

Załącznik 2
Autoreferat w języku polskim

Autoreferat

dr Hanna Romańska-Knight

Zakład Patologii
Katedra Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2015

Skróty użyte w tekście:

AI (ang. *Androgen Independence*) – hormono–niezależność

AIPC (ang. *Androgen Independent Prostate Cancer*) – hormono-niezależny rak prostaty

AR (ang. *Androgen Receptor; AR*) – receptor androgenowy

BCa (ang. *Breast Cancer*) – rak piersi

CSC (ang. *Cancer Stem Cell*) – rakowa komórka macierzysta

DCIS (ang. *Ductal Carcinoma In Situ*) – nieinwazyjny przewodowy rak piersi *in situ*

ES (ang. *Embryonic Stem*) [cell] – embrionalna macierzysta [komórka]

IDC (ang. *Invasive Ductal Carcinoma*) – inwazyjny przewodowy rak piersi

ILC (ang. *Invasive Lobular Carcinoma*) – inwazyjny zrazikowy rak piersi

OSCC (ang. *Oral Squamous Cell Carcinoma*) – płaskonabłonkowy rak głowy i szyi

PC (ang. *Prostate Cancer*) – rak prostaty

Tspan (ang. *Tetraspanin*) – tetraspanina

TEM (ang. *Tetraspanin-Enriched Microdomain*) - mikrodomeny bogate w tetraspaniny

1. Imię i nazwisko: Hanna Maria Romańska-Knight

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1997 - doktor nauk medycznych (*PhD in Pathology, Imperial College London*), tytuł rozprawy doktorskiej: '*Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) in the Differentiation of the Neuromuscular System of the Human Gut*';

1985 - dyplom lekarza, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach;

1978 - magister Fizyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach, tytuł pracy magisterskiej: „Zastosowanie efektu Mössbauera w badaniu tekstury metali”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

14.12.2014 do chwili obecnej - **Starszy Specjalista ds. Naukowo-Technicznych**, Zakład Patologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

01.10.2012 - 13.12.2014 - **Starszy Specjalista Naukowo-Techniczny**, Zakład Patologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

01.02.2011 - 30.09.2012 - **Starszy Specjalista Naukowo-Techniczny**, Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

2009 – 2010 - **Postdoctoral Research Fellow**, School of Cancer Studies, University of Birmingham, UK;

2005 – 2009 - **Non-clinical Lecturer**, Department of Pathology, University of Birmingham, UK;

2002 - 2005 - **Postdoctoral Research Fellow**, Department of Histopathology, Imperial College London, UK;

1999 – 2002 - **Postdoctoral Research Fellow**, Tissue Engineering & Regenerative Medicine Centre, Imperial College London, UK;

1992 – 1999 - **Research Officer**, Department of Histochemistry, Imperial College London, UK;

1990 – 1992 - **Research Assistant**, Institute of Child Health, University of London, UK;

1985 – 1989 – **Asystent**, Klinika Chirurgii Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej w Bytomiu;

1978 – 1979 - **Asystent**, Wydział Elektryczny, Politechnika Śląska w Gliwicach.

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.)

Osiągnięcie naukowe wynikające 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 stanowi cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji dotyczących znaczenia klinicznego kompleksu białkowego CD151/integryna $\alpha 3\beta 1$ w nowotworach nabłonkowych. Cykl zawiera 4 prace oryginalne i 1 przeglądową. Prace te zostały opublikowane w latach 2011-2015. Sumaryczna wartość współczynnika IF (z roku publikacji) prac składających się na osiągnięcie wynosi **24,533** a łączna liczba punktów MNiSW wynosi **180**.

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

**Ocena znaczenia klinicznego kompleksu tetraspanina CD151/integryna $\alpha 3\beta 1$
w nowotworach nabłonkowych**

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autorzy, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania):

4.1. Romanska H[#], Berditchevski F. **Tetraspanins in Human Epithelial Malignancies**. J Pathol 2011; 223:4-14. IF (2015) = 7,429; MNiSW (2014) = 45

4.2. Romanska HM[#], Potemski P, Collins SI, Williams H, Parmar S, Berditchevski F. **Loss of CD151/Tspan24 from the complex with integrin $\alpha 3\beta 1$ in invasive front of the tumour is a negative predictor of disease-free survival in oral squamous cell carcinoma**. Oral Oncol. 2013; 49(3):224-9. IF (2015) = 3,607; MNiSW (2014) = 35

4.3. Novitskaya V*, Romanska H*, Kordek R, Potemski P, Kusinska R, Parsons M, Odintsova E, Berditchevski F. **Integrin $\alpha 3\beta 1$ -CD151 complex regulates dimerization of ErbB2 via RhoA**. Oncogene. 2014; 33(21):2779-89. (*equal contribution). IF (2015) = 8,459; MNiSW (2014) = 40

4.4. Romanska HM[#], Potemski P, Kusinska R, Kopczynski J, Sadej R, Kordek R. **Expression of CD151/Tspan24 and integrin alpha3 complex in aid of prognostication of HER2-negative high-grade ductal carcinoma in situ**. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8:9471-9478. IF (2015) = 2,168; MNiSW (2014) = 25

4.5. Romanska H[#], Potemski P, Krakowska M, Mieszkowska M, Chaudhri S, Kordek R, Kubiak R, Speirs V, Hanby V, Sadej R, Berditchevski F. **Lack of CD151/integrin $\alpha 3\beta 1$ complex is predictive of poor outcome in node-negative lobular breast carcinoma: opposing roles of CD151 in invasive lobular and ductal breast cancers**. Br J Cancer. 2015; 113:1350-7. IF (2015) = 4,836; MNiSW (2014) = 35

- autor korespondencyjny

Sumaryczny IF (z roku publikacji) wszystkich prac cyklu: **24,533** (publikacje oryginalne: IF = **18,215**, praca przeglądowa: IF = **6,318**)

Łączna liczba punktów MNiSW (z roku publikacji): **180** (publikacje oryginalne: MNiSW = **135**; praca przeglądowa: MNiSW = **45**)

Łączna liczba cytowań: 34 (09.12.2015)

Analiza bibliograficzna została przygotowana w oparciu o bazę Web of knowledge (dane z dnia 09.12.2015)

Oświadczenia współautorów publikacji określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załączniku 7. Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonania prac oraz procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku 4.

W pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji 4 projektów badawczych:

- a) Cancer Research UK (C1322/A5705) (University of Birmingham, UK, 2003 -2006): "CD151 in breast cancer progression"
- b) The University Hospital Birmingham Charities' Fund No14-3-150 (University of Birmingham, UK, 2009-2010): "The role of tetraspanins in pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma"
- c) OPUS - NCN (Nr rej 2011/01/B/NZ4/04910) (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2011-2014): „Rola oddziaływań pomiędzy ErbB2/ErbB3 i kompleksem tetraspanina CD151/integriny wiążące lamininę w raku sutka: Implikacje dla prognozowania i terapii”
- d) OPUS - NCN (2013/09/B/NZ4/02512) (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2013-2016): „Analiza profilu morfologicznego i molekularnego cech inwazyjności raków przewodowych in situ (DCIS) - znaczenie prognostyczne”

W ww. projektach pełniłam rolę: (a) wykonawcy; (b) głównego wykonawcy; (c) głównego wykonawcy i redaktora wniosku; (d) kierownika projektu.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Tetraspanina CD151. CD151 (GP27, MER2, PETA-3, SFA-3, Tspan-24) jest białkiem o masie 28 kDa, kodowanym u człowieka przez gen zlokalizowany na chromosomie 11p15.5 (1). CD151 należy do tetraspanin (Tspans), rodziny ewolucyjnie konserwowanych białek charakteryzujących się obecnością czterech motywów przezbłonowych oraz dwóch domen zewnątrzkomórkowych EC1 i EC2. W błonie komórkowej tetraspaniny tworzą specyficzne mikrodomeny (*TEMs - Tetraspanin Enriched Microdomains*), w obrębie których wchodzi w interakcje homotypowe z innymi tetraspaninami i heterotypowe z receptorami i białkami powierzchniowymi (2). W ludzkim genomie zidentyfikowano dotychczas 33 tetraspaniny o zróżnicowanej specyficzności tkankowej. Tetraspaniny biorą udział w licznych procesach komórkowych, zarówno w fizjologii jak i patofizjologii, który przypisywany jest ich wpływowi na aktywność zlokalizowanych w TEM receptorów adhezyjnych, czynników wzrostu i inicjowanych przez nie ścieżek sygnalizacyjnych. Tetraspaniny ekspresowane są prawie we wszystkich typach komórek zwierzęcych (3,4). Ekspresję CD151 wykazano między innymi w komórkach epitelialnych, endotelialnych, miocytach, fibroblastach i megakariocytach (5).

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień dotyczących zaangażowania tetraspanin w patofizjologię raka, a w szczególności w regulację ruchliwości i inwazyjności komórek nowotworowych (6,7). Pro- (lub anty-) migracyjna aktywność tetraspanin wiąże się z ich oddziaływaniem z integrynami, głównymi receptorami adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takimi jak kolagen i laminina (8,9). Niektóre tetraspaniny wpływają na migrację komórek nowotworowych również poprzez modulowanie interakcji międzykomórkowych związanych z E-kadheryną i innymi receptorami adhezji komórkowej (10). Ostatnie badania sugerują, że oprócz promowania inwazyjności komórek nowotworowych, tetraspaniny mogą pobudzać również ich proliferację, przyczyniając się tym samym do wzrostu guza pierwotnego (11).

CD151 (Tspan 24) jest jedną z najlepiej poznanych i scharakteryzowanych tetraspanin. Badania *in vitro* i *in vivo* sugerują, że CD151 jest ważnym regulatorem patofizjologii raka na wszystkich etapach jego rozwoju. Analiza materiału klinicznego ujawniła korelację ekspresji genu *CD151* z negatywnym rokowaniem pacjentów z rakiem płuc (12), jelita grubego (13), wątroby (14) i gruczołu krokowego (15). Zaliczana do cyklu praca „Tetraspanins in human epithelial malignancies” (Romanska i Berditchevski. 2011)

zawiera obszerny przegląd danych dotyczących ekspresji tetraspanin w nowotworach nabłonkowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich wartości rokowniczej.

Tetraspanina CD151 w raku piersi. Szereg przesłanek sugeruje istotny udział CD151 w raku piersi (ang. *Breast Cancer; BCa*). Rola CD151 w patogenezie i rozwoju raka piersi stanowiła tematykę badań prowadzonych przez zespół dr. Fedora Berditchevskiego w *School of Cancer Studies, University of Birmingham, UK*, z którym podjęłam współpracę w 2005 r. Badania te prowadzone były wielopłaszczyznowo i obejmowały różnorodne metody oraz modele eksperymentalne (2D i 3D hodowle komórkowe, modele zwierzęce) oraz archiwalny materiał tkankowy od chorych z BCa.

Wyniki naszych badań w modelach *in vitro* inwazyjnego przewodowego raka piersi (ang. *Invasive Ductal Carcinoma; IDC*) wykazały, że CD151 reguluje komunikację komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem guza, pośrednicząc w oddziaływaniu integrzyn z czynnikiem wzrostu produkowanym przez śródbłonek. Interakcje komórek nowotworowych z otaczającym je środowiskiem regulowane są również przez CD151-zależną odpowiedź komórek raka piersi na transformujący czynnik wzrostu - TGF- β (ang. *Transforming Growth Factor*) produkowany przez pneumocyty. Przy użyciu modelu zwierzęcego (przeszczep heterogenny w modelu myszy bezgrasiczych) pokazaliśmy, że proces ten skutkuje kolonizacją płuc przez przerzutujące komórki i rozwojem choroby nowotworowej (16). Badania materiału tkankowego prowadzone we współpracy z Prof. dr hab. n. med. Radzisławem Kordkiem i Prof. dr hab. n. med. Piotrem Potemskim (Uniwersytet Medyczny w Łodzi) od chorych z IDC wykazały, że tetraspanina CD151 jest niezależnym wskaźnikiem rokowniczym i poziom jej ekspresji koreluje z zajęciem węzłów chłonnych (17). Badania w modelach *in vitro* i *in vivo* nieinwazyjnego przewodowego raka piersi (ang. *Ductal Carcinoma In Situ; DCIS*) dowiodły, że wyciszenie genu *CD151* w nieinwazyjnej linii komórkowej HB2 wyprowadzonej z gruczołu piersiowego powodowało zahamowanie wzrostu komórek w Matrigelu, zarówno w hodowli 3D, jak i modelu zwierzęcym. Analiza materiału tkankowego od chorych z DCIS wykazała związek pomiędzy podwyższoną ekspresją CD151 i niskim zróżnicowaniem (high grade) DCIS ($P = 0,004$), wskazując na kluczową rolę CD151 w rozwoju przedinwazyjnych chorób hiperproliferacyjnych w gruczole piersiowym (11).

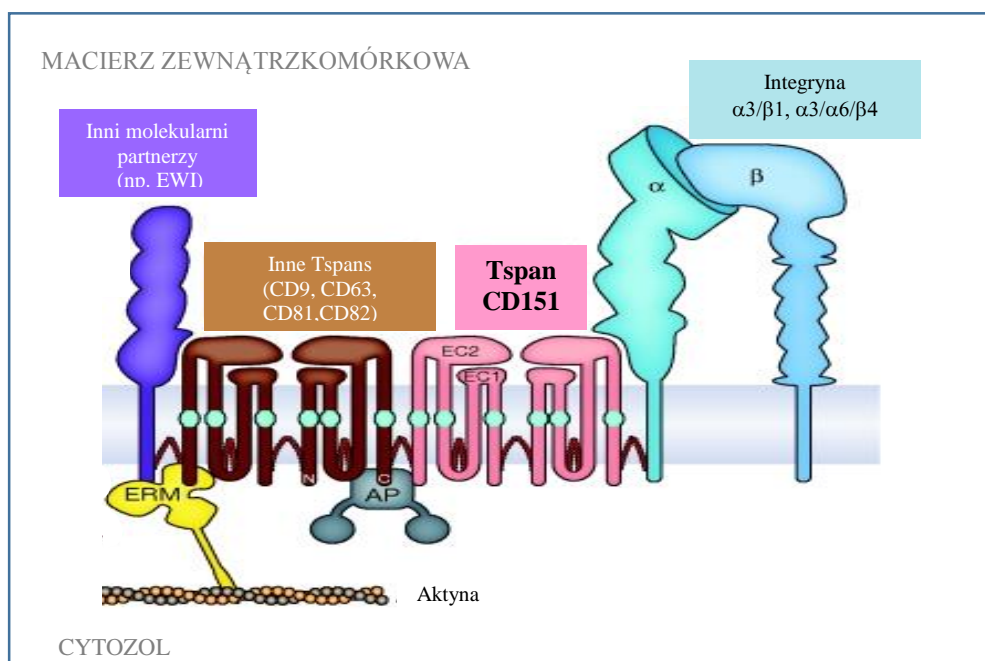
Tetraspanina CD151/integryna $\alpha 3\beta 1$. Integryny wiążące lamininę ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$) bezpośrednio oddziałują z tetraspaniną CD151. Interakcja z CD151 jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za ich rekrutację do TEM. Podjednostka $\alpha 3$ oddziałuje z

zewnątrzkomórkową domeną EC2 tetraspaniny CD151, tworząc silne i stabilne wiązanie. W niektórych typach komórek integryna $\alpha 3$ występuje wyłącznie w kompleksie z CD151 (18). Podjednostki $\alpha 6$ i $\alpha 7$ również wiążą się z CD151, ale powstałe kompleksy są znacznie mniej trwałe (19). Interakcje CD151 z integrynami wiążącymi lamininę mają miejsce we wczesnej fazie biosyntezy białka (20), tak więc tetraspanina CD151 i oddziałujące z nią integryny przemieszczają się razem na powierzchnię błony komórkowej. CD151 jest również mediatorem endocytozy i transportu pęcherzykowego integryn (ang. *trafficking*), w czym bierze udział białko adaptorowe AP-2 wiążące się swoiście z fragmentem części C-końcowej CD151, sekwencją YRSL (ang. *tyrosine – based sorting motif*) (21). Uważa się, że interakcja z integrynami wiążącymi lamininę, a w szczególności regulacja ich transportu komórkowego jest odpowiedzialna za wpływ CD151 na zdolności migracyjne komórek. CD151 łączy integryny wiążące lamininę z innymi tetraspaninami, takimi jak CD9 i CD81, które z kolei oddziałują z innymi białkami. I tak na przykład, CD9 i CD81 może wiązać się z białkami dwóch pokrewnych rodzin immunoglobulin (IgSF) EWI-2 i EWI-F i poprzez CD151 łączyć je z integryną $\alpha 3\beta 1$. Tetraspanina CD151 pełni zatem rolę jednego z głównych modulatorów oddziaływań lateralnych w obrębie TEM. Wyciszenie genu *CD151* w znacznym stopniu zakłóca interakcje integryn wiążących lamininę z innymi białkami TEM, (np. CD9 i CD81), jak również zależną od integryn sygnalizację komórkową (22-25).

W modelu przedstawionym na Ryc.1 EWI reprezentują dużą grupę potencjalnych partnerów molekularnych tetraspanin zidentyfikowanych w TEM za pomocą technik biochemicznych i proteomicznych. Należą do nich między innymi: 1) inne białka IgSF (np. CD19 i MHC t. I), 2) proteazy (np. ADAM10), 3) czynniki wzrostu związane z błoną (np. HB-EGF), 4) receptory czynników wzrostu (np. ErbB), i 5) inne białka przezbłonowe (np. Claudin 1/CLDN1, receptor GPR56 sprzężony z białkiem G i domniemane transportery choliny CTL1/ SLC44A1 i CTL2/SLC44A2) (21). Rekrutacja integryn do TEM przez tetraspaninę CD151 stwarza zatem wiele możliwości ich funkcjonalnej interakcji z innymi występującymi tam białkami powierzchniowymi, a w konsekwencji może prowadzić do różnorodnych odpowiedzi biologicznych komórki.

Spośród opisanych partnerów wchodzących w interakcję z CD151, kompleksy z integrynami wiążącymi lamininę, wydają się być szczególnie istotne dla zachowań agresywnych raka. Wiąże się to z charakterem oddziaływań komórek nabłonkowych z mikrośrodowiskiem guza, tzn. CD151-zależną regulacją funkcji integryn wiążących lamininę, a zwłaszcza $\alpha 3\beta 1$, i ich następową interakcją ze zlokalizowanymi tam białkami

(m.in. PI4K, receptory ErbB, receptory czynników wzrostu i inne tetraspaniny), a zatem ze swoistością kontekstu biologicznego (26, 27).



Ryc.1. **Tetraspanin-enriched microdomain (TEM)**. CD151 łączy się bezpośrednio z integrynami wiążącymi lamininę, innymi tetraspaninami (np. CD9, CD63, CD81 i CD82) oraz immunoglobulinami (EWI). Pojednostka α integryn oddziałuje bezpośrednio z domeną EC2 tetraspaniny CD151. Ezrin - Radixin - Moesin (ERM) – białka wiążące aktynę oraz AP - białka adaptorowe należą do cytoplazmatycznych efektorów związanych z TEM. (modyfikacja wg. Stipp 2010)

Prace włączone do cyklu są kontynuacją badań nad CD151 prowadzonych przez zespół dr. Berditchevskiego. Nadrzędny ich cel stanowiła weryfikacja wyników uzyskanych w modelach doświadczalnych poprzez określenie znaczenia klinicznego kompleksu CD151/ $\alpha3\beta1$ w odmiennych *in vivo* kontekstach biologicznych, t.j. w raku głowy i szyi oraz różnych typach nowotworów piersi.

c.1. Tetraspanins in Human Epithelial Malignancies. Romanska H, Berditchevski F. J Pathol 2011; 223:4-14.

Rola tetraspanin w biologii raka jest od lat przedmiotem badań wielu grup na świecie. Ostatnie dziesięciolecie zaowocowało serią znakomitych prac przeglądowych poświęconych różnym aspektom mechanizmu działania tetraspanin i ich udziału w ruchliwości i inwazyjności komórek nowotworowych (6, 7, 28-30). Powyższa praca miała na celu zebranie istniejących danych na temat znaczenia klinicznego tetraspanin w nowotworach nabłonkowych, a zwłaszcza w raku piersi. Ze szczególną uwagą odnieśliśmy się w niej do prac, w których oprócz wartości diagnostycznej poszczególnych tetraspanin (ocenianej pojedynczo lub w kontekście ekspresji innych biomarkerów), analizowana była również ich wartość rokownicza. Zebrany materiał wskazał brak istniejących doniesień dotyczących roli kompleksu tetraspaniny CD151 z jej głównym partnerem molekularnym, integryną $\alpha 3\beta 1$, w progresji nowotworów nabłonkowych i wynikających z tego implikacji klinicznych. Opracowanie powyższe stanowiło podstawę do podjęcia badań opisanych w kolejnych pracach cyklu.

c.2. Loss of CD151/Tspan24 from the complex with integrin $\alpha 3\beta 1$ in invasive front of the tumour is a negative predictor of disease-free survival in oral squamous cell carcinoma. Romanska HM, Potemski P, Collins SI, Williams H, Parmar S, Berditchevski F. Oral Oncol. 2013 Mar;49(3):224-9.

Morfologiczna analiza materiału tkankowego pobranego od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (ang. *Oral Squamous Cell Carcinoma; OSCC*), oparta na konwencjonalnych technikach histologicznych i systemie TNM (ang. *Tumour, Node, Metastasis*), stanowi podstawę oceny zachowań biologicznych guza, a tym samym główną wytyczną wyboru podjętej opcji leczenia. System TNM stosowany w rutynowej praktyce posiada jednak poważne niedoskonałości. Przede wszystkim, nie obejmuje on oceny określonych cech histologicznych raka, w szczególności charakteru jego naciekania, tzn. „grading” inwazyjnego frontu guza, co ogranicza możliwość rozróżnienia pomiędzy bardziej i mniej agresywnymi nowotworami. Jak wykazały liczne badania, typ inwazji oceniany ilościowo zgodnie z systemem klasyfikacji polecanym przez Jakobsson’a, lub jego modyfikacją, jest istotnie związany z przeżyciem pacjentów z OSCC (31-33). Wiadomo, że w prawie 50% przypadków OSCC w ciągu 24 miesięcy po chirurgicznej resekcji guza dochodzi do wznowy miejscowej lub powstania odległych przerzutów (34). Wydaje się więc, że powszechnie stosowana histopatologiczna ocena marginesu resekcji jest niezadowolająca i

poszerzenie jej o charakterystykę morfologiczną i fenotypową powinno dostarczyć informacji istotnych dla rokowania choroby. Wiadomo, że integryny odgrywają kluczową rolę w adhezji komórek guza do macierzy zewnątrzkomórkowej, a pro-migracyjna i pro-inwazyjna aktywność integryny $\alpha 3\beta 1$ jest regulowana przez tetraspaninę CD151. Celem pracy była więc ocena znaczenia klinicznego ekspresji CD151 w kompleksie z integryną $\alpha 3\beta 1$, charakteryzowanej oddzielnie w głównej masie guza i w jego inwazyjnym froncie. Wyniki analizy immunohistochemicznej prowadzonej w materiale pochodzącym od 83 chorych z OSCC wykazały, że: i) dystrybucja i poziom ekspresji CD151 i $\alpha 3\beta 1$ różniły się; podczas gdy tetraspanina CD151 ekspresjonowana była równomiernie przez komórki guza, ekspresja $\alpha 3\beta 1$ ograniczona była do komórek leżących na granicy z podścieliskiem; ii) poziom ekspresji integryny $\alpha 3\beta 1$ różnił się znacząco pomiędzy masą guza i inwazyjnym frontem ($P = 0,021$); iii) komórki niekohezyjnie naciekające podścielisko charakteryzowały się wysoką ekspresją $\alpha 3\beta 1$, w niewielkim tylko stopniu współistniejącą z CD151; iv) poziom ekspresji integryny $\alpha 3\beta 1$, ale nie kompleksu CD151/ $\alpha 3\beta 1$, w inwazyjnym froncie guza odzwierciedlał zaawansowanie choroby i był związany z krótkim czasem przeżycia chorych ($P = 0,050$). Wyniki te sugerują, że utrata CD151 z kompleksu z integryną $\alpha 3\beta 1$ może prowadzić do destabilizacji kontaktów międzykomórkowych keratynocytów i zwiększenia pro-migracyjnej aktywności integryny $\alpha 3\beta 1$. W konsekwencji, potęguje to inwazyjność komórek OSCC, a tym samym ryzyko wznowy choroby. Podsumowując, przedstawiona praca wskazuje, że szczegółowa analiza morfologiczna inwazyjnego frontu guza połączona z charakterystyką poziomu ekspresji kompleksu CD151/ $\alpha 3\beta 1$ może dostarczyć informacji istotnych dla zachowań biologicznych guza, a tym samym stanowić cenny wskaźnik rokowniczy u chorych z OSCC.

c.3. Integrin $\alpha 3\beta 1$ -CD151 complex regulates dimerization of ErbB2 via RhoA.

Novitskaya V*, Romanska H*, Kordek R, Potemski P, Kusinska R, Parsons M, Odintsova E, Berdichevski F. *Oncogene*. 2014; 33(21):2779-89. (*equal contribution).

Domeny bogate w tetraspaniny (TEM) mogą zawierać receptory dla czynników wzrostu, w szczególności rodzinę receptorów ErbB. Jak wykazały badania prowadzone w modelach doświadczalnych, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z integrynami wiążącymi lamininę, tetraspanina CD151 reguluje ErbB2-zależną sygnalizację w komórkach raka piersi. CD151/integryna $\alpha 6\beta 4$ promuje rozwój ErbB2/HER2-zależnego raka piersi (35), a usunięcie z błony komórkowej kompleksu CD151/integryny wiążące lamininę uczuła ErbB2-dodatnie komórki na terapię Trastuzumabem i Lapatinibem (36). Celem powyższej pracy była ocena

znaczenia klinicznego interakcji pomiędzy kompleksem integryna $\alpha3\beta1/CD151$ i receptorem ErbB2 w raku piersi z nadekspresją ErbB2 oraz próba wyjaśnienie mechanizmu molekularnego tych oddziaływań. Badania materiału tkankowego od chorych z IDC (No. = 182) wykazały, że zarówno związek pomiędzy przeżyciem chorych z ErbB2-negatywnym IDC a poziomem ekspresji CD151, ocenianej oddzielnie, jak i w kompleksie z integryną $\alpha3\beta1$, osiągał znamienność statystyczną, ale ekspresja $\alpha3\beta1/CD151$ posiadała większą wartość rokowniczą (P = 0,010; HR = 3,27 vs. P = 0,004; HR = 4,10). Siedmioletnie przeżycie w grupie chorych z ErbB2-negatywnym IDC wynosiło 63,7% (95%CI 51,4-73,7%) dla $\alpha3\beta1/CD151$ - dodatnich guzów i odpowiednio 77.3% (95%CI 65.4-85.5%) dla guzów $\alpha3\beta1/CD151$ - ujemnych (log-rank, P = 0,004). W modelu *in vitro* (hodowla 3D w macierzy bogatej w lamininę; komórki linii BT474 i SKBr3) obecność kompleksu $\alpha3\beta1/CD151$ w komórkach z nadekspresją ErbB2 związana była z wyższym stopniem fosforylacji receptora ErbB2. Zastosowanie mikroskopowej techniki korelacji fluorescencji (FRET/FLIM) pozwoliło wykazać, że kompleks $\alpha3\beta1/CD151$ reguluje homodimeryzację receptora ErbB2. Pokazaliśmy również że mediatorem zależnej od $\alpha3\beta1/CD151$ dimeryzacji receptora ErbB2 jest białko RhoA. Komórki $\alpha3\beta1/CD151$ -dodatnie wykazywały większą wrażliwość na hamujące proliferację działanie Trastuzumabu. Reasumując, wyniki pracy wskazują, że kompleks $\alpha3\beta1/CD151$ posiada krytyczną rolę w regulacji ErbB2-zależnej sygnalizacji komórkowej i jego obecność posiada wartość rokowniczą w grupie chorych z ErbB2-ujemnym IDC. Ocena związku pomiędzy poziomem ekspresji $\alpha3\beta1/CD151$ i ErbB2 u chorych z rakiem piersi może zatem posiadać istotne implikacje dla rokowania i terapii chorych z IDC.

c.4. Expression of CD151/Tspan24 and integrin alpha3 complex in aid of prognostication of HER2-negative high-grade ductal carcinoma in situ. Romanska HM, Potemski P, Kusinska R, Kopczynski J, Sadej R, Kordek R. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:9471-9478.

Nieinwazyjny przewodowy rak piersi *in situ* (DCIS) charakteryzujący się proliferacją komórek nowotworowych wewnątrz światła przewodu, uważany jest powszechnie za prekursora przewodowego inwazyjnego raka piersi (IDC). Mechanizmy leżące u podstaw transformacji DCIS→IDC są słabo poznane i identyfikacja markerów molekularnych pozwalających na oszacowanie ryzyka inwazyjnej progresji DCIS jest problemem o pierwszorzędym znaczeniu klinicznym. Coraz więcej danych wskazuje na to, że w przeciwieństwie do ogólnie przyjętego paradygmatu stopniowej ewolucji raka piersi, program

molekularny decydujący o inwazyjności komórek BCa jest aktywny już na przedinwazyjnych etapach rozwoju (37, 38), czyli towarzyszy fazie hiperprolifracji (rozwojowi DCIS). Wynika z tego, że zastosowanie wiedzy dotyczącej mechanizmów rządzących biologią IDC powinno nie tylko rzucić światło na patofizjologię DCIS, ale może również dostarczyć informacji ważnych dla rokowania choroby. W jednej z naszych poprzednich prac pokazaliśmy, zarówno w modelu *in vitro* (hodowla w 3D macierzy), jak i *in vivo* (przeszczep heterogenny w modelu myszy bezgrasiczych), że tetraspanina CD151 promowała proliferację komórek HB2 (nieinwazyjne komórki ludzkiego gruczołu piersiowego). Jakkolwiek w warunkach doświadczalnych, aktywność proliferacyjna tetraspaniny CD151 zdawała się nie zależeć od interakcji z integryną $\alpha 3\beta 1$, obecność CD151 była niewystarczająca do przywrócenia zdolności proliferacyjnej komórkom pozbawionym ekspresji $\alpha 3\beta 1$, wskazując na znacznie interakcji CD151- $\alpha 3\beta 1$ dla zachowań biologicznych komórki gruczołu piersiowego. W materiale tkankowym od chorych z DCIS ocenialiśmy poziom ekspresji CD151, wykazując jego odwrotną korelację ze stopniem zróżnicowania guzów (11). Badania roli interakcji pomiędzy CD151 i $\alpha 3\beta 1$ w rozwoju ludzkiego DCIS, a tym samym jej wpływu na rokowanie choroby nie były przeprowadzane. W publikacji (włączonej do cyklu) dotyczącej IDC wykazaliśmy natomiast, że obecność CD151/ $\alpha 3\beta 1$ była złym wskaźnikiem rokowniczym w grupie chorych z (ErbB2)/HER2-ujemnym typem guza (Novitskaya i wsp. 2014). Cel niniejszej pracy oparty był na założeniu istnienia wspólnego dla IDC i DCIS mechanizmu promującego inwazyjność komórek guza. Polegał on na ocenie związku pomiędzy ekspresją CD151/integryna $\alpha 3\beta 1$ i prognostycznym indeksem Van Nuys'a (rutynowo stosowany w praktyce klinicznej wskaźnik ryzyka nawrotu po DCIS; VNPI) w zależności od HER2 statusu. Badaniu poddany był materiał tkankowy pochodzący od chorych ze słabo zróżnicowanym (high grade) DCIS, a więc o potencjalnie największym ryzyku progresji inwazyjnej. Wyniki przeprowadzonej analizy pokazały, że: i) ekspresja CD151 i/lub integryny $\alpha 3\beta 1$ nie wiązała się z cechami histologicznymi guza; ii) ekspresja CD151 pozostawała w odwrotnej zależności ze statusem hormonalnym (ER i/lub PR) guza ($P = 0,041$); iii) ekspresja $\alpha 3\beta 1$ nie korelowała z żadną z cech kliniko-patologicznych; iv) istniała silna tendencja do związku pomiędzy CD151 (ale nie $\alpha 3\beta 1$) i brakiem obecności HER2 receptora ($P = 0,064$); v) podobnie jak w IDC, u chorych z HER2-ujemnym DCIS poziom ko-ekspresji CD151/ $\alpha 3\beta 1$ istotnie korelował z VNPI ($P = 0,044$) (związek z ekspresją ocenianą oddzielnie nie osiągał znamienności statystycznej; CD151 ($P = 0,248$), $\alpha 3\beta 1$ ($P = 0,631$)). Sugeruje to, że fenotyp o cechach CD151⁺/ $\alpha 3\beta 1$ ⁺/ HER2⁻ może charakteryzować subpopulację komórek

DCIS o większej wrażliwości na oddziaływanie podścieliska i odpowiedzialnych za inwazyjną progresję choroby. Ze względu na małą dostępność materiału tkankowego z ‘czystym’ DCIS badanie to (przeprowadzone w stosunkowo małej grupie chorych; No. = 49) miało charakter pilotażowy. Rozszerzenie analizy na większą grupę chorych o znanym ‘follow-up’, jak również badania w modelach eksperymentalnych mające na celu ocenę mechanizmów molekularnych obserwowanego zjawiska, mogą doprowadzić do identyfikacji zmian DCIS o cechach inwazyjności, dostarczając tym samym informacji istotnych dla rokowania choroby.

c.5. Lack of CD151/integrin $\alpha 3\beta 1$ complex is predictive of poor outcome in node-negative lobular breast carcinoma: opposing roles of CD151 in invasive lobular and ductal breast cancers. Romanska H, Potemski P, Krakowska M, Mieszkowska M, Chaudhri S, Kordek R, Kubiak R, Speirs V, Hanby V, Sadej R, Berditchevski F Br J Cancer. 2015;113(9):1350-7.

Udział tetraspaniny CD151 w karcynogenezie został potwierdzony w wielu typach nowotworów u ludzi. Badania znaczenia klinicznego w raku piersi wskazują na potencjalną rolę CD151 jako negatywnego wskaźnika przeżycia. Istniejąca wiedza na temat wpływu CD151 na rozwój BCa oparta jest niemal wyłącznie na doświadczalnych i klinicznych badaniach inwazyjnego przewodowego raka piersi (IDC). Wiadomo jednak, że funkcja tetraspaniny CD151 i biologiczne efekty jej aktywności zależą zarówno od typu komórki jak i jej kontekstu biologicznego. Znaczenie kliniczne CD151 powinno być zatem analizowane w odniesieniu do fenotypowego i histologicznego typu guza. Inwazyjny zrazikowy rak piersi (ILC) stanowi ~10% - 20% raków tego gruczołu. Jak ostatnio wykazano, ILC różni się od IDC, odpowiadającego mu pod względem stopnia zróżnicowania (grade) i fenotypu molekularnego, profilem transkryptomycznym związanym przede wszystkim z adhezją komórkową i inwazyjnością, wskazując, że ILC i IDC są odrębnymi, tak pod względem klinicznym jak i biologicznym, typami nowotworów (39, 40). Znaczenie prognostyczne i udział CD151 w rozwoju i progresji ILC nie były jak dotąd badane. Celem pracy była ocena znaczenia klinicznego CD151 oraz jego kompleksu z integryną $\alpha 3\beta 1$ w ILC. Wyniki analizy immunohistochemicznej w materiale od chorych z ILC (No. = 117) oceniane były w kontekście naszych poprzednich analogicznych badań w grupie chorych z IDC (No. = 182) (praca włączona do cyklu; Novitskaya i wsp. 2014) i wykazały, że: i) poziom ekspresji $\alpha 3\beta 1$ nie korelował żadną z cech kliniko-patologicznych (podobnie jak IDC); ii) ekspresja CD151 była odwrotnie zależna od wielkości guza ($P = 0,047$) i zaawansowania choroby ($P = 0,019$)

(w IDC istotnie korelowała z zaawansowaniem choroby ($P = 0,030$), niskim stopniem zróżnicowania ($P = 0,041$) i receptorem ErbB2 ($0,015$)); iii) ko-ekspresja CD151/ $\alpha3\beta1$ pozostawała w znamiennej zależności z niskim stopniem zróżnicowania guza ($P = 0,019$) (w IDC ekspresja CD151/ $\alpha3\beta1$ nie korelowała z żadną z cech kliniko-patologicznych); iv) ekspresja CD151 i $\alpha3\beta1$ ocenianych oddzielnie nie przedstawiała żadnej wartości rokowniczej (w IDC ekspresja CD151 wiązała się z 1,88 razy większym ryzykiem zgonu w wyniku choroby w porównaniu z chorymi z CD151-ujemnym guzem). Jako że interakcja pomiędzy CD151 i $\alpha3\beta1$ wpływa na zachowania inwazyjne komórek nowotworowych, nasza dalsza analiza miała na celu ocenę wartości rokowniczej CD151 i/lub integryny $\alpha3\beta1$ w odniesieniu do zajęcia węzłów chłonnych. Wykazaliśmy, że: i) brak ekspresji zarówno CD151 jak i $\alpha3\beta1$ w grupie ILC chorych z niezajętymi węzłami chłonnymi/N(-) był jedynym czynnikiem rokowniczym; ii) chorzy z CD151⁻/ $\alpha3\beta1$ ⁻ guzem posiadali 3,12 razy większe ryzyko zgonu w porównaniu z pozostałymi N(-) chorymi; iii) szacowane pięcioletnie przeżycie dla N(-) chorych z CD151⁻/ $\alpha3\beta1$ ⁻ guzami vs. reszta wynosiło odpowiednio 64% vs. 91%. Podsumowując, wyniki te pokazują, że CD151 bierze udział w biologii ILC, ale w przeciwieństwie do IDC, brak ekspresji CD151/ $\alpha3\beta1$ jest wskaźnikiem złego rokowania i jego znaczenie prognostyczne jest ograniczone do grupy chorych z niezajętymi węzłami chłonnymi. Przedstawiona praca jest pierwszą w piśmiennictwie analizą znaczenia klinicznego CD151/ $\alpha3\beta1$ w ILC. Jej wnioski potwierdzają wstępne założenie, że CD151 pełni odmienną rolę w różnych typach raka piersi i mogą mieć istotne znaczenie kliniczne w identyfikacji chorych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych, uznanych za niekwalifikujących się do rutynowego leczenia uzupełniającego.

Podsumowanie

Rola tetraspaniny CD151 w karcynogenezie uwarunkowana jest interakcjami z jej partnerami molekularnymi, które związane są z typem komórki i jej mikrośrodowiskiem. Zależność od kontekstu biologicznego wskazuje, że znaczenie kliniczne CD151 w nowotworach nabłonkowych powinno być oceniane w odniesieniu do ekspresji integryn wiążących lamininę (w szczególności $\alpha3\beta1$) oraz fenotypowych i histologicznych cech nowotworu.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Dorobek naukowy (szczegółowo w załączniku 4)

Analiza bibliometryczna (szczegółowo w załączniku 5) (IF i MNiSW z roku publikacji)

Łączna liczba publikacji pełnotekstowych (z wyłączeniem prac z cyklu habilitacyjnego): **33** (w tym pierwszy autor w **12** pracach, korespondencyjny autor w **5** pracach), suma **IF = 102,562; MNiSW = 526**

w tym:

- przed doktoratem 6 publikacje (**IF = 10,050; MNiSW = 46**)
- po doktoracie 27 publikacji (**IF = 92,512; MNiSW = 480**)

Cykl habilitacyjny: **5** publikacji (w tym pierwszy autor w **5** pracach, autor korespondencyjny w **4** pracach) o **IF = 24,533; MNiSW = 180**.

Sumaryczna liczba publikacji pełnotekstowych (z pracami z cyklu habilitacyjnego): **38** (w tym pierwszy autor w **17** pracach, korespondencyjny autor w **9** pracach), sumaryczny **IF = 127,095; MNiSW = 706**.

Łączna liczba streszczeń zjazdowych **45** (**2** przed uzyskaniem stopnia doktora, **43** po uzyskaniu stopnia doktora), **35** na konferencjach zagranicznych i **10** na konferencjach krajowych.

Prace były cytowane 776 razy, wyłączając autocytowania 753 razy. Indeks Hirsha 15 wynosi (dane z Web of Science Core Collection z dnia 09.12.2015)

GLÓWNE KIERUNKI PRACY NAUKOWEJ

Przed uzyskaniem stopnia doktora

5.1. Neuronalna Cząsteczka Adhezyjna (NCAM) w różnicowaniu układu nerwowo-mięśniowego jelita grubego u człowieka. (*Praca Doktorska, Ph.D. in Pathology, Imperial College London, 1997*)

Praca ta była nawiązaniem do moich zainteresowań klinicznych chorobą Hirschsprunga (wrodzona bezzwojowość jelita grubego).

Powszechnie przyjętym leczeniem dzieci z chorobą Hirschsprunga jest resekcja chorego odcinka okrężnicy. Rozległość resekcji jest określona przez badania śródoperacyjne biopsji jelita pobranych na poziomie planowanego zespolenia, które mają na celu wykazanie obecności komórek zwojowych i braku hipertroficzných włókien nerwowych w obrębie mrożonych skrawków barwionych rutynowo hematoksyliną i eozyną. Niezależnie od

zastosowanej techniki operacyjnej u ok. 20% dzieci dochodzi do nawrotu choroby. Przyczyny niepowodzeń terapeutycznych nie są znane.

Nieprawidłowości motoryki jelita w bezzwojowym odcinku dystalnym są powszechnie przypisywane aberracjom układu nerwowego. Niewiele jest wiadomo na temat natury zaburzeń w układzie nerwowo-mięśniowym w chorobie Hirschsprunga, jak i patofizjologii mięśniówki jelita pozbawionej prawidłowego ‘nadzoru nerwowego’. Liczne badania wskazują na to, że w mięśni poprzecznie prążkowanym i sercowym Neuronalna Cząsteczka Adhezyjna (NCAM) pełni rolę regulatora morfogenezy tkanki mięśniowej. Jej ekspresja na błonie komórki mięśniowej zanika w prawidłowo funkcjonującym, dojrzałym układzie nerwowo-mięśniowym. Zaburzenia unerwienia, jak np. porażenia pochodzenia neurogenne, wywołują re-ekspresję NCAM na sarkolemmie, poziom której jest porównywalny z występującym we wczesnych okresach rozwoju. Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że podobnie jak w mięśni szkieletowym, NCAM odgrywa rolę w interakcji nerwowo-mięśniowej rozwijającego się jelita a nieprawidłowości jej ekspresji towarzyszą zaburzeniom motoryki w chorobie Hirschsprunga.

Najważniejszym wynikiem badań prowadzonych w materiale tkankowych i hodowlach komórkowych było wykazanie zwiększonej ekspresji NCAM w mięśniówce chorego jelita, w szczególności w warstwie *muscularis mucosae*, oraz hipertroficznym włóknach nerwowych odcinka bezzwojowego. Nieprawidłowości ekspresji NCAM, charakterystyczne dla dystalnego odcinka chorego jelita, w większości przypadków wykazane zostały również w jego odcinku proksymalnym, rutynowo określanym śródoperacyjnie jako ‘zdrowe’ za pomocą konwencjonalnej metody histologicznej. Obserwacje te potwierdziły wyjściową hipotezę, sugerując zarazem, że utrzymujące się na poziomie resekcji chirurgicznej zaburzenia komunikacji nerwowo-mięśniowej mogą stanowić częściowe wytłumaczenie dla częstych wznów choroby, co wskazywałoby równocześnie, że powszechnie stosowane metody histologiczne określające śródoperacyjnie proksymalny poziom resekcji jelita są niezadowalające (41, 42).

Po uzyskaniu stopnia doktora

5.2. Tlenek azotu (NO) w patogenezie zwłókniających chorób płuc.

Prace prowadzone były w materiale tkankowym, modelach zwierzęcych i hodowlach komórkowych. Wyniki badań w modelu *in vitro* wykazały, że wzrost aktywności i ekspresji indukcyjnej syntetazy tlenku azotu (iNOS) (genu i białka) towarzyszył wczesnej fazie

odpowiedzi fibroblastów na bodźce wywołane cytokinami zapalnymi i był w części odpowiedzialny za ich wzmożoną aktywność proliferacyjną. Analiza materiału tkankowego płuc potwierdziła powyższe obserwacje, pokazując podwyższoną ekspresję iNOS we wczesnych zmianach włókniejących, niezależnie od etiologii schorzenia. Wnioski tych badań wskazujące na NO, jako jeden z głównych czynników patogennych zwłókniających chorób płuc, zdają się mieć ważne implikacje kliniczne i sugerują, że supresja produkcji NO może zahamować proces włóknienia (43,44; prezentacja na sesji plenarnej kongresu *The Pathologic Society of Great Britain and Ireland, Brighton, 2000*).

5.3. KOMÓRKI MACIERZYSTE - Inżynieria Tkankowa

Kolejnym etapem mojej pracy był udział w szeroko zakrojonym programie badawczym w *Tissue Engineering and Regenerative Medicine Centre (TERM)*, założonym w 1999 przez Prof. Dame Julię Polak, *Faculty of Medicine, Imperial College London* i Prof. Larry Hench'a, *Department of Materials, Imperial College London*. Nadrzędną misją Centrum było wypracowanie metodologii łączącej instrumentarium i technologie biologii komórki i materiałoznawstwa (hodowle komórkowe na niebiologicznych podłożach/rusztowaniach), które dałyby podstawy nowej, powstającej w *Imperial College London* (i Wielkiej Brytanii) dziedzinie nauki, inżynierii tkankowej. Celem projektu podjętego przez zespół „*Lung Group*” prowadzony przez dr Anne Bishop, do którego należałam, było wykazanie możliwości otrzymania fenotypowo dojrzałych pneumocytów typu II z pluripotencjalnych mysich embrionalnych komórek macierzystych (ang. *Murine Embryonic Stem cells; mES cells*) i znalezienie optymalnych warunków stymulujących ich kierunkowe różnicowanie. W szczególności, część projektu, którego byłam współautorem i nad którym miałam nadzór, miał na celu stworzenie 3D *in vitro* modelu, który naśladowałby proces przebiegający w trakcie *in vivo* organogenezy, potwierdzając tym samym wpływ mikrośrodowiska (w naszym przypadku mezenchymy płodowej) na ‘programowanie’ komórek mES. Fenotyp otrzymanych komórek był oceniany klasycznymi metodami, tj. immunocytochemią, *in situ* hybrydyzacją (ISH), RT-PCR i mikroskopią elektronową. Wyniki prac ukazały po raz pierwszy możliwość otrzymania prekursorów komórek odpowiedzialnych za regenerację nabłonka oddechowego pęcherzyków płucnych z pluripotencjalnych mES komórek.

Jakkolwiek badania prowadzone w modelu mysim dostarczyły jedynie ‘*proof of concept*’, wyniki te, posiadające dużą wartość poznawczą, stworzyły podstawy do dalszych

prac w kierunku zastosowania komórek macierzystych dla potrzeb medycyny regeneracyjnej chorób płuc (45,46).

Rozpoczęte przeze mnie badania nad rolą mezenchymy płucnej w programowaniu mES komórek do endodermalnych prekursorów nabłonka oddechowego zostały rozwinięte w projekcie doktorskim Benjamina Van Vranken (*PhD 2005*), w którym pełniłam rolę promotora pomocniczego.

5.4. BIOLOGIA RAKA

5.4.1. Rak Stercza

W 2000 roku, wraz z miejscem pracy, zmieniłam kierunek badań i zajęłam się tematyką związaną z biologią raka. Pierwsze projekty dotyczyły androgenowej regulacji w mechanizmach progresji raka stercza (ang. *Prostate Cancer; PC*).

Rozwój fazy hormono-niezależnej (ang. *Androgen Independence; AI*) jest uznany za główną przyczynę nieskuteczności terapii hormonalnej w zaawansowanym PC. Wśród mechanizmów biorących udział w rozwoju AIPC (ang. *Androgen-Independent Prostate Cancer*) i umożliwiających komórkom nowotworowym unikać wpływu supresji androgenowej wymienia się m.in. aktywację alternatywnych szlaków sygnalizacyjnych. Przedmiotem naszych badań były ścieżki aktywowane poprzez E-kadherynę/ β -kateninę i PI3-kinazę. Badania przeprowadzane były w materiale tkankowym uzyskanym od chorych z PC oraz z użyciem *in vitro* modelu progresji PC [stworzony uprzednio w naszym laboratorium poprzez przeniesienie genu receptora androgenowego (ang. *Androgen Receptor; AR*) do komórek androgeno-niezależnych].

Wyniki badań wykazały, że obecność AR uwrażliwia komórki AIPC na stymulację androgenową, która prowadzi do zmniejszenia ekspresji E-kadheryny, a w konsekwencji do osłabienia wiązań międzykomórkowych i wzmożoną proliferację komórek. Wynik ten identyfikujący nieznaną dotąd mechanizm hormonalnej regulacji AR-dodatnich AIPC, istotny dla rozwoju określonej subpopulacji komórek guza *in vivo*, posiada implikacje terapeutyczne (47).

Analizę związku pomiędzy AR i PTEN przeprowadzaliśmy również w materiale tkankowym pobranym od chorych z hormono-zależnym i hormono-opornym PC. Przy użyciu standardowych metod immunohistochemii pokazaliśmy, że ko-ekspresja AR i PTEN jest dobrym wskaźnikiem rokowniczym i wiąże się z dłuższym bezobjawowym okresem przeżycia oraz skutecznością terapii hormonalnej (ponad 30 miesięcy). Wyniki te sugerują,

że rutynowa ocena obu markerów byłaby pomocna w identyfikacji pacjentów z guzem niewrażliwym na rutynową supresję androgenową i kwalifikujących się do alternatywnych strategii terapeutycznych (48).

Wpływ obecności AR na żywotność i proliferację AIPC komórek badany był również w projekcie prowadzonym w Uniwersytecie w Birmingham, poświęconym mechanizmowi działania doksazosyny (współpraca z Prof. dr hab. n. med. Markiem Sosnowskim, Uniwersytet Medyczny w Łodzi), selektywnego antagonisty receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych. Z opublikowanych dotychczas doniesień wynika, że preparat ten o udokumentowanej klinicznie skuteczności w leczeniu łagodnego rozrostu stercza, posiada dodatkowo właściwości przeciwnowotworowe w PC. Badania *in vitro* z użyciem AIPC linii komórkowych z mutacją *PTEN*, genu supresorowego szlaku PI3K/Akt, wykazały ponadto, że działanie leku jest niezależne od hormono-wrażliwości komórek PC. Jako że interakcje pomiędzy PTEN/PI3K/Akt i ścieżką aktywowaną poprzez AR odgrywają znaczącą rolę w progresji PC, celem naszego projektu była ocena wpływu doksazosyny w komórkach AIPC z funkcjonalnym szlakiem PTEN/PI3K/Akt. Przy użyciu powyższego modelu *in vitro* wykazaliśmy, że proapoptyczne działanie doksazosyny w PTEN-dodatnich AIPC komórkach odbywa się częściowo za pośrednictwem deaktywacji Akt i obecność zarówno AR jak i Bcl-2 (białka antyapoptycznego) zwiększa odporność komórek PC na działanie leku. Wyniki te sugerują, że proapoptyczna skuteczność doksazosyny w PC zależy od charakterystyki guza i wskazania terapeutyczne powinny być poprzedzone i uzależnione od szczegółowego badania fenotypu komórek guza (49).

5.4.2. Tumorogenność i Pluripotencjalność

Tematyka tych badań była połączeniem wcześniejszych zainteresowań embrionalnymi komórkami macierzystymi (ES) (badania prowadzone w *Tissue Engineering and Regenerative Medicine Centre, Imperial College London; 1999-2002*) oraz trwających prac dotyczących biologii raka.

ES komórki, ze względu na ich wysoki potencjał proliferacyjny i nieograniczoną zdolność do samoodnowy i wielokierunkowego różnicowania, są wielką nadzieją medycyny regeneracyjnej i transplantologii. Mechanizmy rządzące ich biologią nie są w pełni poznane a ich wyjaśnienie jest warunkiem koniecznym dla użycia komórek ES w terapii. Dotyczy to przede wszystkim zdolności przeszczepionych pluripotencjalnych (niezróżnicowanych) komórek ES, które nie wykazują żadnych nieprawidłowości chromosomalnych, do

wytwarzania guza w tkance biorecy. Różnicowanie komórek ES (również ich złośliwych odpowiedników - komórki EC/*embryonal carcinoma*) prowadzi do utraty przez nie zdolności do nowotworzenia. Badania nasze polegały na porównawczej analizie normalnych mysich komórek ES (linia D3) i komórek EC (linia F9 wyprowadzona z raka embrionalnego u myszy) mającej na celu identyfikację wspólnych dla pluripotencjalności i tumorogenności markerów metabolicznych, jak i rządzących nimi mechanizmów. Badania prowadzone były przy zastosowaniu klasycznych metod biologii molekularnej i spektroskopii ^1H NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) (we współpracy z Prof. Ulrichem Guntherem, *Department of Biomolecular NMR Spectroscopy, Division of Cancer Studies, University of Birmingham, UK*).

Spektroskopia NMR, metoda pozwalająca w unikalny sposób na wgląd w metabolizm komórki, jest od niedawna używana jako cenne narzędzie w fenotypowej charakterystyce nowotworów, jak i linii komórkowych, włącznie z komórkami macierzystymi i ich pochodnymi. Istnieją liczne doniesienia, że w guzach złośliwych i ich *in vitro* modelach, zmiany w widmie ^1H NMR w zakresie choliny, związane przede wszystkim ze wzrostem zawartości fosfocholiny (Pcho), korelują ze stopniem zaawansowania nowotworu i jego potencjałem inwazyjnym. Wzrost poziomu Pcho jest w części przypisany zwiększonej aktywności kinazy choliny (ChoK), enzymu uważanego zarówno za wskaźnik prognostyczny, jak i cel terapii w wielu nowotworach. Ekspresja i aktywność ChoK są regulowane przez złożony kompleks sygnalizacyjny, którego jednym z głównych składników jest kinaza 3-fosfatydylo-inozytolu (PI3K). Podwyższona zawartość Pcho jest również cechą charakteryzującą nieodróżnicowane komórki ES, a PI3K/Akt szlak uważany jest za współodpowiedzialny za ich wysoki potencjał proliferacyjny i zdolność nowotworzenia. Wydaje się zatem, że metabolizm choliny, pluripotencjalność komórki i jej potencjał tumorogeny są ze sobą powiązane. Związek ten był przedmiotem naszych badań.

Wyniki analizy porównawczej widm ^1H NMR wykazały, że utracie pluripotencjalności, a zatem i potencjalnej złośliwości komórek, towarzyszą podobne zmiany w widmie ^1H NMR obu linii komórkowych i nie są one powiązane z aktywnością szlaku PI3K. Podobieństwo to dotyczy szczególnie metabolitów fosfocholiny, a konkretnie stosunku Pcho/GPcho (glicero-fosfato cholina). Wydaje się zatem, że niezależnie od mechanizmów regulujących syntezę *de novo* Pcho, Pcho/GPcho mógłby znaleźć zastosowanie jako 'metaboliczny marker' wspólny dla pluripotencjalności i nowotworzenia, potencjalnie przydatny w opracowywaniu bezpiecznych protokołów zastosowania komórek ES w terapii.

Wyniki tych badań zdają się mieć implikacje wykraczające poza ramy medycyny regeneracyjnej. Zgodnie z hipotezą Rakowych Komórek Macierzystych [ang. *Cancer Stem*

Cell (CSC) Hypothesis], istnieje wiele podobieństw, zarówno pod względem charakterystyk fenotypowych, jak i mechanizmów rządzących proliferacją i samoodnową pomiędzy nieodróżnionymi normalnymi i rakowymi komórkami macierzystymi. CSCs uważane są nie tylko za komórki inicjujące transformację nowotworową, ale również za przyczynę nieskuteczności terapii przeciwnowotworowych. Wzmoczone wysiłki skierowane są więc na poszukiwanie markera macierzystości (ang. *stemness*) wspólnego dla normalnych komórek macierzystych i CSCs. Wyniki rozległych analiz ekspresji genów i białek prowadzonych metodami biologii molekularnej nie są spójne, i jak dotąd, nie pozwalają na stworzenie jednoznacznej molekularnej definicji macierzystości. Wydaje się, że istnieje konieczność integracji różnych podejść, w tym opartej na NMR analizie metabolizmu komórki, w celu ustalenia kryteriów określających ‘prawdziwe’ komórki macierzyste. Wyniki nasze mogą pomóc poszukiwaniom tym zbliżyć się do celu (50).

5.5. Tetraspaniny w nowotworach nabłonkowych

Tematyka ta, którą zajmuję się do dzisiaj, wynikała ze współpracy z grupą dr. Fedora Berditchevskiego w *School of Cancer Studies, University of Birmingham, UK*, którą podjęłam w 2005 r. Związany z nią dorobek (*Tetraspanina CD151 w raku piersi*: Sadej i wsp. *Mol Cancer Res* 2009 (17); Sadej i wsp. *Cancer Res* 2010 (16); Novitskaya i wsp. *Cancer Res* 2010 (11)) opisany jest szczegółowo we wstępie do omówienia osiągnięcia naukowego (pkt. 4.c). Badania nad rolą CD151 w raku piersi są nadal przeze mnie kontynuowane we współpracy z grupami dr. Fedora Berditchevskiego (University of Birmingham, UK), Profs. Valerie Speirs i Andrew Hanby (University of Leeds, UK), Prof. dr hab. n. med. Piotra Potemskiego (Uniwersytet Medyczny w Łodzi), dr. Rafała Sądeja (Uniwersytet Medyczny w Gdańsku) i dr. Janusza Kopczyńskiego (Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach). Praca dotycząca roli oddziaływań pomiędzy ErbB2/ErbB3 i kompleksem tetraspanina CD151/integriny wiążące lamininę w raku sutka jest na ukończeniu.

W roku 2013 otrzymałam grant badawczy (Opus, NCN) dotyczący profilu morfologicznego i molekularnego cech inwazyjności raków przewodowych in situ (DCIS). Analizy materiału tkankowego i mechanizmów molekularnych rządzących inwazyjną progresją DCIS są toku.

Udział w projektach i grantach badawczych

Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

Kierowanie projektami badawczymi:

- **krajowymi**

OPUS – NCN (Nr. Rej.: 2013/09/B/NZ4/02512) (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2013-2016): „Analiza profilu morfologicznego i molekularnego cech inwazyjności raków przewodowych *in situ* (DCIS) — znaczenie prognostyczne.” **Kierownik projektu.**

- **międzynarodowymi**

THE RAYNAUD’S & SCLERODERMA ASSOCIATION GRANT (Imperial College London, UK, 1997-1999): “The role of iNOS in pathogenesis of lung fibrosis.” **Kierownik projektu i główny wykonawca.**

SIR JULES THORN’S CHARITABLE TRUST GRANT (Imperial College London, UK, 1994-1997). “Neuropeptides in congenital aganglionosis”. **Kierownik projektu i główny wykonawca.**

Udział w projektach badawczych

OPUS - NCN (Nr rej 2011/01/B/NZ4/04910) (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2011-2014): „Rola oddziaływań pomiędzy ErbB2/ErbB3 i kompleksem tetraspanina CD151/integryny wiążące lamininę w raku sutka: Implikacje dla prognozowania i terapii”. **Główny wykonawca i redaktor wniosku.**

HOMING PLUS, FNP (HOMING PLUS) (Projekt we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Gdańsku i Institute for Cancer Studies, Birmingham, Wielka Brytania, 2010-2012): “The role of tetraspanin CD151 in prostate cancer cells migration and invasion – implications for tumour prognostication”. **Wykonawca projektu.**

HARMONIA — NCN (2012/06/M/NZ3/00023) (Projekt we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Gdańsku, 2013-2016): „Udział tetraspaniny CD151 w regulacji funkcji FGFR2 w progresji raka piersi — analiza *in vitro*, w modelu mysim oraz materiale klinicznym”. **Wykonawca projektu.**

THE UNIVERSITY HOSPITAL BIRMINGHAM CHARITIES’ FUND NO14-3-150 (University of Birmingham, UK, 2009-2010): “The role of tetraspanins in pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma.” **Główny wykonawca.**

Nagrody i wyróżnienia

Jules Thorn PhD Scholarship, Imperial College London 1994

Raynaud's & Scleroderma Association Scholarship, Imperial College London 1999

Award for Teaching Excellence in Medical Education, Imperial College London 2002

Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za działalność naukową 2013

Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za działalność naukową 2014

- (1) Hasegawa H, Watanabe H, Nomura T *et al.* Molecular cloning and expression of mouse homologue of SFA-1/PETA-3 (CD151), a member of the transmembrane 4 superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1997;1353:125–130.
- (2) Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:801-11.
- (3) Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11:428-42.
- (4) van Spriël AB. Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem Soc Trans* 2011;39:512-7.
- (5) Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem* 1997;45:515-25.
- (6) Lazo PA. Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer Sci* 2007;98:1666-77.
- (7) Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:40-55.
- (8) Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Sanchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol* 2009;19:434-46.
- (9) Sterk LM, Geuijen CA, van den Berg JG, Claessen N, Weening JJ, Sonnenberg A. Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J Cell Sci* 2002;115:1161-73.
- (10) Johnson JL, Winterwood N, DeMali KA, Stipp CS. Tetraspanin CD151 regulates RhoA activation and the dynamic stability of carcinoma cell-cell contacts. *J Cell Sci* 2009;122:2263-73. *in situ. Cancer Res* 2010;70:4698-708.
- (11) Novitskaya V, Romanska H, Dawoud M, Jones JL, Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates growth of mammary epithelial cells in three-dimensional extracellular matrix: implication for mammary ductal carcinoma
- (12) Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, Ishida H, Taki T, Tachibana S, et al. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:4109-14.
- (13) Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, et al. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* 2003;89:158-67.
- (14) Ke AW, Shi GM, Zhou J, Wu FZ, Ding ZB, Hu MY, et al. Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49:491-503.
- (15) Ang J, Lijovic M, Ashman LK, Kan K, Frauman AG. CD151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1717-21.
- (16) Sadej R, Romanska H, Kavanagh D, Baldwin G, Takahashi T, Kalia N, et al. Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis. *Cancer Res* 2010;70:6059-70.
- (17) Sadej R, Romanska H, Baldwin G, Gkirtzimanaki K, Novitskaya V, Filer AD, et al. CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. *Mol Cancer Res* 2009;7:787-98.
- (18) Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reichner J, Hemler ME. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* 1998;9:2751-65.
- (19) Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME. Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem* 2000;275:9230-8.

- (20) Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ. Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* 2001;276:41165-74.
- (21) Stipp CS. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e3.
- (22) Winterwood NE, Varzavand A, Meland MN, Ashman LK, Stipp CS. A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol Biol Cell* 2006;17:2707-21.
- (23) Yang XH, Richardson AL, Torres-Arzayus MI, Zhou P, Sharma C, Kazarov AR, et al. CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Res* 2008;68:3204-13.
- (24) Takeda Y, Kazarov AR, Butterfield CE, Hopkins BD, Benjamin LE, Kaipainen A, et al. Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood* 2007;109:1524-32.
- (25) Yamada M, Sumida Y, Fujibayashi A, Fukaguchi K, Sanzen N, Nishiuchi R, et al. The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. *FEBS J* 2008;275:3335-51.
- (26) Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 23):4143-4151.
- (27) Sadej R, Grudowska A, Turczyk L, Kordek R, Romanska HM. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. *Lab Invest* 2014;94:41-51.
- (28) Charrin S, Le NF, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web 3. *Biochem J* 2009;420:133-54.
- (29) Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1189-205.
- (30) Wright MD, Moseley GW, van Spruiel AB. Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* 2004;64:533-42.
- (31) Chang YC, Nieh S, Chen SF, Jao SW, Lin YL, Fu E. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2010;57:295-303.
- (32) Jakobsson PA. Histologic grading of malignancy and prognosis in glottic carcinoma of the larynx. *Can J Otolaryngol* 1975;4:885-92.
- (33) Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:432-7.
- (34) Bacchiocchi R, Rubini C, Pierpaoli E, Borghetti G, Procacci P, Nocini PF, et al. Prognostic value analysis of urokinase-type plasminogen activator receptor in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2008;8:220.
- (35) Deng X, Li Q, Hoff J, Novak M, Yang H, Jin H, et al. Integrin-associated CD151 drives ErbB2-evoked mammary tumor onset and metastasis. *Neoplasia* 2012;14:678-89.
- (36) Yang XH, Flores LM, Li Q, Zhou P, Xu F, Krop IE, et al. Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists. *Cancer Res* 2010;70:2256-63.
- (37) Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5974-9.
- (38) Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58-68.
- (39) Weigelt B, Geyer FC, Natrajan R, Lopez-Garcia MA, Ahmad AS, Savage K, et al. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. *J Pathol* 2010;220:45-57.
- (40) Sikora MJ, Cooper KL, Bahreini A, Luthra S, Wang G, Chandran UR, et al. Invasive lobular carcinoma cell lines are characterized by unique estrogen-mediated gene expression patterns and altered tamoxifen response. *Cancer Res* 2014;74:1463-74.

- (41) Romanska HM, Bishop AE, Brereton RJ, Spitz L, Polak JM. Immunocytochemistry for neuronal markers shows deficiencies in conventional histology in the treatment of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1993;28:1059-62.
- (42) Romanska HM, Bishop AE, Moscoso G, Walsh FS, Spitz L, Brereton RJ, et al. Neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in nerves and muscle of developing human large bowel. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;22:351-8.
- (43) Romanska HM, Ikonen TS, Bishop AE, Morris RE, Polak JM. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in fibroblasts parallels the onset and progression of fibrosis in an experimental model of post-transplant obliterative airway disease. *J Pathol* 2000;191:71-7.
- (44) Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, et al. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol* 2002;197:372-9.
- (45) Ali NN, Edgar AJ, Samadikuchaksaraei A, Timson CM, Romanska HM, Polak JM, et al. Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2002;8:541-50.
- (46) Van Vranken BE, Romanska HM, Polak JM, Rippon HJ, Shannon JM, Bishop AE. Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium. *Tissue Eng* 2005;11:1177-87.
- (47) Nightingale J, Chaudhary KS, Abel PD, Stubbs AP, Romanska HM, Mitchell SE, et al. Ligand activation of the androgen receptor downregulates E-cadherin-mediated cell adhesion and promotes apoptosis of prostatic cancer cells. *Neoplasia* 2003;5:347-61.
- (48) El Sheikh SS, Romanska HM, Abel P, Domin J, Lalani e. Predictive value of PTEN and AR coexpression of sustained responsiveness to hormonal therapy in prostate cancer--a pilot study. *Neoplasia* 2008;10:949-53.
- (49) Romanska H, Salagierski M, Bruton R, Abel P, Sosnowski M, Lalani E.-N. Doxazosin induces apoptosis in PTEN-positive androgen-independent PC cells via inhibition of Akt activation. *Cent European J Urol* 2010 (63):91-97.
- (50) Romanska HM, Tiziani S, Howe RC, Gunther UL, Gulzar Z, Lalani e. Nuclear magnetic resonance detects phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent traits common to pluripotent murine embryonic stem cells and their malignant counterparts. *Neoplasia* 2009;11:1301-8.

hadi, 18.12.2015

H. Romanska-Klipt