume: 280, SI Supplement 1; 246-246, **2013**
23. Rybaczek D, **Balcerczyk A**, Bartosz G. The Society for Experimental Biology Conference, Valencia, Spain, 3-6 July **2013** - Analysis of cell cycle checkpoint connected proteins, following the replication stress and after premature chromosome condensation induction.
  24. Papiewska-Pająk I, **Balcerczyk A**, Boncela J, Przygodzka P, de la Paz Mena Jaramillo M, Bartosz G, Cierniewski C.S. (22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress, Seville, Spain, 4-9 September **2012**) – „VEGF-D modulates redox homeostasis of human ECs and protects the cells against cytotoxic effect of hydrogen peroxide”; FEBS JOURNAL Volume: 279, Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 222-222
  25. **Balcerczyk A**, Okabe J, Maxwell S, Haviv I, El-Osta A. EMBO Meeting, Barcelona, 4-6 September 2010) – “Role AMI-1 and AMI-5 in regulation of angiogenesis”.
  26. Taha, H. Grochot-Przeczek, A. Was, H. et al. (34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies Location: Prague, CZECH REPUBLIC, 4-9 July 2009) „Modulation of inflammatory response by pentoxifylline is independent of heme oxygenase-1 pathway” FEBS JOURNAL, **2009**; 276: 235-235
  27. Taha H. M, Guevara I, Exner M, Mustafa S, Nigisch M, **Balcerczyk A**, Weigel G, Ferdek P. F, Skrzypek K. S, Dulak J, Jozkowicz A. (Heme oxygenases, 5<sup>th</sup> International Congress, Krakow, Poland 5-9 September **2007**) – “Role of HO-1 promoter polymorphism in endothelial cells”
  28. Bakowicz-Mitura K, **Balcerczyk A**, Bartosz G, Mitura S. (2<sup>nd</sup> International Conference on Surfaces Coatings and Nanostructured Materials”, Alvor, Algarve, Portugal 9-11 July **2007**) – “Effect of nanodiamonds powders on human endothelial cells” pp. 71.
  29. **Balcerczyk A**, Pułaski Ł, Sicińska P, Bartosz G. (France New EU Members 7<sup>th</sup> Meeting New Frontiers in Cardiovascular Research: “Subcellular mechanisms of altered muscle function in cardiovascular diseases”, Debrecen, 5-8 October **2006**) – “Effect of corticoids on redox homeostasis of human endothelium”.
  30. **Balcerczyk A**, Pułaski Ł, Soszyński M, Bartosz G. (41 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 15-19 września **2006**) – “Role of acetylcholinesterase in the physiology of endothelial cells”. Acta Biochimica Polonica 53 (Suppl. 1), P13.2, pp. 171.
  31. Koceva-Chyła A, Przygodzki T, **Balcerczyk A**, Gwoździński K, Józwiak Z. (41 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 15-19 września **2006**) – “Effect of piperidine nitroxides on ROS-production generated by doxorubicin in cardiomyocytes”. Acta Biochimica Polonica 53 (Suppl. 1), P10.58, pp. 127.
  32. Sicińska P, Rychlik B, **Balcerczyk A**, Bartosz G. (41 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 15-19 września **2006**) – “Protective action of antioxidants against allyl alcohol and microcystin-LR toxicity in Hep3B an HaCaT cells”. Acta Biochimica Polonica 53 (Suppl. 1), P10.87, pp. 138.
  33. **Balcerczyk A**, Kruszewski M, Bartosz G. (16<sup>th</sup> International Congress SFRRRI, Davos, 15-19 August **2006**) – “Role of cellular labile iron pool in the oxidation of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate”. Free Radical Research 40 (Suppl. 1), S19-12, pp. S55. Prezentacja ustna

34. Bartosz G, **Balcerczyk A**, Sowa K. (16<sup>th</sup> International Congress SFRRRI, Davos, 15-19 August **2006**) – “Metal chelators are also antioxidants reacting with reactive oxygen species”. Free Radical Research 40 (Suppl. 1), P23-11, pp. S150.
35. Koceva-Chyła A, **Balcerczyk A**, Gwoździński K, Józwiak Z. (16<sup>th</sup> International Congress SFRRRI, Davos, 15-19 August **2006**) – “The piperidine nitroxide antioxidants Tempo, Tempol and Tempace enhance the oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate”. Free Radical Research 40 (Suppl. 1), P8-3, pp. S92

**(5c) Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych**

Współautorka **39** badawczych i przeglądowych prac naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, o łącznym indeksie cytowań **1135** (Web of Science) i indeksie Hirsha = **17**

Współautorka **53** komunikatów zjazdowych prezentowanych na zjazdach i konferencjach w kraju i za granicą

Współautorka rozdziału w książce "Handbook of Nutrition, Diet and Epigenetics" pod redakcją VR Preedy, VB Patel – Rozdział: "Insulin action, insulin resistance and their link to histone acetylation" – **Balcerczyk A**, Chriett S, Pirola L. (2017), doi:10.1007/978-3-319-31143-2\_57-1.

Współautorka repetytorium dla maturzystów i kandydatów na wyższe uczelnie – „Biologia – Wiesz, że umiesz” pod red. B. Rychlik WSiP, Warszawa **2005**

Parametryzacja dorobku naukowego:

Liczba opublikowanych prac	39
Sumaryczny impact factor*	157,923
Punkty MNiSzW	1150
Liczba cytowań (bez autocytowań)	1135 (1005)
Doniesienia konferencyjne	53
Rozdziały w książkach	2
Index Hirscha	17
Impact factor osiągnięcia naukowego*	73,048
Punkty MNiSzW osiągnięcia naukowego	360
Liczba cytowań osiągnięcia naukowego	343

---

\* zgodnie z rokiem publikowania

**(5d) Udział w projektach badawczych****Kierownik projektu -2**

- 2013 – 2016** **kierownik projektu badawczego OPUS NCN 2012/05/B/NZ2/01663** – „Epigenetyczna regulacja procesu angiogenezy indukowana zmianami w obrębie metylacji białek histonowych, jako szansa dla nowych interwencji terapeutycznych w chorobie nowotworowej” – Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
- 2013 – 2016** **kierownik projektu badawczego Iuventus Plus IP2012 039072** – „Rola reorganizacji chromatyny limitowanej statusem metylacji histonów w kontrolowaniu aktywacji komórek śródbłonna naczyniowego” – Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

**Opiekun naukowy -5**

- 2017 – 2019** **opiekun projektu promotorskiego NCN 2016/23/N/NZ3/02435** - „Rola lizynospetycznej demetylasy 1 w regulacji odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna naczyniowego” – kierownik projektu promotorskiego, mgr Martyna Wojtala, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
- 06-12.2017** **opiekun studenckiego grantu badawczego UŁ** – „Wpływ substancji czynnych z owocu grantu *Punica granatum*, na wybrane parametry epigenomu komórek śródbłonna naczyniowego” – kierownik projektu: Varvara Vialichka, Studenckie Koło Naukowe Młodych Biofizyków/Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
- 06-12.2017** **opiekun studenckiego grantu badawczego UŁ** – „Analiza konsekwencji transkrypcyjnego wyciszenia ekspresji metylotransferazy Set7/9 na metabolizm komórek śródbłonna mikrowaskularnego” – kierownik projektu: Katarzyna Słapek, Studenckie Koło Naukowe Młodych Biofizyków/Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
- 06-09.2017** **opiekun studenckiego grantu badawczego UŁ** – „Weryfikacja zdolności  $\beta$ -hydroksymaślanu do modulowania funkcji komórek śródbłonna naczyniowego” – kierownik projektu: Arkadiusz Dąbek, Studenckie Koło Naukowe Młodych Biofizyków/Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki
- 06-12.2017** **opiekun studenckiego grantu badawczego UŁ** – „Rola metylotransferazy Set7/9 w regulowaniu potencjału angiogenego komórek śródbłonna mikrowaskularnego HMEC-1” – kierownik projektu: Anita Salamon, Studenckie Koło Naukowe Młodych Biofizyków/Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

**Wykonawca projektu -3**

- 2016 – 2019** **wykonawca w projekcie badawczym NCN 2015/17/B/NZ7/03019** - „Rola zmian epigenetycznych i p53 w trzewnej tkance tłuszczowej i patogenezie cukrzycy typu 2” – kierownik projektu, prof. dr hab. Janusz Szemraj, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 2008 – 2009** **wykonawca w projekcie badawczym NHMRC** „Epigenetic persistence and hyperglycemic memory of embryonic stem cells” – Principal Investigator -

Prof. Assam El-Osta, Epigenetics in human Health and Disease Laboratory, Baker IDI Heart&Diabetes Research Institute, Melbourne, Australia

**2004 – 2006** *główny wykonawca promotorskiego projektu badawczego KBN 2P05A 045 27 –* „Wpływ glukokortykoidów na równowagę redoks w komórkach śródbłonka. Rola białka Rac1 w generowaniu anionorodnika ponadtlenkowego” – Promotor: prof. dr hab. Mirosław Soszyński, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

#### **(5e) Staże zagraniczne i szkolenia**

##### Staże zagraniczne

**01.10.2008 – 31.07.2011** Baker Medical Research Institute, Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Melbourne, Australia;

**07.01.2008 – 4.04.2008** Baker Medical Research Institute, Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Melbourne, Australia;

**23.08.2006 – 9.09.2006** Instytut Michel Pacha, Tamaris sur Mer, Francja;

**2.09.2015 – 14.09.2005** Instytut Michel Pacha, Tamaris sur Mer, Francja;

##### Szkolenia

**21-23.04.2015** Łódź, Warsztaty mikroskopowe: „New methods of confocal and two-photon confocal microscopy”

**20.09 – 01.10.2004** Free Radical School 2004 “Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology”, Spetses, Greece

**22-24.06.2004** Poznań – Techniki analizy i detekcji kwasów nukleinowych i białek

**27-30.08.2003** Debrecen, Węgry, FEBS advanced course – Poly-ADP-Ribosylation in Health and Disease

**6-7.05.2003** Warszawa, Warsztaty Mikroskopowe, Olympus;

**26-31.10.2002** Kraków, Uniwersytet Jagielloński - Uczestnictwo w III<sup>ej</sup> Międzynarodowej Szkole Cytometrii Przepływowej i Mikroskopii Konfokalnej

#### **(5f) Nagrody i wyróżnienia**

**2017** Brązowy medal za długoletnią służbę

**2016** Laureatka 16 edycji konkursu „L’Oréal dla Kobiet i Nauki” – stypendium habilitacyjne

**2014** Laureatka Programu ‘Coaching’ Fundacji na rzecz Nauki Polskiej

**2012** Nagroda Prezydium Oddziału Polskiej Akademii Nauk w Łodzi i Konferencji Rektorów Łódzkich Uczelni Publicznych w dziedzinie nauk biologiczno-medycznych za wybitne



- osiągnięcia w badaniu efektów stresu oksydacyjnego i mechanizmu epigenetycznego efektu pamięci cukrzycowej oraz wpływu hiperglikemii na komórki śródbłonna naczyń
- 2008** Zagraniczne stypendium wyjazdowe Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (Program "Kolumb") na pobyt w Baker Medical Research Institute, Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Melbourne, Australia
- 2007** Stypendium Human Frontier Science Program Organization na pobyt Baker Medical Research Institute, Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Melbourne, Australia
- 2006** Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za rozprawę doktorską
- 2006** Stypendium Konferencyjne dla Młodych Pracowników Naukowych ufundowane przez Towarzystwo Naukowe Warszawskie i Fundację na rzecz Nauki Polskiej na dofinansowanie uczestnictwa w XIII Kongresie SFRRRI, Davos, 2006 (Davos, Szwajcaria, 15-19 Sierpnia, 2006)
- 2006** Stypendium Society of Free Radical International na pokrycie kosztów uczestnictwa w XIII Kongresie SFRRRI, Davos, 2006 (Davos, Szwajcaria, 15-19 Sierpnia, 2006)
- 2006** Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla Młodych Naukowców, (Program "Start")
- 2005** Stypendium IUPUB na pokrycie kosztów uczestnictwa w Kongresie Biofizycznym, Montpellier 2005 (Montpellier le Corum, Francja, 27 Sierpnia – 1 Września 2005)
- 2005** Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla Młodych Naukowców, (Program "Start")
- 2004** Stypendium FEBS na pokrycie kosztów uczestnictwa w Free Radical School, "Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology", 2004, Spetses, Grecja
- 2003** Stypendium FEBS na pokrycie kosztów uczestnictwa w FEBS advanced course – Poly-ADP-Ribosylation in Health and Disease, 2003, Debrecen, Węgry
- 2003** Zespołowa Nagroda pierwszego stopnia, Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za osiągnięcia naukowo-badawcze

#### **(5g) Pełnione funkcje, członkostwo w towarzystwach naukowych**

- 2017** Członek Zespołu Recenzentów w Programie Stypendialnym Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowships H2020-MSCA-IF-2017 European & Global Fellowships - Scientific Panel LIF); zrecenzowane projekty-12; przygotowane sprawozdania zbiorcze -11
- 2016** Członek Zespołu Recenzentów w Programie Stypendialnym Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowships H2020-MSCA-IF-2016 European &

- Global Fellowships - Scientific Panel LIF) zrecenzowane projekty-20; przygotowane sprawozdania zbiorcze-8
- 2015** Członek Zespołu Recenzentów w Programie Stypendialnym Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowships H2020-MSCA-IF-2015 European & Global Fellowships - Scientific Panel LIF) zrecenzowane projekty-23; przygotowane sprawozdania zbiorcze -7
- 2014** Członek Zespołu Recenzentów w Programie Stypendialnym Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowships H2020-MSCA-IF-2014 European & Global Fellowships - Scientific Panel LIF) zrecenzowane projekty-24; przygotowane sprawozdania zbiorcze -8
- 2013** Członek Komisji Ekspertów Narodowego Centrum Nauki; zrecenzowane projekty-18; przygotowane sprawozdania zbiorcze -4
- 2012-obecnie** Członek Klubu Stypendystów FNP
- 2002-obecnie** Członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

#### **(5h) Zrecenzowane artykuły - 29**

- 2017 – 13;** Nutrients – 2 (nutrients-217250; nutrients-190684); Biochemical Pharmacology – 2 (BCP-D-17-00895; BCP-D-17-00431); Tumor Biology – 2 (TUB-17-0656; TUB-17-0199); Current Pharmaceutical Design – 2 (BSP-CPD-2017-1284, BSP-CPD-2017-1284R1; BSP-CPD-2017-1131, BSP-CPD-2017-1131R1); Current Medicinal Chemistry – 1 (BSP-CMC-2017-HT84-4; BSP-CMC-2017-HT84-4R1); Scientific Journal of Food Science & Nutrition – 1 (SJFSN-RW-17-06); Hematological Diseases and Therapies – 1 (JHDT-108); Cellular Oncology – 1 (CEON-D-17-00132); Microbial Cell Factories – 1 (MICF-D-17-00070)
- 2016 – 10;** Biochemical Pharmacology – 1 (BCP-D-16-01208); International Journal of Diabetes and Clinical Research – 1 (IJDCR-16-11-15); Heighpubs Journal of Biology and Medicine – 1 (HJBM0001); Folia Biologica et Oecologica – 1; Journal of Functional Food – 2 (JFF-D-16-01849; JFF-D-16-01837), Biomedicine & Pharmacotherapy – 2 (BIOPHA\_2016\_628; BIOPHA\_2015\_619), Tumor Biology – 1 (TUBI-D-16-01097, TUBI-D-16-01097R1), Biochemistry and Cell Biology – 1 (bcb-2015-0151.R1)
- 2015 – 2;** Phytomedicine -1 (PHYMED-D-15-00864), Neuropharmacology -1 (NEUROPHARM-D-15-00626)
- 2014 – 2;** Journal of Cellular and Molecular Medicine -1 (JCMM-07-2014-060, JCMM-07-2014-060.R1), Nitric Oxide – 1 (NOX-14-80)
- 2010 – 2;** Acta Biochimica Polonica – 2 (ABP#1969, ABP #1936C)

**(5i) Współpraca naukowa**

- Prof. Assam El-Osta, PhD – Monash University, Melbourne, Australia
- Prof. Tom Karagiannis, PhD – Monash University, Melbourne, Australia
- Prof. Luciano Pirola, PhD – University of Lyon, France
- Prof. dr hab. Janusz Szemraj – Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- dr hab. Dorota Rybaczek – Uniwersytet Łódzki
- dr Agnieszka Śliwińska – Uniwersytet Medyczny w Łodzi

## 6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

### (6a) Opieka nad doktorantami/promotor pomocniczy : 2

mgr Arkadiusz Dąbek – doktorant I roku studiów doktoranckich (2017-2021); Stacjonarne Studium Biochemiczno-Biofizyczne, Uniwersytet Łódzki – opiekun pomocniczy

mgr Martyna Wojtala – doktorantka IV roku studiów doktoranckich (2014-2018); Stacjonarne Studium Biochemiczno-Biofizyczne, Uniwersytet Łódzki – promotor pomocniczy

### (6b) Opieka/Promotorstwo prac magisterskich: 4 (2017-1; 2014-1; 2013-1; 2003-1)

Arkadiusz Dąbek – „Weryfikacja właściwości  $\beta$ -hydroksymaślanu jako modulatora acetyloemu komórek śródbłonna naczyniowego”, Kierunek – Biotechnologia, Specjalizacja – Biotechnologia medyczna, Uniwersytet Łódzki, 2017 (opieka praktyczna, promotorstwo)

Ewelina Bęben - “Rola metylotransferaz histonów w regulacji procesu angiogenezy”, Kierunek – Biotechnologia, Specjalizacja – Biotechnologia medyczna, Uniwersytet Łódzki, 2013 (opieka praktyczna, promotorstwo)

Karolina Fornalczyk - “Rola lizyno-specyficznej demetylazy histonów (LSD-1) w regulacji angiogenezy’; Kierunek – Biologia, Specjalizacja – Biofizyka medyczna i bioinformatyka, Uniwersytet Łódzki, 2014 opieka praktyczna, (promotor – prof. dr hab. Grzegorz Bartosz)

Katarzyna Łuczak – “Wpływ niskich stężeń utleniaczy na proliferację komórek śródbłonna izolowanych z żyły pępowinowej, HUVEC”, Kierunek – Biologia, Specjalizacja – Biofizyka, Uniwersytet Łódzki, 2003; opieka praktyczna (promotor – prof. dr hab. Mirosław Soszyński)

### (6c) Promotorstwo prac licencjackich: 8 (2017-1; 2015 - 2; 2013 - 2; 2012 – 2; 2011-1)

Varvara Velichko – „Naturalne komponenty diety w profilaktyce i leczeniu nowotworów, a epigenetyka”, Kierunek - Biotechnologia, Uniwersytet Łódzki, 2017; praca teoretyczna

Arkadiusz Dąbek - “Molekularne podłoże starzenia się śródbłonna naczyniowego”, Kierunek - Biotechnologia, Uniwersytet Łódzki, 2015; praca teoretyczna

Gabriel Skwarek – „Peroksyredoksyny – niskocząsteczkowe regulatory homeostazy redoks”, Kierunek - Biotechnologia, Uniwersytet Łódzki, 2015; praca teoretyczna

Damian Kaniowski – „Metylacja białek histonowych i niehistonowych a proces starzenia”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2013; praca teoretyczna

Anna Lamprycht – “Rola metylacji DNA w procesie kancerogenezy”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2013; praca teoretyczna

Karolina Fornalczyk – “Epigenetyczna regulacja procesu angiogenezy”, Kierunek – Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2012; praca teoretyczna

Anna Staśkiewicz – “Wpływ reaktywnych form azotu na funkcjonowanie układu naczyniowo-sercowego”, Kierunek – Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2012; praca teoretyczna

Melissa Chu – “Effect of Glucose Stress on MMP-10 Expression and Endothelial Cell Function”, Faculty of Medicine, Dentistry and Health Sciences, Unit 01068 Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, The University of Melbourne, 2011; (English), praca doświadczalna; (ko-promotor)

**(6d) Zrecenzowane rozprawy doktorskie: 1 (2016 - 1)**

Sabrina Chriett – “Epigenetic regulations by insulin and histone deacetylase inhibitors of the insulin signaling pathway in muscle” – (Ecole Doctorale ED 205, Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Sante, Specialite de doctora: Biologie) Uniwersytet w Lyon, 2016; Promotor – Prof. Associate L. Pirola, PhD

**(6e) Zrecenzowane prace magisterskie: 1 (2015 - 1)**

Joanna Hertel - “Oddziaływanie rezorcylidenowej pochodnej aminoguanidyny (RAG) na bioenergetykę mitochondriów limfocytów w modelu hiperglikemii doświadczalnej”, Kierunek – Biologia, Specjalizacja – Biofizyka medyczna i bioinformatyka, Uniwersytet Łódzki, 2015; promotor – dr hab. Magdalena Łabieniec-Watała

**(6f) Zrecenzowane prace licencjackie: 6 (2016 - 4; 2013 - 1; 2012 - 1)**

Aasar Khadija – „The role of multidrug resistance proteins in conferring resistance to folate analogs”, Kierunek – Biotechnologia, Uniwersytet Łódzki, 2016; promotor – dr Błażej Rychlik

Maciej Bierzyński – “GAPDH w chorobie Alzheimera”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2016; promotor – dr hab. Aleksandra Rodacka

Katarzyna Figat - “Parabeny w kosmetykach”, Kierunek – Ochrona Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 2016; promotor – prof. dr hab. Bożena Bukowska

Patrycja Paciorek - “Rola mikroRNA w chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworowych”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2016; promotor – dr Agnieszka Grzelak

Monika Sikora - “Nanocząstki diamentu i złota jako wewnątrzkomórkowe transportery leków”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2013; promotor – dr Agnieszka Gajewska

Katarzyna Klińska - “Epigenetyczne podłoże nowotworzenia”, Kierunek - Biologia, Uniwersytet Łódzki, 2012; promotor – prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

**(6g) Zajęcia dydaktyczne**

**Biofizyka** (ćw. lab.) - I rok studiów licencjackich, kierunek - Mikrobiologia, 2015/2016, sem. letni; UŁ

**Biofizyka** (wykład, ćw. lab.) – I rok studium, sem. zim., 2011/2012, Wyższa Szkoła Kosmetyki i Nauk o Zdrowiu, ul. Wileńska 53/55, Łódź

**Bromatologia** (wykład, seminarium) – II rok studium, sem. zim., 2011/2012, Wyższa Szkoła Kosmetyki i Nauk o Zdrowiu, ul. Wileńska 53/55, Łódź

**Fizyka** (ćw. lab.) - I rok studiów magisterskich, kierunek – Biologia, 2007/2008, sem. letni; 2006/2007, sem. letni; 2005/2006, sem. letni; UŁ

**Fizyka i biofizyka** (ćw. lab.) - I rok studiów magisterskich, kierunek - Biologia, 2007/2008, sem letni; II rok studiów licencjackich, kierunek - Biotechnologia, 2015/2016, sem. zimowy; UŁ

**Fizyka z elementami biofizyki** (ćw.) - I rok studiów magisterskich, kierunek - Biologia, 2007/2008, sem letni; UŁ

**Konwersatorium z języka angielskiego** - I rok magisterskich studiów uzupełniających na kierunku Biotechnologia medyczna i bioinformatyka -2011/2012, sem. zimowy; 2015/2016, sem. zimowy; 2016/2017, sem. zimowy; UŁ

**Metody instrumentalne** (ćw. lab.) – II rok studiów magisterskich, kierunek - Biologia, 2006/2007, sem. zim.; UŁ

**Podstawy metod hodowli komórek i biologii molekularnej** (ćw. lab.) - IV rok studiów magisterskich, kierunek - Biologia - 2005/2006, sem. letni; UŁ

**Pracownia specjalistyczna (blok biologii molekularnej)** (ćw. lab.) - I rok magisterskich studiów uzupełniających na specjalizacji Biofizyka medyczna - 2011/2012, sem. letni; 2014/2015, sem. letni; 2015/2016, sem. letni; 2016/2017, sem. letni; UŁ

**Przekazywanie informacji w komórce, regulacja ekspresji genów** (ćw. lab.) – 2011/2012, sem zim.; 2012/2013, sem. letni; UŁ

**Seminarium z języka angielskiego dla doktorantów** - I rok studiów doktoranckich Studium Biochemiczno-Biofizycznego - 2014/2015, sem. letni; 2015/2016; sem. letni; UŁ

**Zastosowanie kultur tkankowych w badaniach biomedycznych** (ćw. lab.) – 2011/2012, sem. letni; UŁ

#### **(6h) Promocja nauki**

**03.03.2017 - VII FESTIWAL NAUKI** w I Liceum Ogólnokształcącym im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. – wykład dla uczniów klas o profilu biologiczno-chemicznym - „Oszukać przeznaczenie, czyli rzecz o epigenetycznej regulacji ekspresji genów”; **dr A Balcerczyk**

**13.01.2017 - NOC BIOLOGÓW**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla gimnazjalistów i uczniów szkół podstawowych – „Wolne rodniki – dobre, złe, brzydkie...” (**dr A Balcerczyk**, dr P Sicińska, mgr M Wojtala, A Salamon, A Dąbek, V Velichko)

**15.01.2016 - NOC BIOLOGÓW**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla gimnazjalistów i uczniów szkół podstawowych – ”Odkrywamy tajemnice jądra komórkowego” – budowa modeli DNA, obserwacje mikroskopowe komórek (dr P Sicińska, **dr A Balcerczyk**, dr E Macierzyńska-Piotrowska, mgr M Wojtala, A Dąbek, mgr M Cyrkler); ”Nie będziemy łać wody”- badanie właściwości fizyko-chemicznych wody; (**dr A Balcerczyk**, dr E Macierzyńska-Piotrowska, mgr M Wojtala, A Dąbek, dr P Sicińska, mgr M Cyrkler)

**09.01.2015 - NOC BIOLOGÓW**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla gimnazjalistów – „Tajemnice kodu genetycznego” (dr A Gajewska, dr E Macierzyńska-Piotrowska, mgr M Wojtala, mgr K Fornalczyk, mgr K Brokowska, **dr A Balcerczyk**)

**27-28.02.2014 - IV FESTIWAL NAUKI** w I Liceum Ogólnokształcącym im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. – wykład dla uczniów klas o profilu biologiczno-chemicznym - „Zjawisko oporności wielolekowej w chorobie nowotworowej”; **dr A Balcerczyk**

**10.01.2014 - NOC BIOLOGÓW**, Wydział BiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego – zajęcia dla gimnazjalistów - „Badamy właściwości DNA”; dr A Gajewska, dr E Macierzyńska-Piotrowska, mgr M Wojtala, mgr K Fornalczyk, mgr K Brokowska, **dr A Balcerczyk**

**15.09.2013 - Zajęcia dla licealistów na Wydziale BiOŚ, UŁ** - wykłady i warsztaty dla licealistów z I Liceum Ogólnokształcącego im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. (izolacja DNA z komórek roślinnych, izolacja i analiza barwników roślinnych, homeostaza redoks komórki); **dr A Balcerczyk**

**01.03.2013 - III FESTIWAL NAUKI** w I Liceum Ogólnokształcącym im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. – wykład dla uczniów klas o profilu biologiczno-chemicznym - „Czym jest rak, czyli o życiu, śmierci, nieśmiertelności komórki i... rosyjskiej ruletce”; **dr A Balcerczyk**

**19.04.2012 - Zajęcia dla licealistów na Wydziale BiOŚ, UŁ** - wykład i warsztaty dla licealistów z I Liceum Ogólnokształcącego im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. (izolacja DNA z komórek roślinnych, obrazowanie w mikroskopie konfokalnym, cytometryczna analiza cyklu komórkowego); **dr A Balcerczyk**, dr A Gajewska, dr E Macierzyńska-Piotrowska

**02.12.2011 - II FESTIWAL NAUKI** w I Liceum Ogólnokształcącym im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Maz. – wykład dla uczniów klas o profilu biologiczno-chemicznym - „Dziedziczenie bez genów - niemożliwe, a jednak...”; **dr A Balcerczyk**

**PODSUMOWANIE**

Dorobek naukowy: 39 publikacji, 53 doniesienia konferencyjne

łącna liczba cytowań wszystkich publikacji – 1135; (bez autocytowań – 1005)

łącny IF (zgodny z rokiem publikacji) – 157,923

łącne punkty MNiSW - 1150

**Indeks H = 17;** (według [Web of Science/ ICM](#))

Dorobek publikacyjny przed doktoratem:

- 10 publikacji naukowych
- 18 doniesień konferencyjnych

Dorobek publikacyjny po doktoracie:

- 29 publikacji badawczych i przeglądowych
- 35 doniesień konferencyjnych

