

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Kobielał

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2000 - Doktor nauk biologicznych, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Tytuł rozprawy: „Rola homeotycznych genów MSX, genu EDA i czynnika transkrypcji Lef-1 w procesie różnicowania zawiązków zębów.” Promotor pracy: Profesor Wiesław Henryk Trzeciak

1997 - Magister biologii molekularnej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

11/2015 - obecnie	Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego
2007 - 2015	Assistant Professor, Department of Otolaryngology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Norris Cancer Center, Keck School of Medicine at the University of Southern California
2002 - 2007	Postdoctoral Associate, Laboratory of Mammalian Cell Biology and Development, Rockefeller University, New York, NY
2001 - 2002	Postdoctoral Associate, Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Chicago, IL
1999 – 2000	Asystent, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny K. Marcinkowskiego w Poznaniu
1997-1999	Doktorant, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny K. Marcinkowskiego w Poznaniu

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.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

„Białka z rodziny α -katenin: ich rola w połączeniach międzykomórkowych i rozwoju nowotworów.”

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Kobielałak A., Pasolli H.A., Fuchs E. Mammalian Formin1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. **Nat. Cell Biol.** 6 (1):21-30; 2004, **IF: 20 cytowania: 249**

Kobielałak A., Fuchs E. Links between α -catenin, NF- κ B and Squamous Cell Carcinoma in skin. **PNAS** 103(7):2322-2327; 2006, **IF: 9.6, cytowania: 86**

Livshits G., **Kobielałak A., Fuchs E.** Governing epidermal homeostasis by coupling cell-cell adhesion to integrin and growth factor signaling, proliferation, and apoptosis. **PNAS**, 109(13):4886-91; 2012, **IF: 9.6, cytowania: 24**

Cao C., Chen Y., Masood R., Sinha U., **Kobielałak A***. Catulin marks the invasive front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis. **Molecular Cancer Research**, 10(7):892-903; 2012, **IF: 4.97, cytowania: 11**

Kobielałak A., Fuchs E. α -Catenin: At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 5(8):614-625; 2004, *artykuł przeglądowy na zaproszenie* **IF: 46.6 cytowania: 202**

* autor korespondencyjny

Sumaryczny IF dla prac wchodzących w skład osiągnięcia: **90.77**

Sumaryczna liczba cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia: **572**

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5 (Oświadczenia współautorów).

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

A. Wstęp

W organizmach wielokomórkowych, kontakty między komórkowe, w których pośredniczą klasyczne kadheryny, odgrywają zasadniczą rolę w wielu podstawowych procesach, takich jak morfogeneza, utrzymywanie integralności tkanki, gojenie ran i polaryzacja komórek (1). Klasyczna kadheryna, jaką jest transbłonowe białko E-kadheryna, wykorzystuje swoją zewnątrzkomórkową domenę do wiązania wapnia i oddziałuje z E-kadheryną na sąsiedniej komórce, tworząc w ten sposób połączenia międzykomórkowe. Aby utworzyć silne połączenia międzykomórkowe, E-kadheryna wykorzystuje swoją domenę cytoplazmatyczną do wiązania katenin i cytoszkieletu aktynowego. Połączenia komórkowe dzięki wiązaniu do sieci aktynowo-miozynowej zapewniają możliwość przebudowy oddziaływań międzykomórkowych, zwiększając ich elastyczność i dynamikę podczas naprawy ran w dorosłych tkankach jak i w czasie rozwoju embrionalnego (2-4). Tworzenie nowych połączeń międzykomórkowych i dynamika aktyny w tym procesie jest związana z początkowymi etapami łączenia membran i ich zamykaniu w warstwy nabłonkowe. Dysregulacja połączeń, w których pośredniczy kadheryna-katenina, może prowadzić do poważnych zaburzeń rozwojowych powodujących degenerację tkanki, lub w innych przypadkach może przyczyniać się do powstawania nowotworów i przerzutów (2-4).

W przeciwieństwie do β -kateniny, która ma dobrze udokumentowaną podwójną rolę w adhezji komórkowej i transdukcji sygnału, α -katenina często była uważana za nieregulacyjne międzykomórkowe białko adhezyjne. Ostatnio jednak część mojej pracy wykazała, że α -katenina pełni istotną rolę nie tylko w łączeniu E-kadheryny - β -kateniny do kompleksu aktynowego cytoszkieletu (5), ale również w koordynowaniu dynamiki aktyny w czasie tworzenia nowych połączeń międzykomórkowych i odwrotnie koreluje z proliferacją (6). Pokazałam również, że inne białka z rodziny α -katenin, takie jak katulina, mogą brać udział w procesie progresji nowotworów (7). Wraz ze wzrostem liczby nowych białek oddziałujących z α -kateniną, połączenia te implikują jeszcze bardziej złożone funkcje regulacyjne dla tego białka.

α -katenina łączy kompleksy E-kadheryny i β -kateniny z cytoszkieletem aktynowym (8-9) i różni się znacznie zarówno sekwencją jak i organizacją strukturalną od innych katenin jak β -

katzenina, plakoglobina czy p120, które należą do rodziny białek Armadillo. α -katzenina jest konserwatywna w całym królestwie eukariotycznym, gdzie funkcjonuje szeroko w połączeniach międzykomórkowych podczas rozwoju i różnicowania. U *Drosophila melanogaster* połączenia międzykomórkowe zostają zakłócone, gdy α -katzenina zawiera mutację w miejscu wiązania dla Armadillo, homologu β -katzeniny u *Drosophila* (10). Połączenia międzykomórkowe są również obecne u nicieni, *Caenorhabditis elegans*, które ekspresjonują homologi HMR-1 (kadheryny) HMP-1 (α -katzeniny) i HMP-2 (β -katzeniny) (11). U myszy istnieją trzy α -katzeniny i jedno białko pokrewne, które wykazują znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasów. α E-katzenina jest najbardziej rozpowszechniona w tkankach nabłonkowych (12); α N-katzenina jest ograniczona do tkanek nerwowych (13,14); α T-katzenina jest obecna przede wszystkim w tkance serca 15; α -katulina, białko z rodziny α -katzenin, o mniej znanej funkcji (16,17). Dalszym pokrewnym białkiem jest vinculina, która pełni funkcję w oddziaływaniach komórki poprzez integryny (18).

Zmutowanie u myszy genu α E-katzeniny przy pomocy systemu gene-trap, powoduje śmiertelny fenotyp embrionalny, podobny do mysiego mutantu E-kadheryny (19). Aby zbadać znaczenie funkcjonalne α E-katzeniny w innych tkankach nabłonkowych, Vasioukhin et al. (20) skonstruowali myszy z indukowalną mutacją w α E-katzeninie. Usunięcie genu α E-katzeniny w skórze myszy w czasie rozwoju embrionalnego (dzień 15) spowodowało upośledzenie rozwoju mieszków włosowych oraz dramatyczny fenotyp skórny. Pomimo, że kompleksy E-kadheryny i β -katzeniny były nadal zlokalizowane pomiędzy sąsiednimi komórkami to struktura epidermy była zaburzona. Najbardziej intrygująca była zwiększona proliferacja naskórka i obecność wielojądrowych komórek, którym towarzyszyły wgłębienia w część dermalną skóry przypominające przedrakowe zmiany znane jako rak płaskonabłonkowy *in situ*.

Badania keratynocytów, wyizolowanych ze skóry myszy, w których gen α E-katzeniny został warunkowo inaktywowany pozwoliły odkryć funkcję α E-katzeniny w tworzeniu promieniowych przewodów aktyny, które są konieczne do stabilizowania nowych punktów oddziaływań międzykomórkowych i tworzenia szczelnej warstwy epitelialnej (20, 21). Podczas początkowych etapów formowania warstwy nabłonka, liniowe promieniowe kable aktynowe z sąsiadujących komórek łączą się do nowo powstających połączeń międzykomórkowych. Proces ten wymaga α E-katzeniny i polimeryzacji aktyny.

Białka łączące α -kateninę z aktyną podczas tworzenia nowych połączeń międzykomórkowych.

Interakcje α -kateniny z innymi białkami, które wiążą aktynę bezpośrednio lub pośrednio, jak Ena / VASP czy afadyna (1) są wystarczające do wyjaśnienia procesu dodawania nowych podjednostek aktyny do wcześniej istniejących włókien aktyny, jednak nie jest to wystarczające do wytłumaczenia procesu polimeryzacji aktyny *de novo* podczas tworzenia połączeń międzykomórkowych. Dlatego też kiedy dołączyłam do laboratorium E. Fuchs podczas mojego stażu podoktorskiego, rozpoczęłam prace nad przygotowaniem badań przesiewowych za pomocą metody yeast two hybrid (YTH), aby scharakteryzować nowe białka wiążące α -kateninę. W trakcie tych badań zidentyfikowałam i scharakteryzowałam forminę-1 jako nowe białko oddziałujące z α -kateniną (5). Formina 1 (Fmn1), białko z rodziny formin było dobrym kandydatem do generowania promieniowych kabli aktynowych, które łączą się w nowo powstających połączeniach międzykomórkowych. Używając metody YTH oraz analiz *in vitro*, pokazałam region w segmencie aminoterminalnym kilku izoform Fmn1, który specyficznie oddziałuje z tzw. domeną wiążącą vinculinę (aminokwasy ~ 300-500) α -kateniny. Konserwatywne domeny homologii w forminie (FH) w karboksy końcowej części Fmn1 zawierają miejsca dla nukleacji polimeryzacji aktyny (praca pogładowa 22). Stosując test nukleacji *de novo*, wykazałam, że segment karboksylowy Fmn1 może rzeczywiście zapoczątkować polimeryzację nierozgałęzionych włókien aktyny *in vitro* oraz w transfekowanych komórkach w sposób zależny od α -kateniny, aby promować polimeryzację linearnej aktyny (5). Aby zbadać, czy oddziaływanie forminy-1 i α -kateniny jest istotne fizjologicznie, użyłam mikroskopii immunofluorescencyjnej używając skrawków skóry z myszy kontrolnych oraz pozbawionych α -kateniny. Barwienie przeciwciałem na forminę-1 wykazało, że formina-1 była zlokalizowana w cytoplazmie i w połączeniach międzykomórkowych myszy kontrolnych natomiast lokalizacja forminy-1 w połączeniach międzykomórkowych myszy z usuniętą α -kateniną była zakłócona. W hodowanych keratynocytach z myszy kontrolnych formina-1 również lokalizowała do nowo powstających połączeń międzykomórkowych, co korelowało z lokalizacją α -kateniny. Przeciwciało na forminę-1 również lokalizowało w obrębie włókien F-aktyny promieniującej z nowo powstających połączeń międzykomórkowych. W późniejszych stadiach, przeciwciało na forminę-1 lokalizowało wzdłuż granic między komórkami, typowo dla liniowych wzorów barwienia przeciwciał przeciwko klasycznym białkom połączeń międzykomórkowych. W przypadku braku α -kateniny, keratynocyty

wykazywały niewiele połączeń komórkowych i radialnych kabli aktywy. W celu dalszego sprawdzenia, czy zdolność α -kateniny do rekrutacji forminy-1 jest kluczowa do aranżowania dynamiki aktywy podczas tworzenia połączeń międzykomórkowych, przeprowadziłam eksperyment ratunkowy. W teście tym bezpośrednia rekrutacja C-końcowej domeny forminy-1 (polimeryzującej aktynę *de novo*) do kompleksów E-kadheryna- β -katenina powinno ratować tworzenie połączeń międzykomórkowych w keratynocytach pozbawionych α -kateniny. Aby przetestować tę możliwość, skonstruowałam plazmid fuzyjny, w którym domena FH1-FH2 forminy była połączona z domeną wiążącą β -kateninę i GFP do znakowania (GFP- β -cat-BD-FH1-FH2). W tym eksperymencie wygenerowałam trzy dodatkowe białka znakowane GFP jako kontrole: pełnej długości α -kateninę, FH1-FH2 i β -cat-BD (FH1). Przeprowadzając ten eksperyment byłam w stanie udowodnić, że dostarczenie domeny forminy, która polimeryzuje aktynę do kompleksu E-kadheryny jest kluczowe w procesie tworzenia nowych połączeń międzykomórkowych. Chociaż Fmn1 jest dobrym kandydatem do rozpoczęcia tworzenia liniowych kabli aktywy w miejscach nowo powstających połączeń międzykomórkowych, pozostaje jeszcze ustalić, czy te lub jakiegokolwiek inne forminy w ich stanie naturalnym są w rzeczywistości funkcjonalne w tych miejscach, a jeśli tak, to jak są one regulowane w celu kontrolowania polimeryzacji aktywy.

α -katenina i rozwój nowotworów

Chociaż mutacje w α E-kateninie wiązano z nowotworami pochodzenia epitelialnego (23-27) zwykle zakładano, że zakłócenia w połączeniach międzykomórkowych są końcowym, a nie wczesnym etapem kancerogenezy, i że są poprzedzone mutacjami w genach regulujących cykl komórkowy, które prowadzą do niekontrolowanego wzrostu (1). Jednakże, jak wykazano w poprzednich badaniach w laboratorium E. Fuchs przez V. Vasioukhina u myszy pozbawionych α E-kateniny, nabłonek skóry równomiernie wykazywał zwiększoną proliferację wkrótce po ablacji genu α E-kateniny (20). Co ciekawe, te perturbacje zdawały się występować niezależnie od wpływu na połączenia międzykomórkową, a także niezależnie od transkrypcji genów zależnych od czynników β -katenina i Lef1 / Tcf w ścieżce Wnt.

Dokładny mechanizm pozostawał niewyjaśniony, ale wstępne badania sugerowały, że gdy α E-katenina jest nieobecna, kompleksy E-kadheryna- β -katenina mogą oddziaływać w nowy sposób z komponentami różnych szlaków transdukcji sygnału. Kiedy przejęłam ten projekt,

chciałam odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób utrata α -kateniny wywołuje fenotyp zwiększonej proliferacji?

W tym celu użyłam wcześniej wygenerowane myszy K14-Cre / α -katenin fl / fl, które wykazywały ilościową utratę α -kateniny w skórze i nabłonku jamy ustnej, ale niestety umierały wkrótce po urodzeniu (20). Aby dokładniej zbadać konsekwencje ablacji α -kateniny w skórze, musiałam ustawić system przeszczepu skóry z myszy (E18.5) kontrolnych i z usunięta α -kateniną na grzbiety myszy z deficytem immunologicznym (Nude). W ciągu 4-6 tygodni przeszczepy z myszy kontrolnych rozwinęły się prawidłowo. W przeciwieństwie do przeszczepów z myszy z usunięta α -kateniną, które nie miały włosów i wykazywały guzowate zmiany (28). Zaburzenia morfologiczne i biochemiczne przypominały te z dobrze zróżnicowanych nowotworów płaskonabłonkowych (SCC) stopnia I u ludzi. Do 70 dni przeszczepy kontrolne pozostały niezmienione, ale przeszczepy z myszy z usunięta α -kateniną przypominały SCC klasy III człowieka z wieloma nietypowymi komórkami (28). Aby zrozumieć, w jaki sposób utrata α -kateniny prowadzi do takich globalnych efektów, najpierw zbadałam wzory ekspresji mRNA w naskórku myszy kontrolnych i z usunięta α -kateniną. Analiza porównawcza ujawniła wyróżniające cechy, które charakteryzują wczesne konsekwencje ablacji α -kateniny. Zmienione pod względem ekspresji geny w skórze bez α -kateniny obejmowały geny odpowiedzialne za przeżywalność i wzrost komórek oraz geny związane z sygnalizacją poprzez insulinę. Podwyższona ekspresja represorów transkrypcyjnych Snail, Twist i SIP była zgodna z obniżeniem ekspresji E-kadheryny na krawędziach rosnących mas komórek nabłonkowych, oraz w komórkach wykazujących morfologię zbliżoną do mezenchymalnej. Najbardziej intrygującym wynikiem, który uzyskałam za pomocą analizy porównawczej macierzy była zmiana ekspresji dużej liczby genów związanych ze ścieżką sygnałową NF κ B, które uległy podwyższeniu w początkowej fazie po ablacji α -kateniny. Aby zweryfikować aktywację szlaku NF κ B przeprowadziłam analizę anty-fosfo-p65, zarówno metodą western blot, jak i poprzez barwienie próbek skóry. Zweryfikowałam, że zwiększona ekspresja genów związanych z NF κ B nie pochodziła od komórek odpornościowych obecnych w skórze lecz bezpośrednio z komórek naskórka myszy z usunięta α -kateniny przeprowadzając RT-PCR z izolowanych przez sortowanie komórek naskórka E18.5. Poprzez analizy *in vitro* wykazałam, że aktywacja ścieżki NF κ B była spowodowana ablacją α -kateniny. Chociaż komórki bez α -kateniny w hodowli wykazywały podwyższoną aktywację NF κ B, różnice w RT-PCR były zawsze wyraźniejsze *in vivo*, co sugeruje, że komórki odpornościowe mogą zaostreć tą

odpowieź. W celu potwierdzenia efektu zewnętrznego wykorzystałam system reporterowy z NFκB i lucyferazą, który był wrażliwy na TNFα, wydzielane przez aktywowane komórki odpornościowe. Receptory interleukiny w komórkach bez α-kateniny były aktywowane, sądząc na podstawie fosforylacji ich dalszego efektora, STAT3. W końcu wykorzystałam deksametazon (Dex) do oceny stopnia, w jakim aktywacja NFκB, w komórkach naskórka i komórkach odpornościowych, przyczyniła się do postępującej dysplazji przeszczepionej skóry z myszy bez α-kateniny wyznakowanych specyficznie poprzez epidermalną ekspresję K14-GFP-aktyny. Chociaż Dex nie ogranicza się do represji NFκB, nie miało to oczywistego wpływu na przeszczepy kontrolne. Przeciwnie, w ciągu 30 dni od traktowania Dex, większość komórek GFP + w 4 z 5 traktowanych przeszczepów uległa degeneracji i została zastąpiona przez otaczającą kontrolną epidermę z myszy Nude. Te badania sugerują, że komórki naskórka bez α-kateniny mogą być bardziej wrażliwe na apoptozę niż ich kontrolne odpowiedniki, ale że ta czułość jest maskowana przez aktywację ścieżki NFκB (28). Aby sprawdzić znaczenie tych odkryć w ludzkim raku płaskonabłonkowym, przeanalizowałam 40 SCC z ludzkiej skóry pod kątem zmian α-kateniny, aktywacji NFκB i stanu zapalnego. Spośród nich 33 wykazywało zmniejszone lub niewykrywalne międzykomórkowe barwienie dla α-kateniny, a większość z nich także wykazywała redukcję E-kadheryny i β-kateniny. Podobnie jak w przypadku przeszczepów skóry myszy, nawet dobrze zróżnicowane ludzkie SCC często wykazywały zmniejszoną i często brak ekspresji α-kateniny. Tylko 2 z 40 ludzkich SCC wykazywało ekspresję jądrowej β-kateniny. 33 próbki wykazywały obecność aktywnej ścieżki NFκB. Towarzyszyły temu stany zapalne i fosforylowane STAT3, które wcześniej wiązały się ze zwiększoną proliferacją i chorobami skóry. Odkrycia te sugerują, że zmniejszenie α-kateniny w połączeniach międzykomórkowych koreluje z aktywacją NFκB co jest obserwowane w wielu nowotworach co sprawia, że opisane przez nas mechanizmy mogą wykraczać poza nowotwory typu SCC w skórze. Te cechy są również charakterystyczne dla gojenia się ran, gdzie normalne komórki naskórka muszą przejściowo zmniejszać poziom oddziaływań międzykomórkowych, zwiększać migrację, aktywować odpowiedź zapalną i przemodelować macierz pozakomórkową. Jeśli tymczasowa modyfikacja, obniżenie poziomu lub sekwestracja α-kateniny jest naturalną reakcją na uraz, może to wyjaśnić, dlaczego chroniczne rany, powodują, że pacjenci są podatni na raka.

Rola interakcji między oddziaływaniami międzykomórkowymi a integrynymi w homeostazie epidermy

Rozwój tkanki i jej późniejsza homeostaza zostają osiągnięte gdy komórki mogą prawidłowo integrować różnorodne sygnały środowiskowe z sąsiednich komórek, macierzy pozakomórkowej i czynników wzrostu (6). Potwierdza to fakt, że w wielu różnych organizmach i tkankach zaburzenie oddziaływań międzykomórkowych prowadzi do zmiany migracji komórek, proliferacji i przeżywalności (29). Zaburzenia te są również charakterystyczne przy nieprawidłowym wzroście tkanki, w tym zmianach nowotworowych o złym rokowaniu (30). Pokazaliśmy wcześniej, że niedobór α -kateniny w czasie rozwoju embrionalnego skóry wywołuje zmiany w morfologii tkanki, organizacji cytoszkieletu i słabej odporności mechanicznej skóry, którym towarzyszą zwiększona apoptoza w warstwie ponadpodstawnej, natomiast zmniejszona apoptoza i zwiększona proliferacja w warstwie podstawnej (20, 21 28, 31). Pytanie, które wyłoniło się w trakcie naszych badań brzmiało, jaki jest mechanizm, który leży u podstaw paradoksalnych powiązań między utratą α -kateniny, wzmocnioną apoptozą, zwiększoną proliferacją i migracją oraz zwiększoną podatnością na rozwój nowotworów.

Aby zbadać konsekwencje usunięcia α -kateniny w skórze używaliśmy poprzednio próbki skóry, gdzie α -katenina została usunięta specyficznym tylko w epidermie w dniu rozwoju embrionalnego E15.5. W tym dniu epiderma ma już kilka warstw i ustaliła oddziaływania międzykomórkowe oraz między komórkami a macierzą pozakomórkową. Jak oceniliśmy w tym systemie, oddziaływania komórka-komórka i organizacja cytoszkieletu wydawały się pozostawać w dużej części w nienaruszonym stanie z E-kadheryną nadal zlokalizowaną na granicach sąsiadujących komórek (20, 28, 31). W celu ulepszenia systemu i zbadania fenotypu przed ustaleniem kilkuwarstwowej epidermy użyto homozygotyczne zarodki w dniu rozwoju E9.5 myszy α -katenina flox (Ctnna1fl / fl), które transdukowano w macicy lentiwirusem kodującym rekombinazę Cre, dzięki czemu usuwano α -kateninę kiedy epiderma jest nadal jednowarstwowa (31). Technika ta pozwoliła zaobserwować uderzające różnice (6). W kontrolnym naskórku, zarówno komórki w warstwie podstawnej, jak i ponadpodstawnej, wykazywały kolokalizację E-kadheryny i F-aktyny. Natomiast w epidermie w knockoutach α -kateniny, E-kadheryna wykazywała znacznie mniej ciągłe i nieregularne rozmieszczenie w miejscach kontaktu międzykomórkowego (6). Ponadto komórki apoptotyczne, oznaczone przez barwienie na aktywną kaspazę-3, obserwowano głównie w warstwie ponadpodstawnej skóry z niedoborem α -kateniny. Odkrycia te sugerowały, że utrata α -kateniny w warstwie

ponadpodstawnej, w której komórki oddziałują tylko przez połączenia typu komórka-komórka powoduje apoptozę, podczas gdy utrata α -kateniny w warstwie podstawowej, w której komórki są połączone z macierzą zewnątrzkomórkową poprzez integryny pozwala na ich przeżycie (6). Aby zrozumieć, dlaczego komórki w warstwie podstawowej mają zwiększoną przeżywalność mimo utraty α -kateniny, skupiliśmy się na moich wcześniejszych obserwacjach, że oddziaływania z macierzą zewnątrzkomórkową (focal adhesion – FA) są w tym przypadku zwiększone. Aby potwierdzić tę hipotezę, najpierw wykonałam analizę immunoblot na lizatach białkowych z epidermy E15.5. Przeciwciała przeciwko aktywnym formom (fosforylowana tyrozyna) dwóch kluczowych składników FA, Fak (Y397) i Paxillin (Y31), wykazały zwiększoną aktywację (odpowiednio 170% i 195%) w knockoutach α -kateniny względem kontrolnej epidermy. Wykonałam także badanie ilości aktywnej formy GTPazy Rac, aby wykazać, że Rac1-GTP jest również podwyższony (6). Analiza *in vitro* potwierdziła również pogląd, że przy braku α -kateniny, FA i dynamika cytoszkieletu są podwyższone specyficznie w komórkach warstwy podstawowej, co skutkuje również zwiększoną migracją tych komórek. Ponieważ zaobserwowaliśmy wcześniej wzrost fosforylacji Pak, jak również wzrost fosforylacji Mek w epidermie knockoutów α -kateniny, sprawdziliśmy, czy ścieżka poprzez aktywowaną (fosforylowaną) Paxiline może rekrutować i aktywować Pak, znany efektor Rac1. Dodatkowe badania w hodowli sugerowały, że aktywowany Pak może fosforylować kinazę kinazy MAP, Mek (32), prowadząc do możliwej zbieżności pomiędzy aktywowaną sygnalizacją FA, Rac1 i MAPK. Znaczenie sygnalizacji Pak potwierdzono również za pomocą inhibitora 2,2'-dihydroksy-1,1'-dwaftyldylodisulfidu (IPA-3) (33). Aby bezpośrednio ocenić fizjologiczną rolę kluczowych białek FA w kontekście kontroli i epidermy pozbawionej α -kateniny, użyto shRNA Pak1 i Pak2 sklonowanych do wektora LV-Cre. W celu usunięcia Fak, wirus LV-Cre wstrzyknięto do macicy myszy z zarodkami α -katenina fl / fl; Fak fl / fl; RosaYfp. Pozwoliło to na odniesienie się do roli białek sygnałowych związanych z FA w epidermie pozbawionej α -kateniny.

Obniżenie ekspresji Pak2 i Fak przywróciło do normalnego poziomu migrację komórek pozbawionych α -kateniny nie wpływając negatywnie na komórki kontrolne. Te interakcje genetyczne sugerowały, że zwiększona sygnalizacja przez oś Fak i Pak może odpowiadać za zwiększoną migrację komórek bez α -kateniny. W celu sprawdzenia, czy zwiększona proliferacja w nieobecności α -kateniny zależy od sygnalizowania przez białka FA, badano ilość komórek mitotycznych (fosfohiston H3-dodatnich) w kontroli i epidermie pozbawionej α -kateniny oraz z obniżoną ekspresją Fak, Pak1 lub Pak2. Obniżenie ekspresji Fak, Pak1 lub Pak2

w epidermie kontrolnej nie miało wpływu na proliferację. W przeciwieństwie do tego, ich ablacja w epidermie pozbawionej α -kateniny znacznie zmniejszyła proliferację (6). Wyniki te wskazują na zwiększone powiązanie sygnalizacji FA oraz MAPK, gdy α -katenina jest nieobecna. Wyniki te zostały również potwierdzone *in vivo* (6). Wyniki te rzuciły nowe światło na mechanizmy leżące u podstaw paradoksalnych powiązań między utratą α -kateniny i wzmocnioną apoptozą, zwiększoną proliferacją i migracją oraz zwiększoną podatnością na progresję nowotworów.

α -katulina odgrywa ważną rolę w inwazji i metastazie raka płaskonabłonkowego

Rak płaskonabłonkowy obejmuje najczęstszy typ nowotworów nabłonka ludzkiego. Jeden z podtypów raka płaskonabłonkowego, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC) jest szczególnie agresywnym rakiem ze złym rokowaniem z powodu późnego rozpoznania i przerzutów do węzłów chłonnych. Zredukowana ilość E-kadheryny i α -kateniny są często markerami prognostycznymi związanymi ze złą prognozą kliniczną (34, 35). W moich poprzednich badaniach wykazałam, że warunkowa utrata α -kateniny z połączeń międzykomórkowych w epidermie doprowadziła do powstania fenotypu podobnego do SCC, któremu towarzyszyła zwiększona proliferacja i migracja komórek (28). Kiedy wykonałam analizę mikromacierzy porównując keratynocyty mysie bez α -kateniny, które nie zdołały utworzyć połączeń międzykomórkowych z keratynocytami kontrolnymi, zaobserwowałam zwiększoną ekspresję nowego homologu α -kateniny, zwanego α -katulina. Białko to nie zostało do tej pory dokładnie scharakteryzowane, ale, co ciekawe, wykazano, że oddziałuje bezpośrednio z Lbc-Rho GEF i wzmacnia sygnalizację GTPazy Rho, działając jako szkielet dla kompleksu sygnałowego GTPazy Rho (36-38). Wiesner i wsp., 2008 (39) opisali interakcję α -katuliny z IKK-b, podjednostką inhibitora kinazy NF κ -B i Lbc w celu pobudzenia migracji komórek nowotworowych i zwiększenia odporności na apoptozę. Ponadto okazało się, że α -katulina oddziałuje z dystrofiną w kompleksie dystrofilan-dystrofina-utrofina, gdzie dystroglikan pośredniczy w adhezji komórkowej ECM poprzez jego zakotwiczenie w cytoszkieletcie aktynowym i jego interakcjach z różnymi białkami pozakomórkowymi, w tym lamininą (40-43). Ponieważ α -katulina służy jako rusztowanie do sygnalizacji Rho i wykazuje strukturalne podobieństwo do vinkuliny i α -kateniny, szczególnie w regionie N-końcowym, który zawiera miejsca wiązania dla β -kateniny, taliny, α -aktyliny i cytoszkieletu aktynowego (1, 7), sugeruje to, że α -katulina może działać jako białko łącznikowe cytoszkieletu w celu

modulowania migracji komórek. Zdecydowałam się skupić na scharakteryzowaniu α -katuliny i jej roli w progresji nowotworów, ponieważ jej wzmocniona ekspresja korelowała z utratą z połączeń międzykomórkowych, α -kateniny i E-kadheryny. Większość eksperymentów opublikowanych w pracy pochodzącej z tych badań została wykonana przeze mnie wraz z nową doktorantką w mojej grupie, która miała niewielkie doświadczenie w pracy z myszami i próbkami ludzkich guzów. Początkowo potwierdziliśmy za pomocą RT-PCR, że w keratynocytach o zwiększonej migracji pozbawionych α -kateniny, następuje zwiększenie ekspresji α -katuliny. Ponieważ utrata α -kateniny z połączeń międzykomórkowych w ludzkich nowotworach koreluje z przejściem ze stanu epitelialnego do mezenchymalnego (epithelial mesenchymal transition, EMT) i zwiększoną inwazyjnością, chcieliśmy sprawdzić, czy dane uzyskane *in vitro* korelują z danymi *in vivo*. W tym celu opracowaliśmy model przerzutów (xenograft), w którym komórki USC-HN1, wysoce przerzutowe ludzkie komórki SCC (7), zostały wyznakowane przy użyciu green fluorescent protein - GFP. Następnie wysortowaliśmy czyste populacje komórek z guza pierwotnego oraz komórki inwazyjne z naczyń limfatycznych. Przy użyciu RT-PCR wykazaliśmy zwiększoną ekspresję α -katuliny w komórkach inwazyjnych (7). Potwierdziliśmy również, że zwiększona ekspresja α -katuliny koreluje z EMT w ludzkich liniach SCC, poprzez indukowanie ludzkich linii komórkowych jak SCC-15, które wykazują morfologię epitelialną czynnikami wzrostu, TGF- β , EGF i Wnt3a w celu przejścia przez proces EMT. Aby skorelować zmiany w ekspresji α -kateniny i α -katuliny *in vivo*, skorzystaliśmy z naszego modelu przerzutowego xenograft. Analiza tych nowotworów wykazała brak ekspresji α -katuliny w centrum guza, które jest bogate w połączenia międzykomórkowe i wykazuje wysoką ekspresję α -kateniny. Natomiast inwazyjny front nowotworu był wzbogacony w strumienie komórek przerzutowych z wysoką ekspresją α -katuliny i obniżoną ekspresją α -kateniny. Aby potwierdzić, że obserwacje dokonane w modelu mysim korelują z ludzkimi SCC, wykorzystaliśmy ludzkie próbki nowotworowe. W zestawie tkankowym składającym się z 6 próbek prawidłowej ludzkiej błony śluzowej jamy ustnej i 20 różnych ludzkich HNSCC, α -katulina wykazała niski poziom ekspresji w prawidłowym nabłonku błony śluzowej i chociaż ekspresja α -katuliny różniła się nieco poziomem i wzorem w ocenie złośliwości SCC, w 18 na 20 przypadków, była zlokalizowana głównie na froncie inwazyjnym guza (7). Zastosowaliśmy również opublikowany wcześniej mysim model SCC indukowany przez 4-nitrochinolino-tlenek (4NQO) (44) na wygenerowanej przeze mnie transgenicznej linii reporterowej α -katuliny z β -galaktozydazą, w której gen reporterowy β -galaktozydazy znajduje się pod kontrolą

endogenego promotora α -katuliny. Mysiom podawano 4NQO z wodą, związek łączący się z DNA, który służy jako surogat ekspozycji na tytoń, do indukowania SCC jamy ustnej. Nowotwory, które rozwinęły się przy użyciu tego systemu wykazały silną ekspresję endogennej α -katuliny w komórkach inwazyjnych. Podsumowując, dane te potwierdziły, że α -katulina jest specyficznie ekspresjonowana tylko w komórkach nowotworowych, które utraciły połączenia międzykomórkowe i stają się migracyjne w celu zaatakowania otaczającej je tkanki. Następnie skoncentrowaliśmy się na funkcji α -katuliny i usuwając ten gen wykazaliśmy, że odgrywa on ważną rolę w migracji i inwazji komórek nowotworowych *in vitro*. Ponieważ pokazaliśmy, że komórki hSCC z usuniętą α -katuliną mają obniżoną migrację i inwazję *in vitro*; chcieliśmy również sprawdzić, czy nasze obserwacje były istotne *in vivo*. Wykorzystaliśmy lentiwirusowe konstrukty shRNA, które zawierały także reporter turboGFP (stabilne linie GNS / G85) lub reporter turboRFP (indukowalne linie stabilne TNS / T84) do wizualizacji komórek transdukowanych dwoma niezależnymi shRNA na α -katulinę. Komórki kontrolne oraz z obniżoną ekspresją α -katuliny zostały wstrzyknięte pod skórę w okolice szyi myszy o obniżonej odporności. Guzy utworzone po 5-9 tygodniach zostały zebrane do analizy. Nowotwory powstałe z kontrolnych komórek i z obniżoną ekspresją α -katuliny były podobne pod względem wielkości, ale zaobserwowaliśmy dramatyczną różnicę w ilości nowych przerzutów w płucach. Dane te korelowały z naszymi danymi *in vitro*, gdzie ablacja α -katuliny w ludzkich komórkach nowotworowych powodowała zmniejszenie migracji i inwazji (7).

Aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób ablacja α -katuliny w nowotworach prowadzi do zmniejszonej zdolności do tworzenia przerzutów, przeanalizowaliśmy przesortowane czyste populacje nowotworowych komórek kontrolnych i z obniżoną ekspresją α -katuliny za pomocą mikromacierzy. Nowotwory z niedoborem α -katuliny, które nie były zdolne do tworzenia przerzutów wykazały spadek ekspresji integryn, w szczególności ITGA2, ITGA6 i ITGB1, a ponadto zmniejszenie liczby genów zaangażowanych w sygnalizację integryn, w tym ASAP1, BCAR1, PTK2, PIK3CA, PARVA, ACTR2, CTTN i LAMB1. Co ciekawe, wiele genów, które wykazało obniżoną ekspresję w nowotworach z niedoborem α -katuliny, była powiązana ze szlakiem sygnałowym Met / HGF. Do tych genów należą: MET, ELF1, ETS1, KRAS, MAP3K7, PIK3CA, PTGS2, PTK2 i PTPN11. Uprzednio pokazano, że przekazywanie sygnału HGF / Met przyczynia się do onkogenezy i progresji w kilku ludzkich typach nowotworów, a ponadto sprzyja agresywnej inwazyjności komórkowej, która jest silnie związana z przerzutami nowotworowymi (7, 45). Nasze wyniki wskazują, że α -katulina przyczynia się do inwazyjnego

zachowania przerzutowych komórek nowotworowych i może być stosowana jako marker prognostyczny i przyszły cel terapeutyczny dla pacjentów z rakiem.

Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych prac uważam:

1. Odkryłam, że formina-1 oddziałuje z α -kateniną i lokalizuje się w połączeniach międzykomórkowych, gdzie zapoczątkowuje *de novo* polimeryzację nierozgałęzionych filamentów aktyny, pozwalając na tworzenie nowych połączeń.
2. Pokazałam, że zakłócenie oddziaływania α -kateniny i forminy-1 blokuje tworzenie promieniowych kabli aktynowych i zaburza oddziaływania międzykomórkowe.
3. Wykazałam, że białko fuzyjne domeny wiążącej β -kateninę z α -kateniny z domenami polimeryzacji aktyny forminy-1 odtwarza tworzenie połączeń międzykomórkowych i związanych z nimi kabli aktynowych w keratynocytach pozbawionych α -kateniny.
4. Pokazałam, że usunięcie pojedynczego białka, α -kateniny z epidermy w czasie rozwoju powoduje przekształcenie się epidermy w tkankę o zwiększonej proliferacji i inwazji ze wzmożonym stanem zapalnym.
5. Ujawniłam poprzez profilowanie transkrypcyjne i analizy biochemiczne, że ablacji α -kateniny towarzyszy aktywacja NF κ B i jego prozapalnych genów docelowych, wraz z genami zaangażowanymi w proliferację, gojenie się ran, angiogenezę i przerzuty.
6. Pokazałam również, że redukcja α -kateniny, aktywacja NF κ B i zapalenie są częstymi cechami ludzkiego raka płaskonabłonkowego skóry.
7. Wykazałam, że ablacji α -kateniny w skórze towarzyszy zwiększona aktywacja dwóch kluczowych składników połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową, a mianowicie kinazy Fak i Paxiliny, a także zwiększonej aktywacji Rac1, co skutkuje zwiększoną przeżywalnością i

motoryką komórek pozbawionych α - kateniny, a które utrzymują przyczepność do macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez integryny.

8. Odkryłam, że homolog α -kateniny, α -katulina ma podwyższoną ekspresję po usunięciu α -kateniny i utracie połączeń międzykomórkowych i jest zlokalizowana w komórkach inwazyjnych na froncie nowotworu oraz w strumieniach komórek inwazyjnych zarówno w złośliwych ludzkich HNSCC jak i w mysim modelu SCC.

9. Pokazałam, że usunięcie α -katuliny w liniach komórkowych hHNSCC dramatycznie zmniejsza potencjał migracyjny i inwazyjny tych komórek *in vitro* i potencjał przerzutowy *in vivo*.

10. Wykazałam, że nowotwory z niedoborem α -katuliny nie są w stanie zaatakować otaczających tkanek a profilowanie transkrypcyjne tych nowotworów ujawniło, że ablacji α -katuliny towarzyszą zmiany w genach biorących udział w migracji i inwazji komórek. Ponadto podwyższenie ekspresji α -katuliny koreluje z przejściem komórek nowotworowych z morfologii epitelialnej do mezenchymalnej, a także zwiększeniem ekspresji markerów EMT vimentyny i Snail.

W trakcie mojej pracy głównie jako postdoc pokazałam, że α -katenina pełni ważną rolę nie tylko w łączeniu kompleksu E-kadheryna- β -katenina z cytoszkieletem aktynowym, ale także w koordynowaniu dynamiki aktyny a jej ekspresja odwrotnie koreluje połączenia międzykomórkowe z proliferacją. Pokazałam również, że inne białka z tej rodziny, jak α -katulina, mogą być zaangażowane w proces progresji guza. Wraz ze wzrostem liczby partnerów oddziałujących z α -kateniną nowe połączenia implikują jeszcze bardziej złożone funkcje regulacyjne dla tego białka. Odkrycia te dają nowy wgląd w to, w jaki sposób α -katenina organizuje dynamikę aktyny podczas tworzenia połączeń międzykomórkowych i jak jej utrata wpływa na homeostazę epidermy. Wykazałam również, że po utracie α -kateniny co powoduje rozerwanie połączeń międzykomórkowych następuje zwiększona ekspresja innego białka z tej rodziny, α -katuliny co przyczynia się do zachowań inwazyjnych komórek przerzutowych i może być stosowane jako marker prognostyczny i przyszły cel terapeutyczny u pacjentów z nowotworem płaskonabłonkowym.

B. Literatura

(Prace wchodzące w skład osiągnięcia zaznaczono pogrubionym drukiem.)

- 1. Kobielał A., Fuchs E. α -Catenin: At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5(8):614-625; 2004**
2. Perez-Moreno, M., Jamora, C. & Fuchs, E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell 112, 535-548 (2003).
3. Tepass, U. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. Bioessays 24, 690-695 (2002).
4. Yagi, T. & Takeichi, M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. Genes Dev. 14, 1169-1180 (2000).
- 5. Kobielał, A., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. Nat. Cell Biol. 6, 21-30 (2004).**
- 6. Livshits, G. Kobielał, A. Fuchs, E. Governing epidermal homeostasis by coupling cell-cell adhesion to integrin and growth factor signaling, proliferation, and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 27;109(13):4886-91**
- 7. Cao C., Chen Y., Masood R., Sinha U., Kobielał A. Catulin marks the invasive front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis. Molecular Cancer Research, 10(7):892-903; 2012**
8. Drubin, D. G. & Nelson, W. J. Origins of cell polarity. Cell 84, 335-344 (1996).
9. Gumbiner, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84, 345-357 (1996).

10. Orsulic, S. & Peifer, M. An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J. Cell Biol.* 134, 1283-1300 (1996).
11. Simske, J. S. et al. The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. *Nat. Cell Biol.* 5, 619-625 (2003).
12. Nagafuchi, A., Takeichi, M. & Tsukita, S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65, 849-857 (1991).
13. Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. & Takeichi, M. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 70, 293-301 (1992).
14. Claverie, J. M. et al. Characterization and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a protein related to the murine 102-kDa cadherin-associated protein (alpha-catenin). *Genomics* 15, 13-20 (1993).
15. Janssens, B. et al. alphaT-catenin: a novel tissue-specific beta-catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* 114, 3177-3188 (2001).
16. Zhang, J. S. et al. Identification and chromosomal localization of CTNNAL1, a novel protein homologous to alpha-catenin. *Genomics* 54, 149-154 (1998).
17. Park, B. et al. Association of Lbc Rho guanine nucleotide exchange factor with alpha-catenin-related protein, alpha-catulin/CTNNAL1, supports serum response factor activation. *J. Biol. Chem.* 277, 45361-45370 (2002).
18. Burridge, K. & Fath, K. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Bioessays* 10, 104-108 (1989).

19. Torres, M. et al. An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 901-906 (1997).
20. Vasioukhin, V., Bauer, C., Degenstein, L., Wise, B. & Fuchs, E. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell* 104, 605-617 (2001).
21. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-219 (2000).
22. Wallar, B. J. & Alberts, A. S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13, 435-446 (2003).
23. Shimoyama, Y. et al. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res.* 52, 5770-5774 (1992).
24. Ewing, C. M. et al. Chromosome-5 Suppresses Tumorigenicity of Pc3 Prostate-Cancer Cells - Correlation with Reexpression of Alpha-Catenin and Restoration of E-Cadherin Function. *Cancer Res.* 55, 4813-4817 (1995).
25. Morton, R. A., Ewing, C. M., Nagafuchi, A., Tsukita, S. & Isaacs, W. B. Reduction of E-cadherin levels and deletion of the alpha-catenin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 53, 3585-3590 (1993).
26. Kadowaki, T. et al. E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res.* 54, 291-296 (1994).
27. Bullions, L. C., Notterman, D. A., Chung, L. S. & Levine, A. J. Expression of wild-type alpha-catenin protein in cells with a mutant alpha-catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4501-4508 (1997).

- 28. Kobielał, A. Fuchs, E. Links between α -catenin, NF- κ B and Squamous Cell Carcinoma in skin. PNAS 103(7):2322-2327; 2006**
29. Halbleib, J.M. & Nelson, W.J. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20(23):3199-3214; 2006
30. Hajra, K.M. & Fearon, E.R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34(3):255-268; 2002
31. Beronja, S. Livshits, G. Williams, S. & Fuchs, E. Rapid functional dissection of genetic networks via tissue-specific transduction and RNAi in mouse embryos. *Nat Med* 16(7):821-827; 2010
32. Slack-Davis, J.K. et al. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* 162(2):281-291; 2003
33. Deacon, S.W. et al. An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem Biol* 15(4):322-331; 2008
34. Nelson, W.J. Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 303(5663):1483-7; 2004
35. Reya, T. Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 434(7035):843-50; 2005
36. Park, B. Nguyen, N.T. Dutt P, Merdek KD, Bashar M, Sterpetti P, et al. Association of Lbc Rho guanine nucleotide exchange factor with alpha-catenin-related protein, alpha-catenin/CTNNA1, supports serum response factor activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(47):45361-70; 2002

37. Liu, Y. Ren, W. Warburton, R. Toksoz, D. Fanburg, B.L. Serotonin induces Rho/ROCK-dependent activation of Smads 1/5/8 in pulmonary artery smooth muscle cells. *The FASEB Journal*. 23(7):2299-306; 2009
38. Bear, M.D. Li, M. Liu, Y. Giel-Moloney, M.A. Fanburg BL, Toksoz D. The Lbc Rho guanine nucleotide exchange factor alpha-catulin axis functions in serotonin-induced vascular smooth muscle cell mitogenesis and RhoA/ROCK activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(43):32919-26; 2010
39. Wiesner, C. Winsauer, G. Resch, U. Hoeth, M. Schmid, J.A. van Hengel, J. et al. Alpha-catulin, a Rho signalling component, can regulate NF-kappaB through binding to IKK-beta, and confers resistance to apoptosis. *Oncogene*. 27(15):2159-69; 2008
40. Abraham, L.S. Oh, H.J. Sancar, F. Richmond, J.E. Kim, H. An alpha-catulin homologue controls neuromuscular function through localization of the dystrophin complex and BK channels in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*. 6(8); 2010
41. Chen, B. Liu, P. Wang, S.J. Ge, Q. Zhan, H. Mohler, W.A. et al. alpha-Catulin CTN-1 is required for BK channel subcellular localization in *C. elegans* body-wall muscle cells. *The EMBO Journal*. 29(18):3184-95; 2010
42. Bozzi, M. Morlacchi, S. Bigotti, M.G. Sciandra F, Brancaccio A. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biology*. 28(4):179-87; 2009
43. Lyssand, J.S. Whiting, J.L. Lee, K.S. Kastl, R. Wacker, J.L. Bruchas, M.R. et al. Alpha-dystrobrevin-1 recruits alpha-catulin to the alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin-associated protein complex signalosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(50):21854-9; 2010
44. Czerninski, R. Amornphimoltham, P. Patel, V. Molinolo, A.A. Gutkind, J.S. Targeting mammalian target of rapamycin by rapamycin prevents tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2(1):27-36; 2009

45. Dong, G. Lee, T.L. Yeh, N.T. Geoghegan, J. Van Waes, C. Chen, Z. Metastatic squamous cell carcinoma cells that overexpress c-Met exhibit enhanced angiogenesis factor expression, scattering and metastasis in response to hepatocyte growth factor. *Oncogene*. 23(37):6199-208; 2004

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1 Dane bibliometryczne

Sumaryczny IF publikacji : **43.67**

Całkowita liczba cytowań: (Sum of times cited wg bazy ISI Web of Knowledge): **216**

Index Hirscha (wg bazy ISI Web of Knowledge): **10**

5.2 Lista publikacji niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Shen J., Ha DP., Zhu G., Rangel DF., **Kobielałak A.**, Gill PS., Groshen S., Dubeau L., Lee AS., GRP78 haploinsufficiency suppresses acinar-to-ductal metaplasia, signaling, and mutant *Kras*-driven pancreatic tumorigenesis in mice. *PNAS*, May 16;114(20) 4020-4029, 2017
2. Hong M., Jung E., Yang S., Jung W., Seong YJ., Park E., Bramos A., Kim KE., Lee S., Daghliah G., Seo JI., Choi I., Choi IS., Koh CJ., **Kobielałak A.**, Ying QL., Johnson M., Gardner D., Wong AK., Choi D., Hong YK., Efficient Assessment of Developmental, Surgical and Pathological Lymphangiogenesis Using a Lymphatic Reporter Mouse and Its Embryonic Stem Cells. *PLoS One*, Jun 9;11(6) 2016
3. Boddupally K., Chen Y., **Kobielałak A.***. Lgr5 marks neural crest derived multipotent oral stromal stem cells. *Stem Cells*, Mar;34(3):720-31, 2016
4. **Kobielałak A.*** and Boddupally K. Junctions and inflammation in the skin. *Cell Comm. and Adhesion*, 21(3):141-7; 2014

5. Zhang H., Boddupally K., Kandyba E., Kobielałak K., Chen Y., Zu S., Krishnan R., Sinha U., **Kobielałak A.*** Defining the slow cycling stem cells of minor salivary glands: role in gland regeneration and tumor formation. *Stem Cells*. 32(8):2267-77; 2014
6. Kandyba E, Hazen V, **Kobielałak A**, Butler J.S, Kobielałak K. Smad1&5 but not Smad8 establish stem cell quiescence which is critical to transform the premature hair follicle during morphogenesis towards the postnatal state. *Stem Cells*. 32(2):534-47; 2014
7. Masood R, Hochstim C, Cervenka B, Zu S, Baniwal SK, Patel V, **Kobielałak A**, Sinha UK. A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer and lymph node metastasis. *Oncogenesis*, 9;2:e68; 2013
8. Mostowska A., **Kobielałak A.**, Biedziak B., Trzeciak W.H. Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci*. 111(3):272-276; 2003
9. Mostowska A., **Kobielałak A.**, Trzeciak W.H. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci*. 111(5):365-370; 2003
10. **Kobielałak A.**, Kobielałak K., Biedziak B., Trzeciak WH., A novel mutation A1270G of the EDA1 gene causing Tyr343Cys substitution in ectodysplasin-A in a family with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Acta Biochim Pol*. 50(1):255-258; 2003
11. Wisniewski SA, **Kobielałak A**, Trzeciak WH, Kobielałak K. Recent advances in understanding of the molecular basis of anhidrotic ectodermal dysplasia: discovery of a ligand, ectodysplasin A and its two receptors. *J Appl Genet* 43(1):97-107; 2002
12. **Kobielałak A.**, Kobielałak K., Trzeciak WH., A novel isoform of human lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF-1) gene transcript encodes a protein devoid of HMG domain and nuclear localization signal. *Acta Biochim Pol*. 48(1):221-226; 2001

13. **Kobielałak A.**, Kobielałak K., Wisniewski S.A., Midro A.T., Trzeciak W.H. Sequence polymorphisms of the EDA and the DL genes in the patients with an X-linked and an autosomal forms of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):113-114; 2001
14. **Kobielałak A.**, Kobielałak K., Wisniewski AS, Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH. The novel polymorphic variants within the paired box of the PAX9 gene are associated with selective tooth agenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):111-112; 2001
15. Kobielałak K., **Kobielałak A.**, Roszkiewicz J., Wierzba J., Limon J., Trzeciak W.H. Mutations in the *EDA* gene in three unrelated families reveal no apparent correlation between phenotype and genotype in the patients with an X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.* 100(3):191-197; 2001
16. Kobielałak K., **Kobielałak A.**, Roszkiewicz J., Limon J., Trzeciak W.H. Recurrent deletion of the region encoding two (Gly-X-Y) repeats in patients with anhidrotic ectodermal dysplasia indicates an important role for collagen-like domain of the *EDA* gene product - ectodysplasin A. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*; 19(6):425-432; 2000
17. Kobielałak K., **Kobielałak A.**, Trzeciak W.H. Novel isoforms of transcript of the EDA gene confirm X-linked inheritance of anhidrotic ectodermal dysplasia. *J. Appl. Genet.* 40:355-364; 1999
18. Kobielałak K., **Kobielałak A.**, Trzeciak W.H. Cloning of lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1) from rat kidney: homology to the mouse sequence *Acta Biochem. Polon* 46:885-888; 1999
19. Kobielałak K., **Kobielałak A.**, Limon J., Trzeciak W.H. Mutation in the regulatory region of the EDA gene coincides with the symptoms of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Acta Biochem. Polon.* 45:245-250; 1998

20. Łakomski J., Kobielał K., **Kobielał A.**, Trzeciak W.H. Correcting facial dismorphism in a patient with anhidrotic ectodermal dysplasia: a clinical report. J Prosthet Dent 80:524-526; 1998
21. Kobielał K., **Kobielał A.**, Trzeciak W.H. Is the recently discovered EDA gene associated with anhidrotic ectodermal dysplasia? J. Appl. Genet. 38:343-357; 1997

* autor korespondencyjny

5.3 Krótkie streszczenie osiągnięć naukowych niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Podstawy molekularne niedorozwoju zębów, nie syndromowe i związane z anhidrotyczną dysplazją ektodermalną.

Podczas moich studiów magisterskich i doktoranckich skupiłam się na badaniu molekularnych podstaw rozwoju przydatków skórnych, takich jak zęby, włosy i gruczoły potowe. Oligodoncja, rzadkie owłosienie i niedobór ekrynowych gruczołów potowych to cechy charakterystyczne dla fenotypu pacjentów z anhidrotyczną dysplazją ektodermalną (EDA). Zespół ten jest spowodowany przez mutacje w genach EDA lub DL, kodujących ligandy TNF i receptory TNF, zaangażowane w komunikację między komórkami podczas rozwoju embrionalnego. Badałam zarówno regiony kodujące, jak i niekodujące genu EDA i DL u pacjentów wykazujących kliniczne objawy dysplazji ektodermalnej. Udało mi się scharakteryzować nowe mutacje, które korelują z objawami EDA (prace nr 10, 11, 13, 15-21). Skoncentrowałam się także na badaniu dwóch genów MSX1 i PAX9, które kodują czynniki transkrypcyjne i były związane z selektywną agenezją zębów. Analizę mutacyjną tych dwóch genów przeprowadzono u 25 osób z rodzinną lub sporadyczną postacią trwałej agenezji zębów. Analiza konformacji jednoniciowego DNA nie ujawniła mutacji w całej sekwencji kodującej genu MSX1. Natomiast w genie PAX9 wykryto nową, heterozygotyczną transformację G151A w sekwencji kodującej sparowaną domenę białka PAX9 u pacjenta z niedorozwojem trzecich zębów trzonowych, drugiego przedtrzonowca i siekaczy. Ponadto w naszej grupie pacjentów z niedoborem różnych zębów u 20% pacjentów i ich krewnych analiza sekwencji wykazała przejście C -> T w sekwencji kodującej genu PAX9 (prace nr 8, 9, 14) . Na

podstawie tych wyników, stwierdziliśmy, że mutacje w genie PAX9 mogą być odpowiedzialne za sporadyczną formę agenezji zębów.

2. Charakterystyka normalnych i nowotworowych komórek macierzystych z nabłonka jamy ustnej oraz metastaza.

Od momentu rozpoczęcia mojego niezależnego programu badawczego w 2007 roku w Norris Cancer Center ustanowiłam program badawczy koncentrujący się na biologii normalnych i nowotworowych komórek macierzystych z nabłonka jamy ustnej i przerzutach raka jamy ustnej.

A. Model myszy z rakiem głowy i szyi

Współpracowałam z dr. Masoodem z University of Southern California, aby opracować model ortotopowy raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC). Model ten wykorzystano do przeprowadzenia przy użyciu mikromacierzy analizy porównawczej ekspresji genów między populacjami linii komórkowych HNSCC pochodzących sprzed i po seryjnej transplantacji oraz przerzutami *in vivo* u myszy (praca nr 7). Za pomocą tego systemu zidentyfikowaliśmy nadekspresję genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym i tworzeniem się komórek macierzystych raka. Moją rolą w projekcie była pomoc w analizie immunofluorescencyjnej próbek nowotworów.

B. Charakterystyka wolno dzielących się komórek macierzystych jamy ustnej.

W moim nowo powstałym laboratorium skupiałam się na izolacji i charakteryzowaniu dorosłych komórek macierzystych (SC) z jamy ustnej, które są ważne dla utrzymania homeostazy tkanek. Istnienie dorosłych komórek macierzystych w jamie ustnej było w dużej mierze niezbadane. Okazało się, że niektóre tkanki nabłonka zawierają komórki macierzyste (SC), które są stosunkowo wolno dzielącymi się komórkami, z których każda dzieli się rzadko i powoduje powstanie kolejnej wolno dzielącej się komórki potomnej i szybko proliferującej, przejściowej komórki potomnej. W tym przypadku zastosowaliśmy metodę wykrywania komórek wolno dzielących się aby wyizolować i scharakteryzować komórki macierzyste nabłonka języka i gruczołów ślinowych. W przypadku mniejszych gruczołów ślinowych ta strategia pozwoliła nam zidentyfikować komórki macierzyste, które preferencyjnie lokalizują się w podstawnej warstwie dolnego kanału wydzielniczego oraz w mniejszym stopniu w części wydzielniczej.

Powtórne wszczepienie wyizolowanych z gruczołów ślinowych komórek macierzystych dowiodło ich potencjał do różnicowania w dwie linie potomne, pozytywne na keratynę 5 (marker w warstwie podstawnej) i na keratynę 8 (marker w warstwie luminalnej). Analiza transkrypcyjna wykazała aktywację genów zależnych od TGF β 1 w komórkach macierzystych a genów związanych z sygnalizacją przez BMP w komórkach potomnych, bardziej zróżnicowanych. Dostarczyliśmy również dowody, że komórki macierzyste z małych gruczołów ślinowych są wrażliwe na tytoń wywołujący nowotwory. Nasze badania pokazały po raz pierwszy istnienie komórek macierzystych w małych gruczołach ślinowych i podkreślają rolę szlaku TGF β w ich utrzymaniu (praca nr 5).

C. Lgr5 wyznakowuje populację komórek macierzystych zrębu języka o cechach charakterystycznych dla grzebienia nerwowego

Chociaż skóra i błony śluzowe jamy ustnej mają podobny charakter, błona śluzowa jamy ustnej wykazuje szybsze gojenie się ran i brak blizn a także bardziej agresywny postęp nowotworów nabłonka. Wiemy, że zrąb tkanki w jamie ustnej częściowo pochodzi z grzebienia nerwowego, jednak nie wiemy w jaki sposób to specyficzne środowisko wpływa na gojenie się ran i zwiększoną agresywność nowotworów jamy ustnej. W tym projekcie odkryliśmy, że komórki pozytywne na Lgr5 stanowią komórki macierzyste zrębu języka i śluzówki jamy ustnej. Pokazaliśmy, że komórki te to komórki macierzyste, które wykazują właściwości zarodkowych komórek macierzystych grzebienia nerwowego (NCSC), w tym wzrost klonalny i różnicowanie multipotencjalne do linii mięśni gładkich, neuronalnych i osteogennych. Po wyznakowaniu komórki te utrzymują się przez ponad rok w języku i błonie śluzowej policzka i dają początek innym komórkom potomnym. W doświadczeniach *in vivo* wykazaliśmy, że komórki te uczestniczą w gojeniu się ran. Nasze badania podkreślają obecność aktywnie odnawiających się komórek macierzystych w zrębie tkanki jamy ustnej, które mogą tworzyć unikalną niszę dla macierzystych komórek epitelialnych (praca nr 3)

D. Mysi model znakowania naczyń limfatycznych

Brałam również udział w projekcie grupy Dr. Hong, aby opracować i scharakteryzować linię myszy reporterowych dla naczyń limfatycznych, aby znacząco poprawić obrazowanie naczyń limfatycznych. Moja rola w projekcie polegała na pomocy w pozyskiwaniu embrionalnych

komórek macierzystych z tej linii reporterowej, która następnie została zróżnicowana w naczynia limfatyczne (praca nr 2)

E. Kras i GRP78 w raku trzustki

Dostarczyłam onkogennego modelu myszy Kras i uczestniczyłam w interpretacji danych dla projektu grupy Dr. Lee. Badania te pozwoliły ustalić kluczową rolę białka GRP78 w rozwoju raka trzustki wywołanej przez Kras oraz wykazać uprzednio niezidentyfikowany wymóg GRP78 w trans-różnicowaniu komórek wydzielniczych do komórek przewodów wydzielniczych, procesu uważanego za prekursor neoplazji trzustki. Wykazano również, że proliferacja i podwyższenie szlaków sygnałowych EGFR i szlaków onkogennych obserwowanych u myszy PKC zostały również zahamowane przez usunięcie kopii GRP78. Badania te wskazują na GRP78 jako cel terapeutyczny w zwalczaniu nowotworów trzustki ze zmutowanym KRAS (praca nr 1).

5.4 Kierowanie i udział w projektach naukowych

Charakter udziału w projekcie	Tytuł projektu	Nr projektu	Źródła finansowania	Wysokość finansowania	Miejsce realizacji	Lata
Kierownik grantu	Rola katuliny w regulacji oddziaływań między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową w procesie inwazji i metastazy w nowotworach płaskonabłonkowych głowy i szyi. Role of catulin in the regulation of cell-extracellular matrix interactions in tumor invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma.	2017/25/B/NZ5/01597	OPUS, Narodowe Centrum Nauki	1 974 000,00 PLN	CeNT, Uniwersytet Warszawski	2018-2021
Kierownik grantu	Badanie heterogenności i plastyczności macierzystych komórek rakowych i ich roli w progresji nowotworów głowy i szyi. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity and its role in the progression of oral cancer.	2014/13/B/NZ3/00909	OPUS, Narodowe Centrum Nauki	1 525 600 PLN	CeNT, Uniwersytet Warszawski	2016-2019
Kierownik grantu	Characterization of biomarkers of invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.		Kure It Foundation USA	75,000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2014-2015

Kierownik grantu	Isolation and characterization of the normal and cancer stem cells of the tongue.	R21 DE021522 -01	US National Institutes of Health	250 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2011-2013
Kierownik grantu	Characterization of slow-cycling squamous cell carcinoma cells.		Margaret Early Medical Research Trust	75 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2010-2011
Kierownik grantu	Characterization of epithelial and stromal compartments during different stages of oral cavity squamous cell cancer progression.		STOP CANCER	150 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2009-2010
Kierownik grantu	Isolation and characterization of normal and cancer oral epithelium stem cells as a target for future oral epithelium squamous cell carcinoma treatment.		Wright Foundation	100 000 USD	University of Southern California, Los Angeles	2008-2009

5.5 Udział i w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Byłam współautorem doniesień zjazdowych na następujących konferencjach:

Oral presentations:

1. A. Kobielał, 2017, "Invasion and cancer cell plasticity." Summer School SMM, CeNT, Warsaw, Poland
2. A. Kobielał, 2016, "Epitelialne komórki macierzyste i ich nisza - rola w homeostazie i nowotworzeniu." Department of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland
3. A. Kobielał, 2016, "Oral cavity stem cells - their role in normal homeostasis and tumor progression." Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland,
4. A. Kobielał, 2015, "Genetic alteration and cancer initiating potential of invasive cells from head and neck squamous cell carcinoma." Factor meeting, Norris Cancer center, USC, Los Angeles, USA
5. A. Kobielał, 2014, "Oral epithelial stem cells in tissue maintenance, regeneration and cancer." Holland Regenerative Medicine Program, University of Nebraska Medical Center, Nebraska, USA
6. K. Boddupally, A. Kobielał, 2012, "Identification and Characterization of Normal Tissue Stem Cells and Cancer Stem Cells in the Oral Cavity." 5th Annual USC Stem Cell and Developmental Biology Retreat, Irvine, USA

7. A. Kobielał, 2010, "Switch between α -catenin family members during mouse development and tumor invasion, NIH, NIDCR Bethesda, USA
8. C. Cao, A. Kobielał, 2010, "Catulin, an α -catenin family member, is required for cell migration during normal development and tumor progression, 3rd Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Lake Arrowhead, USA
9. A. Kobielał, 2007, "Cross-Talk Between Cancer Cells and Microenvironment During Tumor Metastasis." 3rd International Head and Neck Cancer Symposium, Los Angeles, USA
10. A. Kobielał, 2006, "Links between α -catenin, NF- κ B and Squamous Cell Carcinoma in skin, Tri-Institutional Seminar series, Rockefeller University, New York, USA
11. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. A. Kobielał, Institute of Cell Biology ETH, Zurich, Switzerland 2006
12. A. Kobielał, 2005, "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics." International Annual Symposium, Warsaw, Poland, IIMCB within the „Centre of Excellence in Molecular Bio-Medicine” project
13. A. Kobielał, 2005, "Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics." Symposium "Molecular Cell and Developmental Biology" Max Plank Institute, Dresden, Germany

Poster Presentation:

1. Hongjun Zhang, Keerthi Boddupally, Eve Kandyba, Krzysztof Kobielał, Yibu Chen, Sutao Zu, Rashi Krishnan, Uttam Sinha and Agnieszka Kobielał Identification of slow cycling stem cells of minor salivary glands: role in gland regeneration and tumor formation. AHNS, New York, 2014
2. Christine Cao, Yibu Chen, Uttam Sinha and Agnieszka Kobielał Characterization of highly plastic cancer initiating cells of oral squamous cell carcinoma by self-renewal gene tracking strategy. AHNS, New York, 2014
3. Christine Cao, Yibu Chen, Uttam Sinha and Agnieszka Kobielał Molecular characterization and cancer initiating potential of small population of invasive oral squamous cell carcinoma cells. AHNS, New York, 2014

4. Kandyba E, Hazan V, Kobielał A, Butler S, Kobielał K. Postnatal hair follicle differentiation but not stem cell quiescence can be maintained by Smad8 alone after Smad1 and Smad5 ablation. International Investigative Dermatology 2013 (IID), Edinburgh, UK 2013. Printed in The Journal of Investigative Dermatology Vol.1, Suppl.1 Abstract 1443, S245
5. Kandyba E, Hazan V, Kobielał A, Butler S, Kobielał K. Postnatal hair follicle differentiation but not stem cell quiescence can be maintained by Smad8 alone after Smad1 and Smad5 ablation. 16th Annual Pathology Conference, Pathology Department, the University of Southern California, Long Beach, California USA 2013
6. Boddupally K., Kobielał A., Stroma of Oral Epithelium Contains Lgr5 Positive Neural Crest Stem Cells. Developmental Biology Retreat, Palm Beach, CA 2013
7. Zhang H., Boddupally K., Kobielał K., Chen Y., Zu S., Krishnan R., Sinha U., and Kobielał A., Identification of Slow Cycling Stem Cells in Minor Salivary Glands: Role in Gland Regeneration and Tumor Formation 6th Annual USC Stem Cell and Developmental Biology Retreat
8. Cao C., Chen Y., Masood R., Sinha U., Kobielał A. New role for α -catenin family member α -catulin in squamous cell carcinoma invasion and metastasis, AACR Special Conference on Tumor Invasion and Metastasis, San Diego CA, 2013
9. Christine Cao, Yibu Chen, Rizwan Masood, Uttam K. Sinha and Agnieszka Kobielał. α -catulin – new marker of invasion in squamous cell carcinoma. The 61th annual Montagna Symposium on the Biology of the Skin, Oregon, USA, 2012
10. Christine Cao and Agnieszka Kobielał. Role of α -catulin in actomyosin dynamics during early mouse development, The 61th annual Montagna Symposium on the Biology of the Skin, Oregon, USA, 2012
11. Christine Cao, Yibu Chen, Rizwan Masood, Uttam K. Sinha and Agnieszka Kobielał. α -catulin marks the invasion front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis. 5th Annual USC Stem Cell and Developmental Biology Retreat, Irvine CA 2012
12. Christine Cao and Agnieszka Kobielał. Role of α -catulin in actomyosin dynamics during early mouse development, 5th Annual USC Stem Cell and Developmental Biology Retreat, Irvine CA 2012

13. Christine Cao and Agnieszka Kobielałak. Catulin plays important role in cell migration during early mouse development. Annual Retreat Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lake Arrowhead, CA 2012
14. Christine Cao, Yi-Bu Chen, Hongjun Zhang and Agnieszka Kobielałak. Catulin marks the invasive front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis, Annual Retreat Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lake Arrowhead, CA 2012
15. Hongjun Zhang and Agnieszka Kobielałak. Tumor suppressor function of the stem cell niche in squamous cell carcinoma development. Annual Retreat Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lake Arrowhead, CA 2012
16. Keerthi Boddupally, Hongjun Zhang and Agnieszka Kobielałak. Characterization of the label retaining cells in oral cavity epithelium. Annual Retreat Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lake Arrowhead, CA 2012
17. Christine Cao, Yi-Bu Chen, Hongjun Zhang and Agnieszka Kobielałak. The Role of alpha-Catenin Homologue Catulin During Development and Tumor Progression, Annual Retreat Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lake Arrowhead, CA 2011
18. Yucheng Xu, Tong Xu, Christine Cao, Agnieszka Kobielałak, Amir Goldkorn. Microfilter capture of live circulating tumor cells from the blood of mice bearing tumor xenografts: A new model for the study of cancer dissemination, 102nd Annual Meeting AACR, Orlando, FL
19. Zhang H., Cao C., Chen Y., Masood R., Sinha U., Kobielałak A. Squamous cell carcinoma of the skin originates from hair follicle stem cells and contains drug resistant cancer initiating cells. 3rd Annual Conference for Stem Cell and Developmental Biology, Lake Arrowhead, California USA 2010,
20. The Role of α -Catenin Homologue Catulin During Development and Tumor Progression. Christine Cao, Yi-Bu Chen, Hongjun Zhang, Rizwan Masood, Uttam Sinha and Agnieszka Kobielałak. 5th International Head and Neck Symposium 2010, Los Angeles, CA
21. Isolation and characterization of the normal and cancer stem cells of the tongue. Hongjun Zhang, Christine Cao, Yi-Bu Chen, Rizwan Masood, Uttam Sinha and

- Agnieszka Kobielałak. 5th International Head and Neck Symposium 2010, Los Angeles, CA
22. The Role of α -Catenin Homologue α - Catulin During Mouse Development. Christine Cao, Yi-Bu Chen, Hongjun Zhang and Agnieszka Kobielałak. AACR 101st Annual Meeting 2010, Washington, DC
 23. Microarray analysis of alpha-catenin deficient skin keratinocytes. Annual Meeting of Cell Biology, Michigan, USA 2001
 24. The influence of the transcription factor LEF-1 on the expression of the EDA gene. FEBS, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK 2000
 25. The role of the MSX1 gene in the formation of tooth buds. FEBS, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK 2000
 26. Expression of a Novel Transcript Isoform of the EDA Gene in Human Umbilical Cord. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Geneva, Switzerland 1999, European Journal of Human Genetics 7, 104
 27. Mutation in the 3'NCF might results decreased stability of mRNA coding for human homeodomain protein MSX1. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Geneva, Switzerland 1999, European Journal of Human Genetics 7, 104
 28. Demonstration of a novel transcript isoform of the EDA gene in human umbilical cord. FEBS 26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies Nice, France 1999, Biochimie (supplement) 6:334
 29. The influence of mutation in the 3'UTR of the MSX1 gene on selective tooth agenesis. FEBS 26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies Nice, France 1999, Biochimie (supplement) 6:168
 30. Mutation in the regulatory region of the EDA gene coincides with the symptoms of anhidrotic ectodermal dysplasia. 30th Annual Meeting of the European Society of Human Genetics, Lisboa, Portugal 1998, European Journal of Human Genetics 6, 159

