



# AUTOREFERAT

Dr n. med. w zakresie biologii medycznej

**Dorota Pastuszek-Lewandoska**

Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny

Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, lipiec, 2017

### 1. Imię i nazwisko

Dorota Pastuszek-Lewandoska

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

- 1991 stopień magistra biologii; tytuł pracy magisterskiej: *Metody rozpoznawania aneuploidii chromosomu X i genopatii sprzężonych z płcią.*
- 2011 stopień doktora n. medycznych w zakresie biologii medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski; tytuł rozprawy doktorskiej: *Analiza efektu epimutacji sekwencji promotorowych wybranych genów supresorowych (RASSF1A, VHL, CDH1) jako przyczyny zmiany ich ekspresji w łagodnych i złośliwych nowotworach tarczycy oraz w wolu guzkowym.*

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

- 1991 – 1992 Instytut Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Getyndze, Niemcy (Institut für Humangenetik der Universität Göttingen), staż
- 1992 – 2001 Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Instytut Nauk Podstawowych Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi, pracownik naukowo-dydaktyczny
- 2001 – 2009 Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, mł. asystent
- 2006 – 2009 Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pracownia Endokrynologii Molekularnej, pracownik naukowo-dydaktyczny; od 2008 na stanowisku naukowo-technicznym
- od 2009 Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny, I Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, specjalista naukowo-techniczny, od czerwca 2014 – na stanowisku adiunkta; w czerwcu 2017 Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny został włączony do **Katedry Biologii i Parazytologii Lekarskiej UM**

### Pełnione funkcje

- od 2.12.2015 p.o. kierownika **Uczelnianego Laboratorium Antropometrii Trójwymiarowej CDUM w Łodzi**

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji obejmujących zagadnienie pt:

**ANALIZA MECHANIZMÓW GENETYCZNYCH I EPIGENETYCZNYCH UCZESTNICZĄCYCH W ETIOPATOGENEZIE NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA**

b) autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Wskaźnik Impact Factor oraz punkty MNiSW podane są z roku publikacji.

1. **Pastuszek-Lewandoska D**, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska D, Kiszalkiewicz J, Kordiak J, Antczak A, Górski P, Brzezińska-Lasota E. Decreased FAM107A Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 852:39-48. doi: 10.1007/5584\_2014\_109.

**IF 2015: 1,953                      MNiSW 2015: 25**

2. **Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska-Senderowska D, Kiszalkiewicz JM, Antczak A, Górski P, Brzezińska-Lasota E. Expression analysis of 3 miRNAs, miR-26a, miR-29b and miR-519d, in relation to MMP-2 expression level in non-small cell lung cancer patients - a pilot study. *Med Oncol.* 2016; 33(8):96. doi: 10.1007/s12032-016-0815-z.

*W publikacji znajduje się oświadczenie, że udział dwóch pierwszych autorów jest równocenny*

**IF 2016: 2,634                      MNiSW 2015: 20**

3. **Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Antczak A, Górski P, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, Domańska D, Brzezińska-Lasota E. Quantitative analysis of mRNA expression levels and DNA methylation profiles of three neighboring genes: FUS1, NPRL2/G21 and RASSF1A in non-small cell lung cancer patients. *Respir Res.* 2015; 16:76. doi: 10.1186/s12931-015-0230-6.

*W publikacji znajduje się oświadczenie, że udział dwóch pierwszych autorów jest równocenny*

**IF 2015: 3,751                      MNiSW 2015: 35**

4. **Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Antczak A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Górski P, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, Domańska-Senderowska D, Brzezińska-Lasota E. Expression level and methylation status of three tumor suppressor genes, DLEC1, ITGA9 and MLH1, in non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2016; 33(7):75. doi: 10.1007/s12032-016-0791-3.

*W publikacji znajduje się oświadczenie, że udział dwóch pierwszych autorów jest równocenny*

**IF 2016: 2,634**

**MNiSW 2015: 20**

5. Antczak A, **Pastuszek-Lewandoska D**, Górski P, Domańska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, Nawrot N, Kordiak J, Brzezińska E. CTLA-4 Expression and Polymorphisms in Lung Tissue of Patients with Diagnosed Non-Small-Cell Lung Cancer. *Biomed Res Int. (Journal of Biomedicine and Biotechnology)* 2013; 2013:576486. doi: 10.1155/2013/576486.

*W publikacji znajduje się oświadczenie, że udział dwóch pierwszych autorów jest równocenny*

**IF 2013: 2,706**

**MNiSW 2013: 30**

6. Dutkowska A, Antczak A, **Pastuszek-Lewandoska D**, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Górski P, Kordiak J, Nawrot E, Brzezińska-Lasota E. RAR $\beta$  Promoter Methylation as an Epigenetic Mechanism of Gene Silencing in Non-small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;878:29-38.

**IF 2016: 1,881**

**MNiSW 2016: 25**

7. Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Domańska D, **Pastuszek-Lewandoska D**, Dutkowska A, Kordiak J, Nawrot E, Kiszalkiewicz J, Antczak A, Górski P, Brzezińska-Lasota E. FHIT promoter methylation status, low protein and high mRNA levels in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2016;49(3):1175-84. doi: 10.3892/ijo.2016.3610.

**IF 2016: 3,079**

**MNiSW 2015: 25**

8. Antczak A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, **Pastuszek-Lewandoska D**, Nawrot E, Domańska D, Kordiak J, Górski P, Brzezińska E. Significant frequency of allelic imbalance in 3p region covering RAR $\beta$  and MLH1 loci in non-small lung cancer. *Med Oncol.* 2013;30(2):532. doi: 10.1007/s12032-013-0532-9.

**IF 2013: 2,058**

**MNiSW 2013: 20**

9. Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Antczak A, **Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Nawrot E, Domańska D, Kaleta D, Górski P, Brzezińska EB. Allelic imbalance in 1p, 7q, 9p, 11p, 12q and 16q regions in non-small cell lung carcinoma and its clinical association: a pilot study. *Mol Biol Rep.* 2013; 40(12):6671-84. doi: 10.1007/s11033-013-2782-1.

**IF 2013: 1,958**

**MNiSW 2013: 20**

Sumaryczny Impact Factor prac oryginalnych zgłoszonych jako osiągnięcie **IF = 22,654** z roku publikacji, **liczba punktów MNiSW = 220** z roku publikacji.

Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład w powstanie publikacji naukowych dołączono w Załączniku 6.

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

## **1. Wprowadzenie i motywacja badań.**

### **1.1. Charakterystyka raka płuca**

Rak płuca jest nowotworem pierwotnym, który wywodzi się z komórek nabłonkowych. Ze względu na odrębne cechy biologiczne, przebieg kliniczny i wynikające z tego odmienne sposoby leczenia, rozróżnia się dwa główne typy raka płuca: niedrobnokomórkowy i drobnokomórkowy. Ponad 80% wszystkich rozpoznanych nowotworów płuca należy do grupy niedrobnokomórkowych nowotworów płuca, 17% to raki drobnokomórkowe; 3% przypadków obejmuje inne, nieokreślone typy nowotworów płuca, łącznie z mięsakami i rakowiakami [1].

Raka drobnokomórkowego płuca (SCLC, *small cell lung cancer*) charakteryzuje duża dynamika wzrostu oraz skłonność do wczesnego rozsiewu. Ten typ raka płuca jest wrażliwy na działanie leków cytostatycznych i promieniowanie jonizujące, a metoda leczenia zwykle opiera się na zastosowaniu radio- i chemioterapii w leczeniu skojarzonym.

Rak niedrobnokomórkowy płuca (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) jest najczęstszą postacią raka płuca. W tej grupie rozróżnia się trzy podtypy: rak płaskonabłonkowy (SCC, *squamous cell carcinoma*), rak gruczołowy (gruczolakorak) (AC, *adenocarcinoma*) i rak wielkokomórkowy (LCC, *large cell carcinoma*). Rak płaskonabłonkowy stanowi 25-30% wszystkich przypadków raka płuca. Wzrost raka płaskonabłonkowego jest stosunkowo wolny, a jego rozwój rozpoczyna się zwykle w jednym z większych oskrzeli. Najczęstszym typem raka płuca jest gruczolakorak, który stanowi 40% wszystkich przypadków raka płuca, zarówno u osób palących, jak i nie palących, u mężczyzn i u kobiet, bez względu na wiek [2]. W porównaniu z innymi typami raka płuca, rak gruczołowy rośnie wolniej i częściej jest identyfikowany ze względu na rozsiew poza tkankę płuca. W przeciwieństwie do gruczolakoraka, który swój wzrost rozpoczyna na obwodzie płuca, rak wielkokomórkowy rozwija się centralnie w płucu oraz charakteryzuje się szybkim wzrostem i rozsiewem, stanowi 5-10% wszystkich przypadków raka płuca i często rozpoznawany jest poprzez wykluczenie innych typów raka. Często daje odległe przerzuty i silnie wiąże się z paleniem papierosów [3].

## 1.2. Epidemiologia raka płuca

Rak płuca, w skali światowej, jest najczęstszą przyczyną śmierci z powodu nowotworów złośliwych, obok raka prostaty i jelita grubego wśród mężczyzn oraz raka piersi i raka jelita grubego wśród kobiet. Te cztery typy nowotworów odpowiadają za 46% wszystkich zgonów nowotworowych, przy czym sam rak płuca stanowi przyczynę ponad 1/4 tych przypadków (27%) [4]. W Polsce dane Krajowego Rejestru Nowotworów za 2012 rok wskazują, że zachorowania na raka płuca stanowiły ponad 14% ze wszystkich 152 855 przypadków zachorowań na nowotwory złośliwe wśród polskich pacjentów. Nowotwory złośliwe płuca są przyczyną około 21% zachorowań i 31% zgonów wśród mężczyzn oraz 9% zachorowań i 15% zgonów wśród kobiet. Ryzyko zachorowania na raka płuca wzrasta z wiekiem, większość zachorowań na nowotwory złośliwe płuca występuje po 50. roku życia, przy czym około 50% zachorowań u obu płci przypada na populację osób po 65. roku życia. Zachorowalność i umieralność na raka płuca u mężczyzn zwiększała się do początku lat 90-tych XXw., obecnie zachorowalność wśród mężczyzn kształtuje się na tym samym poziomie (średnio około 15 100 nowych przypadków rocznie), natomiast zachorowania i zgony na raka płuca wśród kobiet charakteryzuje niewielki trend wzrostowy (o około 4% rocznie) [5].

Przeżycia 5-letnie wśród polskich pacjentów z nowotworami płuca w ciągu pierwszej dekady XXI u mężczyzn wzrosły z 10,8% do 11,9%, natomiast u kobiet wzrosły z 15,7 % do 16,9%. U obu płci 5-letnie przeżycie jest jednak krótsze niż przeciętne dla krajów Unii Europejskiej czy USA, gdzie odsetek 5-letnich przeżyć wynosi 18% [4]. Tak niskie wskaźniki wynikają, przynajmniej częściowo, z faktu, że ponad połowa przypadków raka płuca jest diagnozowana na późnym etapie rozwoju.

Poprawa wyników leczenia pacjentów z rakiem płuca zależeć będzie od profilaktyki pierwotnej (walka z nałogiem palenia tytoniu), skutecznej profilaktyki wtórnej (badania przesiewowe) oraz możliwości wprowadzenia zindywidualizowanego, celowanego leczenia w oparciu o typowanie genetyczne i markery molekularne.

## 1.3. Czynniki ryzyka

Najbardziej powszechnym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka płuca jest palenie tytoniu, również bierne. Pomimo postępu związanego z porzucaniem nałogu przez wiele osób, wciąż 80% zgonów z powodu raka płuca spowodowane jest paleniem papierosów. Na drugim miejscu klasyfikuje się kontakt z kancerogennymi substancjami chemicznymi i pierwiastkami promieniotwórczymi, jak również zanieczyszczenie środowiska, przede wszystkim – powietrza. Pozostałymi czynnikami zwiększającymi ryzyko zachorowania na raka płuca są: uwarunkowania genetyczne, wiek i wcześniej przebyte nowotwory [6].

#### **1.4. Diagnostyka raka płuca**

Podejrzenie raka płuca opiera się na wywiadzie, badaniu przedmiotowym i badaniach obrazowych. Ostateczne rozpoznanie ustalane jest na podstawie badania mikroskopowego materiału pozyskanego od pacjenta (plwocina, materiał biopsyjny z guza).

Badanie histologiczne ma na celu rozróżnienie drobno- i niedrobnokomórkowego raka płuca oraz ocenę zaawansowania choroby w momencie jej wykrycia. Podstawą stosowanego w klinice różnicowania NSCLC i SCLC są charakterystyczne cechy biologiczne i kliniczne raka niedrobnokomórkowego płuca, takie jak: wysoki wskaźnik proliferacji, krótki czas podwojenia masy guza, zwiększona skłonność do tworzenia wczesnego rozsiewu krwiopochodnego, chemiowrażliwość i promieniowrażliwość. Ustalenie stopnia zaawansowania raka płuca opiera się na klasyfikacji TNM, która uwzględnia wielkość guza i jego stosunek do otaczających struktur (cecha T), obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych klatki piersiowej (cecha N) oraz przerzutów w odległych narządach (cecha M).

Ograniczona skuteczność diagnostyki i leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca jest głównie spowodowana trudnością w odróżnianiu podtypów i ograniczoną wiedzą na temat mechanizmów patogenezy podtypów NSCLC. Różnice pomiędzy rakiem gruczołowym (AC) i rakiem płaskonabłonkowym (SCC) mogą być odzwierciedlone na poziomie komórkowym i molekularnym. Tradycyjne metody polegają na wizualnej ocenie morfologii komórek (wielkość guza i cechy histologiczne), jednak różnice morfologiczne pomiędzy podtypami NSCLC nie są jasne [7]. Znaczenie dokładnego różnicowania podtypów NSCLC wiąże się z wyborem odpowiedniej i skutecznej metody leczenia. Dynamiczny rozwój nauk genetycznych daje nadzieję, że osiągnięcia biologii molekularnej i analiza danych na poziomie molekularnym (mRNA, mikroRNA, metylacja DNA) przyniesie przełom w diagnostyce raka płuca, umożliwi modyfikację klasyfikacji oraz zaoferuje nowe możliwości w terapii tego nowotworu.

#### **1.5. Poszukiwanie biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w raku płuca**

Rokowanie u pacjenta z rakiem płuca zależy przede wszystkim od pierwotnego stopnia zaawansowania i typu histopatologicznego nowotworu, natomiast wiek i płeć mają mniejsze znaczenie. Szereg wspomnianych już czynników, takich jak: (a) późne rozpoznanie, (b) mały odsetek chorych kwalifikujących się do leczenia chirurgicznego, (c) niski wskaźnik 5-letniego przeżycia, (d) brak uniwersalnego badania przesiewowego w kierunku wczesnego wykrywania raka płuca, sprawia, że uzasadnione jest poszukiwanie molekularnych markerów, które byłyby wczesnymi molekularnymi markerami diagnostycznymi związanymi z inicjacją i/lub progresją NSCLC. Jest to szczególnie ważne, gdy na wczesnym etapie rozwoju guz nie daje objawów klinicznych – tak jak w przypadku SCC, który pozostaje zmianą bezobjawową aż do osiągnięcia dużych rozmiarów, kiedy zabieg

chirurgiczny nie przyniesie efektu. Ponadto, chociaż palenie papierosów jest uznanym czynnikiem ryzyka, nie u wszystkich palaczy dochodzi do rozwoju raka płuca – stąd konieczne są swoiste i czułe testy, które pozwolą zidentyfikować tych palaczy, u których ryzyko rozwoju choroby nowotworowej jest wysokie.

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się dynamiczny rozwój badań w kierunku opracowania informatywnych, molekularnych markerów diagnostycznych w różnych typach nowotworów. Biomarker, zanim zostanie uznany za użyteczny do wykorzystania w praktyce klinicznej, musi odznaczać się szeregiem złożonych cech: w sposób jednoznaczny musi charakteryzować określoną, istotną pod względem klinicznym, cechę guza (stopień zaawansowania, wrażliwość lub oporność na leczenie, potencjał przerzutowania), musi posiadać wysoką czułość i specyficzność, co ma przełożenie na wiarygodność diagnostyczną oraz cechować się łatwością oznaczania (nieinwazyjne metody pobierania materiału biologicznego i jego dostępność) i niskimi kosztami procedury.

Dostępne, nowoczesne techniki biologii molekularnej umożliwiają efektywne i wiarygodne badania zmian genetycznych i epigenetycznych w tkance nowotworowej płuca, jak również w surowicy i osoczu krwi, płwocinie, popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych. Wśród zmian molekularnych w NSCLC do najczęstszych należą: mutacje onkogenów (np. *EGFR*, *KRAS*, *MYC*, *TP53*), niestabilność genetyczna (np. LOH w 3p), modyfikacje ekspresji genów supresorowych, onkogenów czy genów naprawy DNA wynikające z hipermetylacji ich regionów promotorowych (np. *RASSF1A*, *APC*, *DAPK*, *p16INK4A*, *hMLH1*, *ERCC1*) czy aktywności miRNA (np. miR-25, miR-100, miR-223, miR-449a).

Molekularne techniki analizy ekspresji genów na poziomie transkrypcji, takie jak RT-PCR, qPCR, mikromacierze oligonukleotydowe, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next-generation sequencing*) umożliwiają jednoczesną analizę poziomu mRNA dla setek, a nawet tysięcy genów. Wyniki tych badań mogą umożliwić modyfikację klasyfikacji histologicznej i zaawansowania rozwoju raka płuca o kryteria molekularne. Już kilka lat temu wykazano istnienie kilku, różniących się rokowaniem, „molekularnych podtypów” gruczolowego raka płuca [8,9], jak i 3 różne profile ekspresji genów związane z rokowaniem w odniesieniu do płaskonabłonkowego raka płuca [10-12].

Dane z ostatnich lat wskazują, że miRNA spełniają wymagania „idealnych biomarkerów” ze względu, m.in., na swoją znaczną stabilność, dużo większą niż mRNA, obecność w płynach ustrojowych, co stwarza możliwość ich badania nie tylko w tkance, ale i w osoczu, surowicy czy płwocinie oraz swoistość nowotworową, a więc możliwość diagnostyki guzów na podstawie profili ekspresji miRNA. W raku płuca poszukiwanie miRNA o potencjalnej roli biomarkerów pozwoliło zidentyfikować różne miRNA, których ekspresja jest zwiększona lub zmniejszona u pacjentów z NSCLC w stosunku do zdrowych kontroli [13-15]. Niektóre z nich stanowią potencjalne biomarkery diagnostyczne NSCLC, służące do identyfikacji nowotworu we wczesnym stadium lub różnicowania podtypów histologicznych.



## 2. Cel badań i streszczenie kluczowych wyników

Celem przeprowadzonych badań, prezentowanych jako osiągnięcie naukowe, było poszukiwanie markerów molekularnych wspomagających wczesną diagnostykę NSCLC i/lub markerów o znaczeniu prognostycznym, skorelowanych z rozwojem guza i/lub ryzykiem przerzutowania.

Materiałem do badań były fragmenty tkanki płuca (100-150 mg) pobrane podczas zabiegu pneumektomii/lobektomii od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca, operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej, Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2011-2013.

Od każdego pacjenta – oprócz fragmentu tkanki z ogniska pierwotnej zmiany – pobrano także fragment tkanki niezmięnionej makroskopowo (pochodzący z otaczającego zmianę marginesu operacyjnego), co pozwoliło utworzyć grupę kontrolną.

Wyniki badań histopatologicznych umożliwiły podział tkanek na grupy: SCC (rak płaskonabłonkowy), AC (gruczolakorak) i LCC (rak wielkomórkowy). Materiał tkankowy został pogrupowany zgodnie z klasyfikacjami AJCC i pTNM.

Pacjentów scharakteryzowano pod względem wieku, płci i palenia papierosów. Kryterium podziału palaczy była też liczba paczkolet (1 paczkolet to 20 papierosów wypalanych dziennie przez 1 rok).

Zastosowane metody badawcze, po wyizolowaniu RNA i/lub DNA z materiału biologicznego, to: qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, PCR w czasie rzeczywistym) z wykorzystaniem sond TaqMan; MS-PCR (metylospecyficzny PCR) z zastosowaniem specjalnie zaprojektowanych starterów dla sekwencji zmetylowanych i niezmetrylowanych w obrębie promotora badanych genów; analiza LOH/MSI z użyciem markerów mikrosatelitarnych zaprojektowanych w oparciu o bazę danych NCBI i in.; analiza polimorfizmów genowych (SNP, *single nucleotide polymorphism*) z wykorzystaniem sond TaqMan; analiza poziomu immunoekspresji białek metodą ELISA.

### 2.1. Zaburzony poziom ekspresji genów supresorowych oraz stopień metylacji promotorowej TSG jako potencjalne biomarkery NSCLC

Geny supresorowe (TSGs, *tumour suppressor genes*) – określane mianem „strażników genomu” – odpowiadają za hamowanie fenotypu nowotworowego. Zaburzenia funkcji genów supresorowych regulujących cykl komórkowy prowadzą do pozbawienia komórki sygnałów ograniczających podział komórki i wywołujących apoptozę, a w efekcie do niekontrolowanej proliferacji komórkowej. Zgodnie z teorią „dwóch zdarzeń” Knudsona, do niekontrolowanej proliferacji komórek o zmienionym fenotypie konieczna jest utrata funkcji obu kopii genu supresorowego. Uważa się, że w

nowotworach sporadycznych hipermetylacja sekwencji promotorowej genu odpowiada za wyłączenie jednego z alleli, podczas gdy mutacja punktowa bądź utrata heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) stanowi drugie zdarzenie, inaktywujące aktywny dotąd allel genu. W przypadku niektórych genów obserwowana jest hipermetylacja obydwóch alleli.

W raku płuca istotną rolę pełnią TSGs zajmujące *loci* w krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p), gdzie występują liczne, tzw. regiony krytyczne. Dwa z nich zlokalizowano w 3p21.3: LUCA (*lung cancer region*) w regionie centromerowym (3p21C) oraz AP20 (*Alu-PCR clone 20 region*) w regionie telomerowym (3p21T), w których zidentyfikowano *loci* licznych potwierdzonych lub potencjalnych genów supresorowych [16].

Założeniem badań, których wyniki opisano w **publikacjach nr 1, 3, 4, 6, 7**, była analiza poziomu ekspresji mRNA 9 wybranych genów supresorowych (*RASSF1A*, *FUS1*, *NPRL2/G21*, *FAM107A*, *DLEC1*, *ITGA9*, *MLH1*, *RARβ*, *FHIT*) w tkance nowotworowej w korelacji z hipermetylacją sekwencji promotorowych badanych genów.

Jak wykazują badania prowadzone w liniach komórkowych płuca i guzach pierwotnych, wskaźnik występowania mutacji w genach supresorowych jest niski (<10%), co sugeruje większe znaczenie modyfikacji epigenetycznych wpływających na ekspresję TSG w karcynogenezie płuca [17]. Modyfikacjom epigenetycznym przypisuje się tak samo ważne znaczenie w inicjacji i progresji raka, jak zmianom genetycznym. A jak wykazały wyniki licznych badań, zmieniony poziom metylacji w obrębie sekwencji promotorowej TSG może stanowić idealny potencjalny marker diagnostyczny i prognostyczny w danym typie nowotworu [18].

Metylacja DNA, tj. kowalencyjne dołączenie grup metylowych w obrębie sekwencji CpG, jest najlepiej poznaną modyfikacją epigenetyczną u ludzi. Jest to proces enzymatyczny, w którym pośredniczą enzymy metylotransferazy DNA (DNMTs, *DNA methyltransferases*). Metylotransferaza DNA 1 (DNMT1) jest głównym enzymem odpowiedzialnym za kopiowanie wzoru metylacji, czyli za jego prawidłowe utrzymanie, natomiast rodzina enzymów DNMT3 (-3A i -3B) wykazuje aktywność metylacji *de novo*, wpływając na metylację tych wysp CpG, które w warunkach prawidłowych są niezmetylowane. Istotnym aspektem jest fakt, że metylotransferazy DNA nie tylko pełnią istotną rolę w karcynogenezie poprzez wpływ na modyfikacje wzorów metylacji DNA, ale również wydają się być obiecującymi biomarkerami molekularnymi w diagnostyce i terapii raków [19].

Metylacja wysp CpG zlokalizowanych w obrębie sekwencji promotora genu supresorowego (hipermetylacja promotorowa TSG) jest modyfikacją epigenetyczną mającą potencjalny wpływ na rozwój nowotworu poprzez hamujący wpływ na ekspresję genu supresorowego. Analiza hipermetylacji promotorowej TSG stwarza więc możliwość oszacowania ryzyka rozwoju nowotworu, wczesnego wykrycia, oceny progresji i rokowania, jak również daje możliwość zaplanowania i rozwoju postępowania terapeutycznego oraz monitorowania choroby po wdrożeniu leczenia. W rozwoju raku płuca genami, które często ulegają hipermetylacji promotorowej i które opisywane są w

piśmiennictwie jako potencjalne biomarkery są: *APC*, *CDH1*, *CDH13*, *DAPK1*, *FHIT*, *MGMT*, *p16INK4a*, *RARβ*, *RASSF1A*, *RUNX3* i *SHOX2* [17,20].

Wśród prezentowanych jako osiągnięcie naukowe publikacji pięć z nich (**publikacje nr 1, 3, 4, 6, 7**) łączy analizę względnej ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA (metoda qPCR) oraz analizę metylacji promotorowej badanych genów (metylospecyficzny PCR) jako możliwego mechanizmu wyciszenia ekspresji genów supresorowych w przebiegu karcynogenezy w tkance płuca. Dodatkowo w każdej pracy oszacowany jest stopień metylacji badanych genów, tj. Indeks Metylacji wskazujący % udział zmetylowanych alleli danego genu. Analizie poddano korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami (poziom ekspresji genu/poziom metylacji genu) a parametrami kliniczno-patologicznymi: histopatologiczna ocena guza (klasyfikacje pTNM i AJCC), podtyp histopatologiczny NSCLC, wiek i płeć pacjenta oraz historia palenia papierosów.

#### *Publikacja nr 1*

**Pastuszek-Lewandoska D**, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska D, Kiszalkiewicz J, Kordiak J, Antczak A, Górski P, Brzezińska-Lasota E. Decreased *FAM107A* Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;852:39-48. doi: 10.1007/5584\_2014\_109.

W pierwszej z przedstawionych jako osiągnięcie naukowe prac analizowane jest znaczenie genu *FAM107A* (*family with sequence similarity 107 member A*) w karcynogenezie płuca. Gen, zlokalizowany w 3p21.1, zaangażowany jest w regulację transkrypcji poprzez indukcję apoptozy, bądź poprzez mechanizm epigenetyczny oddziałując z kompleksem acetylotransferazy histonowej. Obniżony poziom ekspresji genu powiązany z rozwojem raków nabłonkowych, a najczęściej obserwowany mechanizm odpowiedzialny za wyciszenie genu to utrata heterozygotyczności w regionie z *locus FAM107A*. Ponieważ nie udało się zidentyfikować mutacji w genie, jako drugi mechanizm odpowiedzialny za jego wyciszenie, sugeruje się modyfikację epigenetyczną, tj. hipermetylację promotorową. Potwierdziły to badania przeprowadzone w kilku typach nowotworów, natomiast w raku płuca większość badań dotyczyła linii komórkowych [21-23]. Uzyskane wyniki były jednak zachęcające i sugerowały rolę zaburzonej funkcji genu w karcynogenezie płuca.

W prezentowanym jako osiągnięcie naukowe badaniu potwierdziliśmy niski poziom ekspresji genu *FAM107A* w tkance guza pierwotnego NSCLC, niezależnie od podtypu histopatologicznego czy wielkości guza (cecha T w klasyfikacji pTNM). Co ważne, zaobserwowaliśmy istotną różnicę w poziomie ekspresji genu pomiędzy tkanką nowotworową a tkanką niezmienną makroskopowo. Wyniki te potwierdzają znaczenie zaburzonej ekspresji genu *FAM107A* w rozwoju raka płuca.

Analizując poziom metylacji sekwencji promotorowej genu wykazaliśmy obecność zmetylowanych alleli tylko w 4 badanych próbach (7%) NSCLC. Co ciekawe, po obliczeniu Indeksu Metylacji (MI) okazało się, że we wszystkich tych przypadkach obydwa allele genu były

zmetylowane, tj. MI=1. W pozostałych jednak próbach nie stwierdziliśmy obecności zmetylowanych alleli (MI=0). Taki wynik może oznaczać, że w przypadku badanego genu supresorowego *FAM107A* mechanizm epigenetyczny nie odgrywa znaczącej roli w wyciszeniu ekspresji genu. Należy jednak podkreślić możliwość zaangażowania w inaktywację *FAM107A* innych procesów epigenetycznych, w tym modyfikację histonów (np. obecność dwóch grup metylowych przy lizynie 9 histonu H3, H3me2K9) i następczą reorganizację chromatyny w kierunku heterochromatyny, uniemożliwiająca rozpoczęcie transkrypcji czy regulację transkrypcji z udziałem miRNA czy lncRNA.

### *Publikacja nr 3*

**Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Antczak A, Górski P, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, Domańska D, Brzezińska-Lasota E. Quantitative analysis of mRNA expression levels and DNA methylation profiles of three neighboring genes: *FUS1*, *NPRL2/G21* and *RASSF1A* in non-small cell lung cancer patients. *Respir Res.* 2015;26;16:76. doi: 10.1186/s12931-015-0230-6.

Następna z przedstawionych jako osiągnięcie naukowe prac jest jednym z nielicznych opublikowanych badań, których celem było jednoczesne porównanie poziomu ekspresji kilku genów supresorowych zlokalizowanych w regionie 3p w pierwotnym raku płuca; podobnie, w nielicznych tylko pracach badano poziom metylacji więcej niż dwóch genów, o w/w lokalizacji chromosomowej. W badaniu analizowaliśmy także poziom ekspresji dwóch enzymów uczestniczących w procesie metylacji DNA: metylotransferazy DNA 1 (DNMT1) i metylotransferazy DNA 3B (DNMT3B). Badanymi genami supresorowymi były *FUS1*, *NPRL2/G21* i *RASSF1A* z regionu LUCA (3p21.3).

Spośród wybranych genów, gen *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1 isoform A*) o potwierdzonej roli supresorowej, odpowiedzialny za regulację cyklu komórkowego oraz aktywację TP53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, jest genem najczęściej badanym – na poziomie genetycznym, epigenetycznym, funkcjonalnym – w wielu typach nowotworów. Większość tych badań potwierdza utratę ekspresji genu, a najczęstszym mechanizmem odpowiedzialnym za wyciszenie genu jest hipermetylacja promotorowa, rzadko natomiast występują mutacje. Metaanaliza przeprowadzona w 2013 roku potwierdziła istotny związek pomiędzy metylacją *RASSF1A* a NSCLC [24], jednakże wyniki dotyczące wykorzystania epigenetycznej inaktywacji genu *RASSF1A* jako markera prognostycznego w NSCLC są wciąż niejednoznaczne.

W prezentowanym badaniu wykazaliśmy, że spośród badanych genów *RASSF1A* charakteryzował się najniższym poziomem ekspresji i najwyższym stopniem metylacji. Jednoczesne obniżenie ekspresji genu i obecność hipermetylacji promotorowej zaobserwowaliśmy w 71% badanych prób NSCLC. To w sposób pośredni potwierdza epigenetyczny mechanizm wyciszenia ekspresji *RASSF1A* w raku płuca.

Różnice w poziomie ekspresji *RASSF1A* pomiędzy podtypami NSCLC (najniższy poziom ekspresji w SCC), jak również pomiędzy guzem pierwotnym a otaczającą go tkanką niezmienną makroskopowo były statystycznie istotne. Analiza krzywej ROC dla genu *RASSF1A* – jako markera różnicującego tkankę nowotworową i tkankę niezmienną makroskopowo – wykazała czułość na poziomie 61%, swoistość: 73% i dokładność: 67% (AUC=0,695). Wynik ten może sugerować możliwość wykorzystania ekspresji genu *RASSF1A* jako markera potencjalnie użytecznego w diagnostyce. Ponadto, istotnie niższy poziom ekspresji *RASSF1A* stwierdziliśmy w guzach zaklasyfikowanych pod względem cechy T (wielkość guza w klasyfikacji pTNM) jako T2 w porównaniu do grupy T3/T4 – to może potwierdzać znaczenie zaburzonej funkcji genu na wczesnych etapach rozwoju raka płuca. Pod względem poziomu metylacji promotorowej zaobserwowana częstość występowania metylacji wynosiła 76%, co plasuje się blisko górnej granicy częstości metylacji *RASSF1A* opisywanej w piśmiennictwie światowym [25,26]. Oszacowany natomiast Indeks Metylacji genu przekroczył 50% (w zależności od podtypu histopatologicznego), co wskazuje, że ponad połowa alleli badanego genu charakteryzowała się hipermetylacją promotorową. Ten wskaźnik trudno nam jednak było porównać z wynikami innych badaczy z powodu braku tego typu analiz.

Kolejny z badanych genów, gen *FUS1* (*fused in sarcoma*), został zidentyfikowany jako gen supresorowy zaangażowany w proces apoptozy, a całkowitą bądź częściową utratę ekspresji białka FUS1 – powiązaną z gorszym rokowaniem – zaobserwowano w raku płuca [27]. Mało wiadomo na temat mechanizmów zaangażowanych w regulację ekspresji genu *FUS1* w raku płuca, brak jest również badań dotyczących zmian epigenetycznych. Wyniki uzyskane w prezentowanej jako osiągnięcie naukowe pracy wskazały statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji genu pomiędzy poszczególnymi podtypami NSCLC, przy czym najniższy poziom ekspresji dotyczył podgrupy SCC, co może podkreślać rolę zaburzonej ekspresji genu w płaskonabłonkowym raku płuca. Natomiast w podtypie NSCC istotne różnice stwierdziliśmy pomiędzy II a III stadium rozwoju guza (klasyfikacja AJCC), co z kolei sugeruje znaczenie zaburzonej funkcji genu na wczesnym etapie karcynogenezy. Analiza metylacji promotorowej genu ujawniła częstość występowania zmetylowanych alleli w 58% prób NSCLC, natomiast poziom metylacji genu mieścił się w zakresie 10-22% w zależności od podtypu histopatologicznego. Tym niemniej, to właśnie w przypadku tego genu, jako jedyne go spośród badanych, stwierdziliśmy odwrotną korelację pomiędzy poziomem ekspresji genu a stopniem metylacji. Dodatkowo, istotnie wyższy poziom metylacji genu w II stadium rozwoju guza (grupa SCC) w porównaniu do stadium III podtrzymuje znaczenie wyciszenia *FUS1A* na wczesnym etapie rozwoju raka płuca.

Trzeci z badanych genów, *NPRL2/G21* (*nitrogen permease regulator-like 2 gene*) jest genem supresorowym zaangażowanym w naprawę DNA, kontrolę cyklu komórkowego i apoptozę. Wyniki innych badaczy dotyczące poziomu ekspresji genu w raku płuca są rozbieżne [16,28], nie analizowano również mechanizmu epigenetycznego odpowiedzialnego za możliwą inaktywację genu w raku

pierwotnym płuca. W prezentowanym jako osiągnięcie naukowe badaniu nie stwierdziliśmy obniżonego poziomu ekspresji *NPRL2/G21*; pomimo tego występowały istotne różnice pomiędzy podtypami histopatologicznymi NSCLC, a najniższy poziom ekspresji dotyczył podgrupy SCC. Poziom metylacji promotorowej *NPRL2/G21*, zarówno pod względem częstości występowania zmetylowanych alleli, jak i stopnia metylacji genu, był bardzo niski (5%).

Analizując jednocześnie obniżenie poziomu ekspresji badanych genów, dodatnią korelację zaobserwowaliśmy w parach genów: *RASSF1A* i *NPRL2/G21* oraz *RASSF1A* i *FUS1*. Natomiast jednocześnie obniżenie poziomu ekspresji i metylacja regionu promotorowego TSG występowało w: 71% prób NSCLC dla genu *RASSF1A*, 20% prób NSCLC dla genu *FUS1* i 5% prób NSCLC dla genu *NPRL2/G21*.

Badając epigenetyczny mechanizm wyciszenia ekspresji TSG, jakim jest hipermetylacja promotorowa, analizie poddaliśmy także poziom ekspresji dwóch enzymów uczestniczących w procesie metylacji DNA: *DNMT1* i *DNMT3B*. Wysoki poziom ekspresji mRNA obydwóch enzymów zaobserwowaliśmy w większości badanych prób (w 75% prób NSCLC dla *DNMT1* i w 92% dla *DNMT3B*) oraz stwierdziliśmy dodatnią korelację pomiędzy nimi. Co ważne, różnice w poziomie ekspresji obydwóch genów pomiędzy grupą tkanek nowotworowych i niezmiennych makroskopowo były statystycznie istotne. Obserwacje wykazały ponadto wyższy poziom ekspresji *DNMT3B* w SCC niż w NSCC, oraz u pacjentów w wieku < 60 lat; jak również wyższy poziom ekspresji *DNMT1* w grupie guzów o I/II stopniu rozwoju (klasyfikacja AJCC), co może sugerować znaczenie procesu metylacji – prowadzące do wyciszenia TSGs – na wczesnym etapie rozwoju raka płuca.

#### *Publikacja nr 4*

**Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Antczak A, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Górski P, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, Domańska-Senderowska D, Brzeziańska-Lasota E. Expression level and methylation status of three tumor suppressor genes, *DLEC1*, *ITGA9* and *MLH1*, in non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2016;33(7):75. doi: 10.1007/s12032-016-0791-3.

Celem następnej z prac prezentowanych jako osiągnięcie naukowe była ocena poziomu ekspresji i stopnia metylacji trzech kolejnych genów supresorowych zlokalizowanych w regionie telomerowym krótkiego ramienia chromosomu 3 (3p21T), nazwanym *Alu-PCR clone 20 region* (AP20). Podobnie jak region centromerowy 3p (LUCA, lung cancer region), obejmujący *loci* genów analizowanych w **publikacjach nr 1 i 3**, region AP20 również jest tzw. regionem krytycznym, w którym często obserwowane są zdarzenia genetyczne i epigenetyczne w różnych typach nowotworów, co sugeruje obecność w tym regionie genów supresorowych, pełniących istotną rolę w blokowaniu karcynogenezy.

Genami wybranymi do analizy były: *DLEC1* (*deleted in lung and oesophageal cancer 1*), *ITGA9* (*integrin, alpha 9*) i *MLH1* (*mutL homolog 1*). Są to geny o uznanej roli supresorowej, hamujące

wzrost guza oraz przerzutowanie (*DLEC1*), kontrolujące proliferację i różnicowanie komórkowe (*ITGA9*) czy uczestniczące w systemie naprawy DNA (*MLH1*). Jednak opublikowane wyniki badań dotyczących poziomu ekspresji tych genów w raku płuca są rozbieżne, a podłoże molekularne odpowiedzialne za obniżenie ich ekspresji pozostaje niewyjaśnione. I choć modyfikacje epigenetyczne są opisywane jako mechanizm wyciszający ich ekspresję, obserwowany poziom metylacji genów jest różny, np. w przypadku *DLEC1* od 27% do 56% [29,30], a *MLH1* od 0% do 70% [31,32].

Wyniki uzyskane w naszym badaniu potwierdziły obniżony poziom ekspresji badanych genów, zwłaszcza *DLEC1* i *ITGA9* – co zaobserwowaliśmy, odpowiednio, w 78% i 71% prób NSCLC. Obniżoną ekspresję *MLH1* stwierdziliśmy jedynie w < 20% przypadków. Natomiast, zarówno gen *ITGA9* jak i *MLH1* wykazały istotnie niższy poziom ekspresji w SCC w porównaniu do NSCC. Co ważne, geny *DLEC1* i *ITGA9* miały istotnie niższy poziom ekspresji w tkance guza w porównaniu do tkanki otaczającej zmianę pierwotną, niezmienną makroskopowo. Jednoczesne obniżenie poziomu ekspresji *DLEC1* i *ITGA9* zaobserwowaliśmy w ponad 50% NSCLC i w niemal 77% SCC. To może sugerować możliwość włączenia obydwóch genów do panelu genów o znaczeniu diagnostycznym czy różnicującym podtypy histopatologiczne NSCLC.

Pod względem częstości metylacji, zaobserwowane przez nasz Zespół wartości przekraczały te opisywane w piśmiennictwie: częstość metylacji badanych genów wynosiła 57-84%, przy czym górną wartość osiągnęły geny *DLEC1* i *MLH1*. Jednoczesną metylację wszystkich genów stwierdziliśmy w ponad 50% prób NSCLC. Obliczony stopień metylacji badanych genów (% zmetylowanych alleli, wartość wskaźnika MI) wyniósł 26% w przypadku *DLEC1*, 34% dla *ITGA9* i 27% dla *MLH1*.

Jednoczesne obniżenie ekspresji genu *DLEC1* i obecność metylacji promotorowej genu zaobserwowaliśmy w 63% prób NSCLC, w przypadku genu *ITGA9* – w 40% NSCLC, a *MLH1* – w 6% NSCLC.

Dodatkowo, uzyskane wyniki wykazały istotnie wyższy stopień metylacji *DLEC1* w grupie guzów zaklasyfikowanych pod względem wielkości jako T2 w grupie SCC oraz w przypadku guzów w I stadium rozwoju w grupie NSCC. Taka zależność może wskazywać na znaczenie modyfikacji epigenetycznej genu *DLEC1* w inicjacji procesu nowotworowego w płucu. Wydaje się, że pod względem metylacji, gen *DLEC1* mógłby zostać uznany za marker o znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym w NSCLC.

Podobne znaczenie można przypisać genowi *ITGA9*, w przypadku którego niskiemu poziomowi ekspresji towarzyszył stosunkowo wysoki poziom metylacji (25-37%, w zależności od podtypu NSCLC), a jednoczesne obniżenie poziomu ekspresji i metylacja sekwencji promotorowej genu – wskazujące na epigenetyczny mechanizm wyciszenia *ITGA9* – zaobserwowaliśmy w ponad 50% prób SCC.

W przypadku trzeciego badanego genu, *MLH1*, który odgrywa ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu, wyniki badania przedstawianego jako osiągnięcie naukowe wskazują na istotnie

wyższy poziom metylacji w SSC o stopniu rozwoju I/II, co sugeruje znaczenie modyfikacji epigenetycznych genu *MLH1* na wczesnych etapach karcynogenezy w płucu. Ciekawą obserwacją dotyczącą tego genu jest niewielki odsetek prób NSCLC, w których poziom ekspresji genu był obniżony co najmniej dwukrotnie w porównaniu do kalibratora (3-6%, w zależności od podtypu histopatologicznego). Tylko badania przeprowadzone w populacji chińskiej [31] wykazały jednakowo wysoką metylację genu i wyciszenie jego ekspresji. Inne badania nie potwierdziły obniżenia ekspresji *MLH1*, pomimo znaczącej (72%) bądź umiarkowanej (35%) metylacji sekwencji promotorowej, co może sugerować, że ten typ modyfikacji epigenetycznej nie powoduje wyciszenia genu w raku płuca bądź też inne zmiany genetyczne poprzedzają zaburzenie ekspresji genu.

#### Publikacja nr 6

A.Dutkowska, A.Antczak, **D.Pastuszek-Lewandoska**, M.Migdalska-Sęk, K.H.Czarnecka, P.Górski, J.Kordiak, E.Nawrot, and E.Brzezińska-Lasota. *RARβ* Promoter Methylation as an Epigenetic Mechanism of Gene Silencing in Non-small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;878:29-38.

Gen *RARβ* (*retinoic acid receptor beta*) to kolejny gen supresorowy zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p24.2), odpowiedzialny za wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych, którego obniżoną ekspresję stwierdzono w wielu typach nowotworów, w tym w raku płuca, jak również zaobserwowano metylację promotorową jako mechanizm odpowiedzialny za wyciszenie genu.

Gen *RARβ* został wybrany do badania ze względu, z jednej strony, na potwierdzone znaczenie zaburzonej ekspresji i metylacji w nowotworzeniu, z drugiej strony – na brak podobnych analiz uwzględniających mechanizmy epigenetyczne w populacji polskich pacjentów z NSCLC. Wyniki pracy prezentowanej jako osiągnięcie naukowe, potwierdzają obniżoną ekspresję genu w tkance guza, w 38-80% prób NSCLC, w zależności od podtypu histopatologicznego. Różnice pomiędzy grupami SCC i NSCC były istotne statystycznie, przy czym niższy poziom ekspresji stwierdziliśmy w NSCC. Dodatkowo, w grupie NSCC zaobserwowaliśmy korelację z paleniem papierosów: istotnie niższy poziom ekspresji genu odnotowano w grupie pacjentów zakwalifikowanych do grupy < 40 paczkolet. Może to potwierdzać wpływ palenia (ilość wypalanych papierosów, czas palenia) na zwiększone ryzyko rozwoju raka płuca.

Analiza metylacji *RARβ* na podstawie wskaźnika metylacji (MI) wskazała na obecność co najmniej jednego zmetylowanego allelu genu w 85% prób NSCLC, natomiast obydwa zmetylowane allele (MI=1, 100% metylacji genu) odnotowaliśmy w 19% prób. Należy zwrócić uwagę, że w pracach innych badaczy brak jest skalkulowanego wskaźnika metylacji, a wykorzystanie tylko metody MSP pozwala na zaobserwowanie częstości metylacji, która w przypadku genu *RARβ* opisywana jest na poziomie 30-80% [33,34]. W prezentowanej jako osiągnięcie pracy, częstość metylacji *RARβ* wyniosła 65%.



Pod względem znaczenia metylacji genu *RARβ* jako wskaźnika o znaczeniu diagnostycznym lub prognostycznym, doniesienia innych badaczy są różne: część z nich wskazuje na zależność pomiędzy poziomem metylacji genu a stopniem rozwoju guza, inni nie znajdują takich korelacji. W prezentowanej pracy, w grupie SCC zaobserwowaliśmy istotnie wyższy poziom metylacji genu w grupie T1, co może wskazywać na znaczenie modyfikacji epigenetycznych genu *RARβ* na wczesnym etapie rozwoju raka płuca.

Natomiast brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji a metylacji sugeruje znaczenie innych zdarzeń genetycznych (LOH/MSI, SNP) bądź epigenetycznych (modyfikacje histonów, aktywność miRNA) odpowiedzialnych za obniżenie ekspresji badanego genu w NSCLC.

#### *Publikacja nr 7*

Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Domańska D, **Pastuszek-Lewandoska D**, Dutkowska A, Kordiak J, Nawrot E, Kiszalkiewicz J, Antczak A, Brzezińska-Lasota E. *FHIT* promoter methylation status, low protein and high mRNA levels in patients with non-small cell lung cancer.

Gen *FHIT* (member of the histidine triad gene family) zlokalizowany w 3p14.2, indukuje apoptozę i hamuje przerzutowanie komórek guza, reguluje aktywność kinazy serynowo-treoninowej Akt w szlaku PI3K; białko FHIT uczestniczy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, hamuje szlak sygnałowy Wnt.

Zaburzoną ekspresję genu *FHIT* odnotowano w kilku typach nowotworów. Wyniki badań w raku płuca są rozbieżne: obserwowany był związek braku ekspresji genu zarówno z agresywnością guza poprzez pobudzenie tranzycji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT, *epithelial mesenchymal transition*), jak i ze zmianami przednowotworowymi w oskrzelach. Nieroztrzygnięty jest również mechanizm wyciszenia genu: badacze wskazują na LOH bądź hipermetylację [35,36].

Wyniki analizy metylacji w pracy prezentowanej jako osiągnięcie naukowe wskazują na obecność zmetylowanych alleli genu *FHIT* zarówno w tkance guza (83% NSCLC), jak i w tkance otaczającej zmianę pierwotną (68% prób). Ale tylko w przypadku podtypu AC różnica w częstości metylacji genu pomiędzy tkanką nowotworową a niezmienioną makroskopowo była istotna statystycznie. Stopień metylacji genu, obliczony jako MI, był na umiarkowanym poziomie od 31% do 43%, w zależności od podtypu histopatologicznego NSCLC. Ciekawą obserwacją był zróżnicowany poziom metylacji w próbach NSCLC sklasyfikowanych zgodnie z cechą N (stopień zajęcia węzłów chłonnych). Wartość MI w grupie N0 wyniosła 53%, w N1 - 27%, w N2 - 22%. Co ważne, różnice pomiędzy grupą N0 i pozostałymi grupami były istotne statystycznie. Takie wyniki mogą wskazywać na udział epigenetycznych modyfikacji genu *FHIT* na wczesnym etapie rozwoju raka płuca oraz możliwość uznania genu jako markera o znaczeniu prognostycznym w NSCLC.

Umiarkowany stopień metylacji genu nie osiągnął przełożenia na poziom jego ekspresji. Należy podkreślić brak wcześniejszych badań korelujących poziom ekspresji genu ze stopniem metylacji

promotorowej zarówno w guzie, jak i w tkance otaczającej zmianę pierwotną. W prezentowanej pracy, najniższą ekspresję zaobserwowaliśmy w grupie SCC, choć jej poziom przekraczał wartość ekspresji kalibratora. To może sugerować aktywację genu *FHIT* w odpowiedzi na kumulację zmian genetycznych w trakcie karcynogenezy w płucu [37].

Zwiększona ekspresja genu *FHIT* na poziomie mRNA mogłaby sugerować zwiększony poziom produktu genu, tj. białka FHIT. Jednak analiza ilości białka, z zastosowaniem metody ELISA, ujawniła obniżenie immunoekspresji. Obniżony poziom białka stwierdziliśmy w 71% prób NSCLC (zakres 60-88 %, w zależności od typu histopatologicznego, z najniższą średnią wartością w podtypie AC, ale bez istotności statystycznej). Możliwym mechanizmem leżącym u podstaw obniżonego poziomu białka FHIT może być regulacja z udziałem miRNA, które blokują proces translacji bądź degradują mRNA.

#### **WNIOSKI na podstawie analizy poziomu ekspresji i stopnia metylacji wybranych genów supresorowych w NSCLC (5 publikacji):**

Wyniki przeprowadzonych badań poszerzyły wiedzę na temat molekularnego podłoża niedrobnokomórkowego raka płuca, łącząc analizę poziomu ekspresji genów supresorowych z określeniem stopnia metylacji regionów promotorowych badanych genów. Wybrane geny – z wyjątkiem *RASSF1A* – jak dotąd nie były analizowane u polskich pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Przeprowadzona analiza pozwoliła wyłonić geny: (1) pełniące ważną rolę w rozwoju NSCLC, zwłaszcza na wczesnym etapie karcynogenezy, (2) geny o oznaczeniu diagnostycznym i różnicującym podtypy NSCLC, (3) geny mogące służyć jako markery epigenetyczne. Badania tego typu, kontynuowane w przyszłości mogą się przyczynić do opracowania panelu markerów użytecznych klinicznie, wspomóc diagnostykę raka płuca czy stanowić podstawę do opracowania nowych metod terapeutycznych opartych na mechanizmach epigenetycznych (przeciwnowotworowe leki epigenetyczne).

Za najważniejsze osiągnięcia z tego zakresu uważam:

1) Udokumentowanie znaczenia badanych genów supresorowych – na podstawie obniżonego poziomu ich ekspresji w dużym odsetku badanych prób NSCLC – a zwłaszcza *DLEC1*, *ITGA9* i *RASSF1A* (z regionu 3p21.3) oraz *FAM107A* (3p21.1), w rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca. Ponadto, zaobserwowana dodatnia korelacja pomiędzy genami *ITGA9* (*locus* w AP20) i *RASSF1A* (*locus* w LUCA) podkreśla rolę genów z różnych subregionów chromosomu 3p. Dodatkowo, znaczenie genów *DLEC1*, *ITGA9*, *RASSF1A* i *FAM107A* zostało wzmocnione przez fakt zaobserwowania statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji tych genów w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki niezmięnionej makroskopowo, otaczającej zmianę pierwotną. To może sugerować potencjalne znaczenie diagnostyczne wymienionych genów w rozpoznawaniu raka płuca *in situ*.

2) Możliwość uznania roli badanych genów supresorowych – na podstawie różnic w poziomie ich ekspresji – w różnicowaniu podtypów histopatologicznych NSCLC, co może wspomóc diagnostykę różnicową niedrobnokomórkowego raka płuca. Geny: *ITGA9*, *RASSF1A*, *FUS1*, *FHIT*, *MLH1* i *RARβ* można uznać za markery różnicujące podtypy SCC i NSCC, a gen *NPRL2/G21* może być uznany za marker różnicujący podtypy SCC i AC. Wszystkie wymienione geny, prócz genu *RARβ*, wykazały istotnie niższy poziom ekspresji w podtypie SCC.

3) Potwierdzenie udziału – na podstawie wysokiego poziomu hipermetylacji regionów promotorowych genów *RASSF1A*, *RARβ*, *ITGA9*, *MLH1*, *DLEC1* i *FUS1* – epigenetycznego mechanizmu regulującego poziom ich ekspresji, zwłaszcza w przypadku genów *DLEC1*, *ITGA9* i *RASSF1A*, które były najsilniej wyciszone. Natomiast w przypadku genu *FHIT* metylacja promotorowa nie wydaje się być wystarczającym mechanizmem, który prowadzi do wyciszenia ekspresji genu, a niski poziom białka FHIT – przy wysokim poziomie mRNA genu – może sugerować udział innych, potranslacyjnych mechanizmów epigenetycznych, takich jak aktywność miRNA czy modyfikacje histonów. Podobnie, niski poziom metylacji promotorowej w przypadku genów: *FAM107A*, *NPRL2/G21* i *RARβ* wskazuje na udział innego niż epigenetyczny mechanizmu regulującego poziom ich ekspresji.

4) Możliwość uznania genów *DLEC1*, *ITGA9* i *MLH1* – na podstawie obserwacji jednoczesnej metylacji promotorowej tych genów w ponad 50% prób NSCLC – jako genów kandydujących do panelu markerów epigenetycznych. To z kolei może sugerować ich znaczenie w przyszłości jako genów docelowych dla leków epigenetycznych.

5) Potwierdzenie wysokiego poziomu ekspresji (na poziomie mRNA) metylotransferaz DNA jako enzymów uczestniczących w procesie metylacji i stwierdzenie możliwości ich znaczenia – na podstawie statystycznie istotnych różnic zaobserwowanych pomiędzy tkanką NSCLC a tkanką niezmienną makroskopowo – jako epigenetycznych markerów o znaczeniu diagnostycznym.

6) Możliwość uznania genu *FHIT* – na podstawie zróżnicowanego poziomu metylacji pomiędzy pacjentami z/bez naciekania węzłów chłonnych – jako markera prognostycznego w NSCLC.

7) Potwierdzenie znaczenia zaburzonej funkcji genów: *RASSF1A*, *DLEC1*, *RARβ* i *FUS1* – na podstawie stwierdzonych korelacji pomiędzy poziomem ich ekspresji bądź metylacji a stopniem rozwoju guza wg klasyfikacji pTNM lub AJCC – w początkowych stadiach rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca.

## 2.2. Niestabilność mikrosatelitarna typu LOH/MSI jako potencjalny biomarker NSCLC

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI) definiowana jest jako występowanie allela o nowej długości (wyrażanej w pz) na skutek zwiększenia lub zmniejszenia w wyniku mutacji (insercja bądź delecja) liczby powtórzeń nukleotydowych w sekwencjach mikrosatelitarnych. Zjawisko MSI, wykrywane

tylko wówczas, gdy występuje jednocześnie w wielu komórkach, może być traktowane jako wskaźnik klonalnej ekspansji komórek, typowej dla procesu karcynogenezy.

Jak dotąd, badania dotyczące częstości występowania MSI i jej znaczenia prognostycznego jednoznaczne wyniki przyniosły jedynie w przypadku raka jelita grubego. W innych typach nowotworów u ludzi wyniki badań są kontrowersyjne, również w przypadku raka płuca, gdzie opisywana częstość MSI wynosi od 0 do 76% [38], brak jest również jednoznacznej oceny wartości prognostycznej tych zmian molekularnych w NSCLC.

Kolejne zaburzenie genetyczne, jakim jest utrata heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) wiąże się z utratą w komórkach guza jednego z alleli genu. LOH może oznaczać delecję całego chromosomu, jego znacznej części lub mikrodelecję. Ponieważ delecja nukleotydowej sekwencji DNA często obejmuje *locus* określonego genu, jej funkcjonalną konsekwencją jest utrata funkcji genów supresorowych i/lub mutatorowych.

Wyniki badań nad LOH w komórkach nowotworowych mają podwójną wartość. Wytypowanie specyficznych regionów chromosomowych ulegających częstej delecji w danym typie nowotworu pozwala pozycjonować TSG w chromosomach, jak również określić ich rolę w nowotworzeniu, często nawet jeszcze przed ich precyzyjną identyfikacją. Pod względem praktycznym, informacje związane z mechanizmem utraty materiału genetycznego w komórce nowotworowej mogą stać się podstawą do opracowania markerów o wartości diagnostycznej i/lub predykcyjnej.

W przypadku NSCLC LOH jest częstym zdarzeniem w rozległym regionie krótkiego ramienia chromosomu 3: 3p14-p23 [16]. Obserwowany odsetek LOH w podtypach histopatologicznych NSCLC jest wysoki, wynosi 90% w SCC i 67% w AC [39].

W kolejnych dwóch pracach (**publikacje nr 8 i 9**) przedstawianych jako osiągnięcie, analizowanym mechanizmem molekularnym uczestniczącym w procesie karcynogenezy i prowadzącym do utraty ekspresji genów supresorowych była niestabilność genetyczna typu LOH/MSI. Łącznie analizie poddano 20 markerów mikrosatelitarnych z 7 różnych chromosomów.

#### *Publikacja nr 8*

Antczak A, Migdalska-Sęk M, **Pastuszek-Lewandoska D**, Czarnecka K, Nawrot E, Domańska D, Kordiak J, Górski P, Brzezińska E. Significant frequency of allelic imbalance in 3p region covering *RARβ* and *MLH1* loci seems to be essential in molecular non-small cell lung cancer diagnosis. *Med Oncol.* 2013;30(2):532. doi: 10.1007/s12032-013-0532-9.

#### *Publikacja nr 9*

Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Antczak A, **Pastuszek-Lewandoska D**, Kordiak J, Nawrot E, Domańska D, Kaleta D, Górski P, Brzezińska EB. Allelic imbalance in 1p, 7q, 9p, 11p, 12q and 16q regions in non-small cell lung carcinoma and its clinical association: a pilot study. *Mol Biol Rep.* 2013;40(12):6671-84. doi: 10.1007/s11033-013-2782-1.

Analiza LOH/MSI w 3p (**publikacja nr 8**) obejmowała regiony: 3p14.2, 3p21.3, 3p22.2, 3p24.2 i 3p25.3, w których znajdują się *loci* następujących genów supresorowych: *FHIT*, *RASSF1A*, *MLH1*, *RARβ*, *VHL*. Zmiany typu LOH/MSI udokumentowaliśmy dla wszystkich analizowanych markerów (n=7), a częstość występowania tych zmian wynosiła od 24% do 42%, w zależności od markera. Najczęstszą niestabilność genetyczną zaobserwowaliśmy w regionach 3p24.2 i 3p22.2, w których znajdują się *loci* genów *RARβ* (42%) i *MLH1* (40%), natomiast najniższą (24%) - w regionie 3p21.3 (*locus RASSF1A*).

Wysoką częstość LOH/MSI w *locus RARβ* potwierdzają wyniki uzyskane przez innych badaczy [40]. Podobnie w przypadku genu *MLH1* częstą niestabilność mikrosatelitarną, na poziomie 38-68%, odnotowują inni badacze [41]. Geng i wsp. [31] wykazali, że drugim zdarzeniem inaktywującym ten gen jest metylacja sekwencji promotorowej – jednoczesną obecność LOH i hipermetylacji promotorowej zaobserwowali w 75% przypadków NSCLC. Wysoki poziom metylacji genu został opisany także przeze mnie w **publikacji nr 4**.

Niska częstość LOH/MSI w *locus RASSF1A* natomiast może wskazywać na dominującą rolę innych mechanizmów uczestniczących w tłumieniu ekspresji tego genu supresorowego, w tym także rolę hipermetylacji promotorowej, na co wskazują wyniki innych badaczy [42], jak i te prezentowane w **publikacji nr 3**.

Ponadto, w przedstawianym jako osiągnięcie naukowe badaniu, statystycznie istotne korelacje zaobserwowaliśmy pomiędzy: (1) LOH/MSI w *loci* genów *RARβ* i *MLH1* a płcią męską i wiekiem pacjentów powyżej 60 lat; (2) LOH/MSI w *loci* genów *FHIT* i *MLH1* a paleniem papierosów przez pacjentów (czas palenia  $\geq 40$  lat i ilość wypalanych papierosów  $\geq 40$  paczkolet); (3) LOH/MSI w *loci* genów *FHIT*, *RARβ* i *MLH1* a wielkością i stadiem rozwoju guza: w przypadku *FHIT* większą częstość LOH/MSI stwierdziliśmy w małych guzach (pT1), *RARβ* - w guzach w stadium rozwoju IA, a w przypadku *MLH1* – w stadium IIIA/B; (4) pomiędzy podtypami histopatologicznymi NSCLC w przypadku genu *MLH1*, który charakteryzował się większą częstością LOH/MSI w SCC w porównaniu do NSCC.

Badania przeprowadzone przez nasz Zespół u pacjentów z rakiem płuca zostały rozszerzone o markery mikrosatelitarne spoza regionu 3p, tj. z regionów: 1p31.2, 7q32.2, 9p21.3, 11p15.5, 12q23.2 i 16q22, w obrębie których mieszczą się *loci* wielu onkogenów i genów supresorowych, w tym: *ARHI*, *MEST*, *p16INK4A*, *KCNQ1*, *SLC5A8*, *CDH1*, *CDH3* (**publikacja nr 9**). W opublikowanym piśmiennictwie naukowym dostępne są tylko dwie prace, w których analizowano regiony 12q23.2, 16q11-q21 i 16q23-qter (*loci* genów: *SLC5A8*, *CDH1* i *CDH3*) w linii komórkowej raka płuca i tylko w niewielkiej grupie raków pierwotnych [43,44].

W prezentowanym jako osiągnięcie naukowe badaniu, obecność LOH/MSI stwierdziliśmy dla wszystkich analizowanych markerów (n=13) opisanych w **publikacji nr 9**. W zależności od markera, częstość LOH/MSI wynosiła 10-36%. Najwyższą istotną statystycznie częstość LOH/MSI

zaobserwowaliśmy w regionie 11p15.5, w którym zlokalizowany jest gen *KCNQ1*. Ten wynik potwierdza obserwacje innych autorów [44]. Znaczenie zmian związanych z utratą alleli w chromosomie 11 wiąże się z brakiem genów regulujących proliferację komórkową i nabyciem przez komórki przewagi wzrostowej. Zaobserwowany statystycznie istotny wzrost częstości LOH/MSI w regionie 11p15.5 w grupie guzów w stadium rozwoju III (według klasyfikacji AJCC) może wskazywać na prognostyczne znaczenie markerów zlokalizowanych w tym regionie.

Wyniki prezentowanego jako osiągnięcie naukowe badania wskazują również na częste występowanie zmian typu LOH/MSI w regionie 9p21.3, w którym zlokalizowany jest gen *p16INK4A*. Również inni badacze potwierdzają częste występowanie LOH w tym regionie, sugerując nawet, że jest to najczęstsza zmiana genetyczna w NSCLC [45].

Trzecim pod względem częstości występowania LOH/MSI regionem w prezentowanym badaniu jest 1p31.2, w którym znajduje się *locus* genu *ARHI*. Jednak zaobserwowana przez nas częstość LOH/MSI (17%) jest niższa niż opisywana przez innych badaczy [46], choć brak jest nowszych analiz. Różnice mogą wiązać się z zastosowaną metodą, wybranymi markerami, grupą populacyjną.

Region 16q22.1 obejmuje *loci* E-kadheryn (*CDH1*, *CDH3*) – niestabilność genetyczna w tym regionie nie była jak dotąd badana w raku płuca, choć w przypadku innych nowotworów (np. piersi, tarczycy) jest często obserwowana [47,48]. E-kadheryny odgrywają kluczową rolę w adhezji komórek nabłonkowych i mogą mieć znaczenie w transformacji komórkowej.

Niska częstość LOH/MSI w 12q23.2 (*locus* *SLC5A8*) i 7q32.2 (*locus* *MEST*) może świadczyć o innych mechanizmach molekularnych zaangażowanych w wyciszenie tych TSG.

Zastosowana przez nasz Zespół ocena częstości LOH/MSI na podstawie oszacowania indeksu FAL (*Fractional Allele Loss*) ma szczególne i nowatorskie znaczenie. Zwłaszcza, że większość publikowanych badań ocenia zwykle LOH/MSI w pojedynczym *locus*. Indeks FAL odzwierciedla natomiast całkowity poziom niestabilności genetycznej w badanych *loci* dla analizowanego DNA i podkreśla rolę współwystępowania LOH/MSI w różnych regionach chromosomowych jako zaburzenia molekularnego indukującego niestabilność genetyczną w komórkach nowotworowych. Obliczanie wskaźnika FAL jest cenne z punktu widzenia oceny korelacji pomiędzy obecnymi w komórkach nowotworowych zmianami genetycznymi typu LOH/MSI a histopatologiczną charakterystyką danego nowotworu. Ponadto, jest to bardziej miarodajny wskaźnik korelacji LOH/MSI z parametrami klinicznymi niż ocena LOH/MSI w pojedynczym *locus*. W prezentowanym badaniu wzrost wskaźnika FAL istotnie korelował z ilością papierosów (paczkolata) wypalanych przez pacjentów. Tak więc palenie papierosów wydaje się mieć wpływ na częstość występowania niestabilności genetycznej typu LOH/MSI. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [49].

## WNIOSKI

Badania zmian genetycznych typu LOH/MSI mają dużą wartość pod względem identyfikacji potencjalnie ważnych dla karcynogenezy regionów chromosomowych/*loci* TSGs, które mogą posiadać znaczenie diagnostyczne i/lub prognostyczne. Oszacowana wysoka częstość LOH/MSI w określonych *loci* TSG oraz korelacja z cechami kliniczno-patologicznymi NSCLC może wskazywać na użyteczność tych zmian genetycznych jako markera molekularnego w raku płuca.

Za najważniejsze osiągnięcia z tego zakresu uważam:

1) Udokumentowanie znaczenia zmian genetycznych typu LOH/MSI w 3p w rozwoju NSCLC, zwłaszcza podtypu SCC, gdzie na uwagę zasługuje rola niestabilności mikrosatelitarnej genu *MLH1*. Znaczący wzrost częstości LOH/MSI w *loci* genów: *FHIT*, *MLH1* i *RARβ* podkreśla znaczenie badanych genów supresorowych i genetycznego mechanizmu ich wyciszenia.

2) Potwierdzenie roli utraty materiału genetycznego w *loci* genów *hMLH1* i *KCNQ1* na późnym etapie karcynogenezy – na podstawie korelacji pomiędzy LOH w *loci* genów a zaawansowanym stadium rozwoju guza (III A/B) – i możliwość prognostycznego wykorzystania markerów analizowanych w badaniu (D3S1611, D11S4088, D11S1318).

3) Potwierdzenie roli utraty materiału genetycznego w *loci* genów *FHIT* i *RARβ* w inicjacji NSCLC – na podstawie częstego występowania LOH w *loci* tych genów w guzach sklasyfikowanych jako pT1 i I stadium rozwoju, odpowiednio.

4) Potwierdzenie roli – na podstawie zwiększonej częstości występowania LOH/MSI w *loci* *FHIT* i *MLH1* skorelowanej z paleniem papierosów – dymu papierosowego w indukcji zmian genetycznych związanych z rozwojem niedrobnokomórkowego raka płuca, zwłaszcza podtypu SCC.

5) Udokumentowanie użyteczności obliczania wskaźnika FAL, jako uniwersalnego markera korelującego z czynnikami istotnymi w rozwoju NSCLC, jakim w przypadku przedstawianego badania było palenie papierosów.

### 2.3. Zaburzenia ekspresji miRNA jako potencjalnych biomarkerów NSCLC

MiRNA to małe, endogenne i niekodujące cząsteczki RNA, biorące udział w potranskrypcyjnej regulacji genów i kontroli wielu procesów komórkowych. MiRNA poprzez wpływ na geny odpowiedzialne za procesy apoptozy, wzrost guza, progresję, przerzutowanie, uczestniczą w procesie nowotworzenia.

U pacjentów z NSCLC wykazano odmienne wzory ekspresji miRNA w zależności od badanego materiału biologicznego (surowica krwi, tkanka płucna), jak również od podtypu histopatologicznego (SCC, AC).

Jednak jak dotąd nie ma licznych i jednoznacznych prac dotyczących znaczenia diagnostycznego lub/i prognostycznego miRNA w raku płuca. Potrzebne są dalsze badania nad korelacją określonego wzoru ekspresji różnych miRNA z cechami klinicznymi, podtypem histopatologicznym i rokowaniem

pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Nadal trwają badania nad specyficznym profilem miRNA, który mógłby być dobrym testem diagnostycznym, prognostycznym lub predykcyjnym w raku płuca.

#### *Publikacja nr 2*

**Pastuszek-Lewandoska D, Kordiak J, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Domańska-Senderowska D, Kiszalkiewicz JM, Antczak A, Górski P, Brzezińska-Lasota E. Expression analysis of 3 miRNAs, miR-26a, miR-29b and miR-519d, in relation to MMP-2 expression level in non-small cell lung cancer patients - a pilot study.**

Ta praca prezentowana jako osiągnięcie naukowe dotyczy kolejnego mechanizmu epigenetycznego związanego z regulacją ekspresji genów. Analizie poddano poziom ekspresji trzech miRNA: miR-26a, miR-29b i miR-519d oraz docelowego dla nich genu, kodującego metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2). MMP2 należy do grupy żelatynaz, jest enzymem proteolitycznym, którego aktywność w okolicach pierwotnych guzów nowotworowych prowadzi do powstawania przerzutów w wyniku niszczenia kolagenu IV budującego błonę podstawną. Ze względu na swoją rolę w procesie karcynogenezy (wzrost i migracja komórek nowotworowych, inwazja i przerzutowanie) MMP-2 uważany jest za jeden z najważniejszych potencjalnych celów w terapii przeciwnowotworowej.

Metaloproteinazy odgrywają ważną rolę właściwie we wszystkich najważniejszych etapach rozwoju nowotworu: inwazyjności i migracji komórek nowotworowych, ucieczce przed apoptozą i nadzorem układu odpornościowego, powstawaniu przerzutów i w rozwoju naczyń krwionośnych. Wyniki wielu prac wskazują na zwiększoną ekspresję różnych MMP w NSCLC, ale poziom ekspresji MMP-2 był badany tylko na poziomie białka, nie mRNA [50]. W prezentowanej jako osiągnięcie naukowe pracy potwierdziliśmy nadekspresję MMP-2 – badając ją na poziomie mRNA – u pacjentów z NSCLC: w ponad 80% badanych prób poziom ekspresji genu był zwiększony, przy czym w niemal 80% tych prób poziom ekspresji był zwiększony co najmniej dwukrotnie. Różnice pomiędzy podtypami histopatologicznymi były istotne statystycznie: ekspresja genu w grupie SCC była znacząco wyższa.

Wybrany do badań miR-26a pełni funkcję antyonkogenną – nadekspresja miR-26a w linii komórkowej raka płuca hamuje proliferację komórkową, blokuje cykl komórkowy w fazie G1/S, indukuje apoptozę oraz hamuje inwazyjność i przerzutowanie [51]. Również w przypadku miR-29b badania *in vitro* wykazały, że obniżenie ekspresji miR-29b w NSCLC promuje proliferację i migrację komórek [52]. Brak jest natomiast badań dotyczących roli miR-519d w raku płuca. W przypadku innych nowotworów, badacze przypisują miR-519d rolę onkogenną (rak wątrobowokomórkowy) lub supresorową (rak jajnika, kostniakomięsak) [53-55]. Prezentowane jako osiągnięcie naukowe badanie



jest prawdopodobnie pierwszym analizującym poziom ekspresji miR-519d w niedrobnokomórkowym raku płuca.

Coraz większa liczba badań skupia się na korelacji pomiędzy miRNA a RNA genów dla metaloproteinaz w nowotworach, ale wciąż niewiele dotyczy raka płuca i brak jest tego typu doniesień w populacji polskiej.

Wyniki uzyskane przez nasz Zespół wskazują na obniżenie ekspresji wszystkich wybranych do analizy miRNA – w 75-100% prób NSCLC. Taki wynik potwierdza supresorową rolę miR-26a i miR-29b, oraz sugeruje taką samą rolę dla miR-519d w raku płuca. Znaczące, tj. co najmniej dwukrotne obniżenie poziomu ekspresji, zaobserwowano w 67% prób dla miR-26a, w 97% prób dla miR-519d i w 100% prób dla miR-29b. Dodatkowo, poziom ekspresji miR-29b był istotnie niższy w podtypie SCC w porównaniu do pozostałych typów histologicznych NSCLC. Jednoczesne obniżenie ekspresji miRNA i podwyższenie ekspresji *MMP-2* stwierdzono w 64% prób dla miR-26a, w 74% prób dla miR-519d i w 86% prób dla miR-29b.

Statystycznie istotną ujemną korelację zaobserwowaliśmy pomiędzy miR-26a i *MMP-2* w podtypie AC.

Prezentowane badanie było badaniem pilotażowym. Konieczna jest dalsza analiza – zwłaszcza z włączeniem materiału od pacjentów, u których zdiagnozowano przerzuty NSCLC. Takie badania mogłyby poprzeć supresorową funkcję wybranych miRNA. Wówczas można by je rozważać w kategorii celów terapeutycznych u pacjentów z rakiem płuca i wykorzystać w przyszłości do opracowania nowych strategii terapii przeciwnowotworowej w oparciu o miRNA.

## WNIOSKI

Wyniki prezentowanego jako osiągnięcie naukowe badania ukazują znaczenie genu *MMP-2* i wybranych miRNA w karcynogenezie płuca. Wszystkie trzy badane miRNA – miR-26a, miR-29b i miR-519d – pełnią rolę supresorową w NSCLC. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat epigenetycznej regulacji procesu karcynogenezy płuca.

Za najważniejsze osiągnięcia z tego zakresu uważam:

- 1) Potwierdzenie znaczenia miR-26a i miR-29b w rozwoju NSCLC i dołączenie do tej grupy miR-519d, który wcześniej nie był badany w raku płuca.
- 2) Możliwość uznania potencjalnego znaczenia diagnostycznego miR-29b i *MMP-2*, których poziom ekspresji różnicuje podtypy histologiczne NSCLC.
- 3) Potwierdzenie – na podstawie ujemnej korelacji – regulatorowego związku pomiędzy miR-26a i *MMP-2*.

## 2.4. Mechanizmy immunologiczne w NSCLC – rola CTLA-4 jako potencjalnego biomarkera NSCLC

U pacjentów z chorobą nowotworową obserwuje się osłabienie odpowiedzi immunologicznej. W tym aspekcie istotne znaczenie ma ludzki antygen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*), który pełni rolę negatywnego regulatora proliferacji i aktywacji limfocytów T. Jest to glikoproteinowy receptor występujący w formie homodimerów na CTLs i jednocześnie homolog CD28, który również wiąże się z ligandami B7-1 i B7-2, ulegający ekspresji po aktywacji limfocytów T. CTLA-4 poprzez inhibicję produkcji interleukiny 2 blokuje progresję cyklu komórkowego, prowadząc do zahamowania proliferacji limfocytów T. W warunkach fizjologicznych zmniejsza to odpowiedź komórek T na zarówno na obce antygeny, jak i na autoantygeny. W mikrośrodowisku guza ekspresja CTLA-4 na komórkach T ulega zwiększeniu, m.in. pod wpływem TGF-beta, supresyjnej cytokiny wydzielanej przez komórki guza. Sugeruje się, że we wczesnym etapie nowotworzenia, CTLA-4 może podnosić próg aktywacji komórek T, przyczyniając się w ten sposób do osłabienia odpowiedzi przeciwnowotworowej i zwiększając podatność na rozwój raka.

Na zwiększoną ekspresję genu *CTLA-4* (*locus* w 2q33) mogą mieć wpływ polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*), które – jak wykazano w wielu pracach – korelują z podatnością na rozwój chorób autoimmunologicznych, takich jak choroby autoimmunologiczne tarczycy, toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów i cukrzyca typu 1. Dlatego też sugeruje się, że również w chorobach nowotworowych proliferacja i aktywacja CTLs, składająca się na odpowiedź antynowotworową, może być zaburzona w wyniku występowania SNPs w genie *CTLA-4*.

Jak pokazują badania przedkliniczne i kliniczne zahamowanie aktywności CTLA-4 z użyciem przeciwciał monoklonalnych może mieć znaczenie terapeutyczne [56,57]. Z tymi badaniami i ich wynikami związane są obecnie duże nadzieje.

### Publikacja nr 5

**Antczak A, Pastuszek-Lewandoska D, Górski P, Domańska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, Nawrot N, Kordiak J, Brzezińska E.** CTLA-4 expression and polymorphisms in lung tissue of patients with diagnosed non-small-cell lung cancer. *Biomed Res Int. (Journal of Biomedicine and Biotechnology)* 2013;2013:576486. doi: 10.1155/2013/576486.

Celem kolejnej pracy prezentowanej jako osiągnięcie naukowe była analiza częstości występowania u pacjentów ze zdiagnozowanym NSCLC polimorfizmów sekwencji DNA w genie *CTLA-4*, którego aktywność wiąże się z osłabieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu, sprzyjając wzrostowi i progresji guza. Badanymi polimorfizmami genu *CTLA-4* były: +49 A/G i -318 C/T, analizowane przy użyciu sond TaqMan (odpowiednio: rs231775 i rs5742909); badanym materiałem biologicznym była krew obwodowa i zmieniona nowotworowo tkanka płuca.

Znaczenie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w genie *CTLA-4* potwierdzono w chorobach autoimmunologicznych. Nowatorskim podejściem przedstawianej pracy była analiza częstości występowania polimorfizmów genu *CTLA-4* w tkance nowotworowej płuca i porównanie jej z częstością występowania w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u tych samych pacjentów oraz analiza poziomu ekspresji genu *CTLA-4* w tkance płuca. W większości badań polimorfizm *CTLA-4* analizowany jest w limfocytach i niewiele jest prac dotyczących związku pomiędzy ekspresją *CTLA-4* (zwłaszcza na poziomie mRNA) i jego wariantami polimorficznymi w tkance nowotworowej.

Uzyskane przez nasz Zespół wyniki wskazują na zwiększoną ekspresję *CTLA-4* u większości pacjentów z NSCLC (ok. 75%). Zgodnie z posiadaną wiedzą jest to pierwsze badanie analizujące poziom ekspresji mRNA genu, metodą qPCR. Wcześniej Salvi i wsp. [58], badając ekspresję *CTLA-4* na poziomie białka, zasugerowali prognostyczne znaczenie takiego oznaczenia w NSCLC. W prezentowanym jako osiągnięcie naukowe badaniu, zaobserwowaliśmy istotną korelację ekspresji *CTLA-4* z wielkością guza (cecha T w klasyfikacji TNM): znacznie wyższy poziom dotyczył guzów z grupy T2 w porównaniu z T3/T4. Potwierdza to w pewien sposób obserwacje korzystnego, niezależnego wpływu zwiększonego poziomu białka *CTLA-4* na przeżycie i lepsze rokowanie u pacjentów z rakiem płuca [58], jak również potwierdza rolę genu *CTLA-4* jako negatywnego regulatora proliferacji komórek nowotworowych [59].

Funkcjonalne znaczenie polimorfizmów +49A/G i -318C/T w raku płuca jest przedmiotem niewielkiej liczby badań, a część z nich dotyczy populacji azjatyckich, co może mieć wpływ na publikowane wyniki.

W przypadku polimorfizmu +49A/G, obecność allelu G i genotypu +49GG w tkance nowotworowej w sposób istotny wiązała się z ryzykiem rozwoju niedrobnokomórkowego raka płuca. W przypadku natomiast obecności allelu A i genotypu +49AA uzyskane wyniki ujawniły ich ochronny wpływ (obniżenie ryzyka rozwoju NSCLC).

W przypadku polimorfizmu -318C/T, stwierdziliśmy istotną korelację pomiędzy zwiększonym poziomem ekspresji *CTLA-4* a genotypem -318TT, co potwierdza funkcjonalne znaczenie zastąpienia tyminą (T) cytozyny (C) w sekwencji promotora genu.

Ciekawy wynik uzyskaliśmy porównując rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów *CTLA-4* pomiędzy tkanką nowotworową i krwią obwodową. W różnym materiale biologicznym u tego samego pacjenta zaobserwowaliśmy różne genotypy *CTLA-4*: najczęstsze zmiany dotyczyły genotypów: +49AA (krew obwodowa) → +49AG (tkanka NSCLC) u >50% pacjentów i -318CC (krew obwodowa) → -318CT (tkanka NSCLC) u >40% pacjentów. Zaobserwowane przez nas różnice były istotne statystycznie i potwierdziły złożoną rolę *CTLA-4* w rozwoju raka płuca. Zgodnie z naszą wiedzą, jest to pierwsza taka obserwacja u pacjentów z NSCLC i brak jest publikacji na ten temat. Natomiast wyniki innych prac potwierdzają zmienność w rozkładzie genotypów określonych

genów w różnym materiale biologicznym i ich wartość prognostyczną, np. u pacjentek z rakiem jajnika w odniesieniu do genu p53 [60].

## **WNIOSKI**

Uzyskane wyniki powiększają niewielką ilość danych dotyczących polimorfizmów genu *CTLA-4* u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

Za najważniejsze osiągnięcia z tego zakresu uważam:

- 1) Udokumentowanie różnic w dystrybucji genotypów pomiędzy krwią obwodową i tkanką płuca u tych samych pacjentów.
- 2) Potwierdzenie funkcjonalnego znaczenia substytucji C/T w promotorze genu *CTLA-4*.
- 2) Możliwość uznania – na podstawie korelacji pomiędzy ekspresją genu a wielkością guza – proapoptycznego wpływu *CTLA-4* na komórki guza.
- 3) Potwierdzenie słabszego inhibującego wpływu – na podstawie korelacji z ryzykiem rozwoju NSCLC – genotypu +49GG na proliferację komórkową.

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

W 1991 roku ukończyłam studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku Biologia. Pracę magisterską zatytułowaną *Metody rozpoznawania aneuploidii chromosomu X i genopatii sprzężonych z płcią*, wykonywałam pod kierunkiem Prof. Henryka Hübnera w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Instytutu Nauk Podstawowych Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Po zakończeniu studiów odbyłam 10. miesięczny (wrzesień 1991- czerwiec 1992) staż naukowy (stypendium w ramach programu TEMPUS) w Instytucie Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Getyndze w Niemczech (*Institut für Humangenetik der Universität Göttingen*), gdzie zdobywałam umiejętności z zakresu najnowszych technik biologii molekularnej. W zespole kierowanym przez prof. I. Hansmanna dołączyłam do grupy zajmującej się mapowaniem chromosomu 20 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), a moim wkładem w pracę zespołu było zlokalizowanie 11 nowych *loci* na badanym chromosomie. Efekty wspólnej pracy przedstawiliśmy na Zjeździe w Mainz (*załącznik 4, pkt III B, poz. 1*) oraz opublikowaliśmy (*załącznik 4, pkt II D, poz. 1*).

W 1992 roku zostałam zatrudniona w Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej INP WAM w Łodzi, jako pracownik naukowo-dydaktyczny. W Zakładzie kierowanym przez prof. H. Hübnera uczestniczyłam m.in. w pracy nad badaniem mutacji punktowych w genie rodopsyny i peryferyny związanych z utratą funkcjonowania fotoreceptorów i rozwojem barwnikowego zwyrodnienia siatkówki u ludzi. Ponadto, uczestnicząc w pracy doświadczalnej Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej, poznawałam techniki badań cytogenetycznych i byłam współautorem 6 doniesień zjazdowych (*załącznik 4, pkt III B, poz. 2-7*). Warsztat badawczy z zakresu biologii molekularnej doskonaliłam uczestnicząc w zajęciach Szkoły Molekularnej organizowanej przez

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W pracy dydaktycznej Zakładu uczestniczyłam w latach 1992-1995 prowadząc zajęcia z zakresu parazytologii i genetyki człowieka dla studentów I i IV roku Wydziału Wojskowo-Lekarskiego AM.

W roku 1995 rozpoczęłam studia podyplomowe z translatoryki, specjalizacja - tłumaczenie pisemne z języka angielskiego i niemieckiego, w Ośrodku Badań i Studiów Przekładowych Uniwersytetu Łódzkiego. Złożona przeze mnie praca dyplomowa na zakończenie studiów w 1999 roku składała się z tłumaczeń z języka angielskiego naukowych artykułów medycznych. Poszerzenie umiejętności z zakresu posługiwania się językiem angielskim i niemieckim oraz zdobycie zawód tłumacza ułatwiły mi dalsze pogłębianie wiedzy, pierwszy współudział w tworzeniu prac poglądowych (*załącznik 4, pkt II D, poz. 7-9*), a w późniejszym okresie – samodzielny wkład w przetłumaczenie 20 rozdziałów podręczników akademickich: *Interna Harrisona* (wyd. 2001, 2009) oraz *Endokrynologia ogólna i kliniczna Greenspana* (wyd. 2004, 2011) (*załącznik 4, pkt II E, poz. 1, 2*).

W latach 1996-2001 przebywałam na urlopie wychowawczym na dwójkę dzieci. W 2001 roku uzyskałam zatrudnienie w Klinice Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi i podjęłam współpracę z Pracownią Endokrynologii Molekularnej AM w Łodzi. W latach 2006-2009, kontynuując współudział w pracach badawczych prowadzonych w Pracowni Endokrynologii Molekularnej, otrzymałam etat w Klinice Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – jako pracownik naukowo-dydaktyczny, a w 2008 roku przeszłam na stanowisko naukowo-techniczne. Podejmując pracę w zespole prof. A. Lewińskiego oraz pod kierunkiem dr n. med. Ewy Brzeziańskiej (obecnie prof. E. Brzeziańska-Lasota) w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM, poznawałam i wdrażałam kolejne techniki z zakresu biologii molekularnej: począwszy od standaryzacji różnych metod izolowania DNA i RNA z krwi i tkanek, rozdziału kwasów nukleinowych w żelu agarozowym i poliakrylamidowym, poprzez techniki PCR służące m.in. do wykrywania mutacji punktowych (PCR-SSCP, PCR-RFLP), aż do metody sekwencjonowania genów czy techniki badania poziomu ekspresji genów w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*, qPCR), za której wprowadzenie do Pracowni byłam odpowiedzialna. Ponadto, poszerzyłam warsztat pracy o metodę MSPCR (MSP) służącą do analizy metylacji sekwencji DNA czy allelotypowanie mające na celu identyfikację niestabilności genetycznej typu LOH/MSI. W tym okresie byłam współwykonawcą 12 prac badawczych (ekspertyzy, prace własne UM, umowy z KBN) (*załącznik 4, pkt II I, poz. 1-12*), współautorem 8 prac oryginalnych (*załącznik 4, pkt II A, poz. 1-5, pkt II D, poz. 2-4*), 3 prac poglądowych (*załącznik 4, pkt II A, poz. 23, pkt II D, poz. 10, 11*) i 19 doniesień zjazdowych (*załącznik 4, pkt III B, poz. 8-26*).

Prace oryginalne zawierają wyniki analiz:

- Zmian molekularnych w genie pendryny (*SLC26A4*) u chorych z zespołem Pendreda w populacji polskiej. W badanym genie pendryny zidentyfikowaliśmy dwie mutacje zmiany sensu – L236P i T416P – korelujące z występowaniem choroby (załącznik 4, pkt II D, poz.2).

- Mutacji punktowych w genie dla tyreotropiny w przypadku wrodzonej niedoczynności tarczycy. W pracy doświadczalnej wykryliśmy nową nonsensowną mutację punktową typu transwersji (Y444X) w genie tyreotropiny, korelującą z występowaniem wrodzonej niedoczynności tarczycy (załącznik 4, pkt II A, poz. 1).

- Wybranych czynników genetycznych związanych z powstawaniem raka brodawkowego tarczycy w populacji polskiej. Zakres prac doświadczalnych obejmował analizę występowania mutacji punktowych w onkogenie *BRAF*, występowanie rearanżacji chromosomowych *RET/PTC* i *Trk*, analizę zmian we wzorze ekspresji onkogenu *MET* oraz genu dla cykliny D1 (załącznik 4, pkt II A, poz.2-4; pkt II D, poz. 3). Na podstawie wyników analizy molekularnej proto-onkogenów *RET* i *NTRK1* wykazaliśmy, że częstość występowania rearanżacji *RET/PTC*1-3 w tkankach PTC w populacji polskiej wynosi 21%, podczas gdy rearanżacji onkogenu *NTRK1* - 12% (załącznik 4, pkt II A, poz.2). W przypadku najczęściej opisywanej w literaturze mutacji w genie *BRAF* – transwersji V600E, częstość jej występowania w tkankach PTC w populacji polskiej wyniosła 48% (załącznik 4, pkt II A, poz.4). Zaobserwowaliśmy także wzrost ekspresji genów cykliny D1 i *MET* w PTC w porównaniu z tkanką niezmienną makroskopowo (załącznik 4, pkt II A, poz. 3, pkt II D, poz. 3). Wyniki naszych badań potwierdziły znaczenie analizowanych genów – w szczególności genów kodujących białka o aktywności kinazy – w powstawaniu i progresji raka brodawkowego tarczycy.

- Częstości występowania polimorfizmu sekwencji DNA w genie dla receptora  $\beta_3$  adrenergicznego u dzieci z otyłością w populacji polskiej. W pracy doświadczalnej wykazaliśmy podobną częstość występowania wariantu Trp64Arg $\beta_3$ AR u dzieci z otyłością, jak w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki sugerują, że występowanie wariantu Trp64Arg w genie receptora  $\beta_3$ AR nie wpływa na wartość indeksu BMI, nie predysponuje do występowania otyłości, jak również nie koreluje z występowaniem oporności na insulinę (załącznik 4, pkt II A, poz.5, pkt II D, poz.4).

Prace poglądowe z tego okresu, których jestem współautorem, a które powstały z zakresu tematyki prac eksperymentalnych, dotyczą następujących zagadnień:

- Zmian we wzorze ekspresji genów oraz mutacji punktowych w genach symportera sodowo-jodowego (*NIS*) oraz pendryny (*PDS*) w rakach tarczycy oraz zespole Pendreda. Białka *NIS* i *PDS* uczestniczą w transporcie jodu w tarczycy. Wykazano, że zmniejszony wychwyt jodu w tkankach raka tarczycy może być spowodowany zmniejszoną ekspresją genu *NIS*. W zaburzeniach gruczołu tarczowego stwierdza się także zróżnicowaną ekspresję genu *PDS*. Zmiany we wzorze ekspresji pendryny prawdopodobnie wpływają na zmniejszoną zdolność koncentracji jodu w nowotworowo zmienionych komórkach tarczycy (załącznik 4, pkt II D, poz. 10);

- Roli genu *NTRK1* oraz onkogenów z rodziny *RAS* w powstawaniu raka brodawkowego tarczycy (załącznik 4, pkt II A, poz. 23; pkt II D, poz. 11). Gen *NTRK1* koduje białko z rodziny receptorów neuronalnych czynników wzrostowych, zawierające domenę o aktywności kinazy tyrozynowej. W rakach brodawkowatych częste są rearanżacje tego genu, polegające na fuzji końca 3' *NTRK1* z końcem 5' innego genu. W wyniku rearanżacji dochodzi do stałej aktywacji domeny kinazy tyrozynowej Ntrk1 (koniec karboksylowy białka fuzyjnego), co prowadzi do nadmiernej stymulacji szlaku zarezerwowanego dla czynnika wzrostowego i w efekcie – do zaburzeń proliferacji. Częstość występowania rearanżacji Ntrk1 w rakach brodawkowatych tarczycy u ludzi jest niewielka: wynosi 2-25%, ale anomalie dotyczące genu *NTRK1* wiążą się z gorszym rokowaniem. Natomiast mutacje protoonkogenów *RAS* (*K-RAS*, *H-RAS*, *N-RAS*) są czynnikami genetycznymi, które biorą udział w progresji raka brodawkowego do anaplastycznego, gdzie mutacje tego genu stwierdza się w 50% przypadków. Mutacje protoonkogenów *RAS* prowadzą do konstytutywnej aktywacji szlaków sygnałowych, w które włączone są białkowe produkty tych genów, wskutek czego dochodzi do nadmiernej proliferacji i odróżnicowania komórek. Istnieje korelacja pomiędzy występowaniem mutacji *RAS* i agresywnym przebiegiem choroby oraz wyższym ryzykiem zgonu, niezależnie od etapu zaawansowania choroby i stopnia zróżnicowania guza.

W tym okresie byłam również współautorem 19 prac zjazdowych, prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych, opisujących wyniki z zakresu prac doświadczalnych dotyczących: poziomu ekspresji enzymów uczestniczących w metabolizmie puryn i pirymidyn u pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (załącznik 4, pkt III B, poz. 8, 9), zmian genetycznych i epigenetycznych w nowotworowych tarczycy (załącznik 4, pkt III B, poz. 10-14, 16, 17, 21-26), zmian genetycznych u dzieci z otyłością (załącznik 4, pkt III B, poz. 15, 18, 19) oraz mutacji u osób z zespołem Pendreda (załącznik 4, pkt III B, poz. 20).

Od listopada 2009 roku do chwili obecnej pracuję w Zakładzie Molekularnych Podstaw Medycyny, w zespole prof. Ewy Brzeziańskiej-Lasoty. Do 2014 roku pracowałam jako specjalista naukowo-techniczny, od czerwca 2014 – na stanowisku adiunkta. Ponieważ Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny był nowo powstałą jednostką, współuczestniczyłam w jego organizacji, a przede wszystkim w utworzeniu laboratorium do prowadzenia badań naukowych. Pierwszy rok istnienia Zakładu wiązał się z organizacją miejsc pracy i wyposażeniem laboratorium Zakładu.

W czerwcu 2011 roku, pod kierunkiem dr n. med. Ewy Brzeziańskiej (obecnie: prof. E. Brzeziańska-Lasota), uzyskałam stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Przedstawiona praca doktorska, zatytułowana *Analiza efektu epimutacji sekwencji promotorowych wybranych genów supresorowych (RASSF1A, VHL, CDHI) jako przyczyny zmiany ich ekspresji w łagodnych i złośliwych nowotworach tarczycy oraz w wolu guzkowym*, została wyróżniona. Celem przeprowadzonej pracy doświadczalnej była analiza znaczenia zmian epigenetycznych – spowodowanych hipermetylacją sekwencji DNA w regionach promotorowych wybranych genów

supresorowych – w rozwoju nowotworów tarczycy i ich wpływ na ekspresję badanych genów. Część eksperymentalna pracy była częścią badań prowadzonych w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Chorób Metabolicznych UM w ramach grantu KBN zatytułowanego *Rak brodawkowaty tarczycy - ocena poziomu metylacji, niestabilności mikrosatelitarnej i utraty heterozygotyczności w rejonach imprintingowych i w rejonach nie podlegających genomowemu imprintingowi jako mechanizmów uczestniczących w powstawaniu tego nowotworu (załącznik 4, pkt II I, poz. 12)*, którego kierownikiem była dr n. med. Ewa Brzeziańska (obecnie: prof. E. Brzeziańska-Lasota). Wyniki grantu zostały opublikowane już z afiliacją Zakładu Molekularnych Podstaw Medycyny (*załącznik 4, pkt II A, poz. 6; pkt II D poz. 5*). Celem przeprowadzonych badań była analiza znaczenia zmian epigenetycznych (hipermetylacja promotorowa genów supresorowych) i genetycznych (niestabilność genetyczna typu LOH/MSI) w rozwoju raka brodawkowatego tarczycy (materiał badawczy: fragmenty tkanki tarczycy pobrane ze zmiany pierwotnej i marginesu otaczającego zmianę u pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy /PTC/ oraz od pacjentów z wolem guzkowym /NG/). Do badań wybrano 8 genów supresorowych zlokalizowanych w regionach podlegających imprintingowi genetycznemu (*ARHI, KCNQ1, MEST, p16INK4A*), jak i w regionach nie podlegających imprintingowi genetycznemu (*RASSF1A, SLC5A8, CDH1, VHL*), pełniących istotne role w regulacji cyklu komórkowego, proliferacji komórkowej czy adhezji. Celem badania – od strony metodycznej – była ocena poziomu ekspresji wybranych TSGs (metoda qPCR), których zaburzona regulacja może mieć znaczenie w rozwoju PTC oraz analiza mechanizmów odpowiedzialnych za ich potencjalne wyciszenie. Ocenialiśmy częstość występowania i poziom metylacji sekwencji promotorowych badanych genów (metoda MSP, obliczanie wskaźnika indeksu metylacji /MI/) oraz obecność zmian genetycznych typu LOH/MSI w *loci* badanych genów z wykorzystaniem 27 markerów mikrosatelitarnych. W panelu badanych genów znalazły się takie, których poziom metylacji nigdy wcześniej nie był badany w PTC (*MEST, KCNQ1, VHL*). Wyniki naszego badania wykazały, że wyciszenie ekspresji badanych TSGs miało podłoże epigenetyczne, tzn. wiązało się z hipermetylacją regionów promotorowych (najwyższym poziomem metylacji charakteryzowały się geny *ARHI* i *CDH1*), natomiast zmiany genetyczne typu LOH/MSI były mniej częste w badanym materiale (*załącznik 4, pkt II D, poz. 5*). Potwierdziliśmy znaczenie zmian epigenetycznych i obniżonej ekspresji TSGs w karcynogenezie gruczołu tarczowego, aczkolwiek żaden z analizowanych genów nie mógł zostać uznany za marker o znaczeniu diagnostycznym w PTC (grupę kontrolną stanowiły fragmenty tkanki tarczycy uzyskane od pacjentów z NG). Interesujący wynik natomiast uzyskaliśmy w przypadku genu *KCNQ1*, którego poziom ekspresji istotnie różnił się pomiędzy wariantem klasycznym a pęcherzykowym PTC, co może sugerować znaczenie genu w różnicowaniu tych podtypów, aczkolwiek mechanizm odpowiedzialny za wyciszenie ekspresji *KCNQ1* nie wiąże się z hipermetylacją sekwencji promotorowych genu. Znaczenie LOH/MSI jako markera diagnostycznego



przedstawiliśmy w formie doniesienia zjazdowego, które zostało wyróżnione I nagrodą w sesji plakatowej (*załącznik 4, pkt III B, poz. 27*).

Poziom metylacji tych samych 8 genów supresorowych przeanalizowaliśmy także w tkance tarczycy niezmienionej makroskopowo, przylegającej do tkanki nowotworowej (PTC) – w celu porównania tych dwóch grup tkanek (*załącznik 4, pkt II A, poz. 6*). Analiza ilościowa (wartość Indeksu Metylacji, MI) wykazała wysoki poziom metylacji zwłaszcza w przypadku 3 genów: *ARHI*, *CDHI* i *RASSF1A*. Poczynione obserwacje były zbliżone do tych, jakie odnotowaliśmy w guzie pierwotnym (tkanka PTC) – w odniesieniu zarówno do genów o wysokim, jak i niskim poziomie metylacji. Uzyskane przez nas wyniki potwierdziły udział modyfikacji epigenetycznych na wczesnym etapie nowotworzenia w gruczole tarczowym, wskazując, że są one charakterystyczne nie tylko dla nowotworów złośliwych. Utrata funkcji badanych genów w wyniku hipermetylacji promotorowej może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek czy inhibicji apoptozy. Przeprowadzona przez nas analiza powiększyła nieliczne w tamtym okresie opublikowane badania z tej tematyki. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości stać się podstawą do opracowania ukierunkowanego leczenia zmian przednowotworowych w tarczycy. Dodatkowo, mogą mieć wielką wartość w ocenie ryzyka, wczesnego wykrywania raka i monitorowania progresji choroby. Wyniki pracy przedstawiliśmy także w formie doniesienia zjazdowego (*załącznik 4, pkt III B, poz. 28*).

Od roku 2012 uczestniczyłam w pracach badawczych związanych z uzyskaniem 2 grantów NCN i 1 z MNiSW, w których byłam współwykonawcą (*załącznik 4, pkt II I, poz. 13-15*). Zakres badanych zagadnień dotyczył: (1) molekularnego podłoża procesu nowotworzenia w płucu; (2) zmian molekularnych w przebiegu sarkoidozy płucnej; (3) roli wybranych genów supresorowych w diagnostyce różnicującej nowotwory tarczycy.

Celem badań z zakresu niedrobnokomórkowego raka płuca (*załącznik 4, pkt. II I, poz. 13*) było poszukiwanie markerów molekularnych związanych z wczesnym etapem rozwoju NSCLC (wspomagających jego diagnostykę, różnicujących podtypy histopatologiczne) i/lub jego progresją. Badania były prowadzone we współpracy z Kliniką Pulmonologii Ogólnej i Onkologicznej UM oraz Kliniką Chirurgii Klatki Piersiowej, Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej UM. Aktywnie uczestniczyłam w części badawczej pracy, obejmującej (1) analizę metylacji promotorowej 9 wybranych genów supresorowych, których zaburzona regulacja ma znaczenie w rozwoju raka płuca, (2) analizę poziomu ekspresji badanych genów oraz (3) ocenę niestabilności genetycznej typu LOH/MSI w regionie chromosomowym 3p. Wyniki uzyskane w projekcie zostały zebrane i opracowane w formie 7 opublikowanych oryginalnych artykułów (*załącznik 4, pkt I A, poz. 1,3,4,6,7,8; pkt II A, poz. 21*), z których 6 (*załącznik 4, pkt I A, poz. 1,3,4,6,7,8*) wchodzi w skład przedstawianego przeze mnie osiągnięcia naukowego. Ponadto, uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie 12 doniesień zjazdowych (*załącznik 4, pkt III B, poz. 29, 34, 40, 43-45, 47, 52-54, 62, 69*).

Celem drugiego projektu (*załącznik 4, pkt. II I, poz. 14*), którego byłam współwykonawcą, była (1) ocena ekspresji 5 wybranych genów mających znaczenie w m.in. w procesach angiogenezy i włóknienia w przebiegu sarkoidozy płucnej, (2) ocena immunoekspresji białek kodowanych przez badane geny oraz (3) analiza poziomu ekspresji wybranych klas mikroRNA (miRNA) regulujących ekspresję białek kodowanych przez badane geny. Oceniane było znaczenie prognostyczne powyższych zmian molekularnych w przebiegu sarkoidozy płucnej i ich współzależności ze stadiami rozwoju choroby. Materiał biologiczny do badań (płyn BAL, krew pełna, surowica) od pacjentów chorujących na sarkoidozę uzyskaliśmy dzięki współpracy z Kliniką Pneumonologii i Alergologii UM. Wyniki prac doświadczalnych zostały opublikowane w formie 5 prac oryginalnych, których jestem współautorką (*załącznik 4, pkt II A, poz. 13-15, 17, 18*). Opublikowane prace obejmują zagadnienia:

- Zmiany poziomu ekspresji/immunoekspresji genów/białek szlaku sygnałowego TGF- $\beta$ /SMAD (TGF- $\beta$ , SMAD 2 i 3, SMAD 7) (*załącznik 4, pkt II A, poz.13*) i osi HIF-1 $\alpha$ /ING-4/VEGF (VEGF, HIF-1 $\alpha$ , ING-4) (*załącznik 4, pkt II A, poz.14,15*) oraz wybranych klas miRNA (let-7f, miR15b, miR-16, miR-20a, miR-27b, miRNA-128b, miR-130, miR-192, miR-221, miR-222) (*załącznik 4, pkt II A, poz.17*) regulujących na drodze pośredniej lub/i bezpośredniej wyżej wymienione szlaki sygnałowe. W oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe okazuje się, mogą one uczestniczyć w wielu istotnych procesach zaangażowanych w proces choroby, np. powstawanie ziarniniaków, włóknienie, angiogenezę/angiostazę. Dotychczas opublikowane prace opisują tylko znaczenie TGF- $\beta$  w sarkoidozie, nie ma żadnych doniesień naukowych na temat poziomu ekspresji/immunoekspresji genów i białek SMAD, a tylko nieliczne opisują poziom ekspresji miRNA w przebiegu tej choroby. Ponadto analizie poddaliśmy zależności pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów oraz miRNA a: klasyfikacją sarkoidozy na podstawie badania radiologicznego, charakterystyką biologiczną pacjentów, postacią ostrą a przewlekłą choroby, wartościami parametrów klinicznych oceniających funkcje czynnościowe układu oddechowego, markerami biochemicznymi czy fenotypem immunologicznym (CD4+/CD8+). Materiałem do badań były komórki BALF, PBMC i surowica uzyskane od pacjentów. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że badane geny/białka szlaku sygnałowego TGF- $\beta$ /SMAD i osi HIF-1A/VEGF/ING-4 oraz miRNA – jako regulatory zapalenia, remodelingu ECM/EMT, procesu angiogenezy/angiostazy – pełnią istotne role w patogenezie sarkoidozy układu oddechowego. Geny TGF- $\beta$ , SMAD3 i białka SMAD2, VEGF oraz miR-15b, miR-27b miR-192, miR-221, miR-222, miR-130a, miR-let7f prawdopodobnie mogą mieć znaczenie diagnostyczne, jako biomarkery różnicujące osoby chore na sarkoidozę płucną i osoby zdrowe. Dodatkowo, uzyskane wyniki wskazują, że geny TGF $\beta$ , SMAD 2/3, HIF-1A oraz: miR-16, miR-20a, miR-27b, miR-let7f, miR-192, mogą mieć wartość markerów diagnostycznych o negatywnej wartości prognostycznej, ze względu na zróżnicowane profile ekspresji u pacjentów z różnymi stadiami RTG choroby, u pacjentów z ostrą vs. przewlekłą postacią choroby, u pacjentów z prawidłową spirometrią vs. z zaburzeniami wentylacji, u pacjentów z występującą obturacją. Otrzymane wyniki poszerzają

wiedzę na temat udziału czynników genetycznych i epigenetycznych w rozwoju sarkoidozy układu oddechowego i ich związku z różnym obrazem klinicznym i przebiegiem choroby. Badania, które zamierzamy kontynuować w przyszłości, będą mogły przyczynić się do opracowania panelu markerów genów/miRNA użytecznych klinicznie, a tym samym ograniczyć konieczność wykonywania u pacjentów szeregu drogich i niedostępnych na szeroką skalę badań dodatkowych (np. HRCT, USG, bronchofibreskopii), stosowanych obecnie w diagnostyce sarkoidozy.

- W materiale uzyskanym od pacjentów z sarkoidozą (BALF, PBMC) badaliśmy także poziom ekspresji genu cyklooksygenazy 2 (*COX-2*) pod kątem przydatności w diagnostyce choroby jako mediatora procesu zapalnego (*załącznik 4, pkt II A, poz. 18*). *COX-2*, pobudzany przez cytokiny prozapalne i czynniki wzrostowe (np.  $TGF\beta$ ), to kluczowy enzym w syntezie prostaglandyn, zwłaszcza  $PGE_2$ , pełniący rolę inhibitora proliferacji fibroblastów i produkcji kolagenu. W przebiegu sarkoidozy wyniki różnych badań wskazują na obniżony poziom *COX-2* w wyniku polimorfizmów genu, natomiast brak jest prac analizujących poziom mRNA genu. W przeprowadzonym przez nasz Zespół badaniu zaobserwowaliśmy obniżony poziom ekspresji genu *COX-2* zarówno w komórkach BALF, jak i w PBMC. Obniżony poziom ekspresji genu może się wiązać z zaburzoną biosyntezą prostaglandyn, a co za tym idzie – zwiększoną aktywnością fibroblastów i odkładaniem kolagenu w czasie rozwoju sarkoidozy. W badaniu próbowaliśmy m.in. odpowiedzieć na pytanie, czy poziom ekspresji *COX-2* mierzony w krwi pacjentów może pełnić rolę swoistego markera sarkoidozy. Uzyskane wyniki sugerują potencjalne znaczenie prognostyczne poziomu ekspresji *COX-2*, na podstawie ujemnej korelacji z  $FEV_1$ , BALFL% i 24h utratą  $Ca^{2+}$  w moczu, ale zagadnienie wymaga dalszych badań.

Dodatkowo wyniki naszych badań zostały przedstawione w formie 8 doniesień zjazdowych (*załącznik 4, pkt III B, poz. 36, 41, 42, 46, 50, 51, 60, 63*).

Trzeci projekt, realizowany w latach 2012-2015 (*załącznik 4, pkt. II I, poz. 15*) miał na celu analizę zmian molekularnych w odniesieniu do wybranych genów supresorowych (*ARHI, CDHI, p16INK4A, TFF3, TIMP3, CDKN2A, KCNQ1, PTEN, FAM129A*) pod kątem ich przydatności w diagnostyce nowotworów tarczycy różnicującej poszczególne typy histopatologiczne (FA, FTC, FVPTC). Analiza ta stanowiła rozszerzenie wcześniejszych badań nad procesem karcynogenezy w gruczole tarczowym, w których uczestniczyłam. Materiał do badań (tkanka i bioptaty guzków tarczycy) uzyskaliśmy dzięki współpracy z Kliniką Chirurgii Endokrynologicznej, Ogólnej i Naczyniowej UM. Badania z wykorzystaniem materiału biopsyjnego tarczycy obejmowały analizę czynników genetycznych i epigenetycznych, w tym: mutacje onkogenów i genów supresorowych, rearanżacje genowe i chromosomowe, LOH/MSI (*loci* 10q23.2, 10q23.31, 10q24-24.1), zaburzenia wzoru ekspresji i metylacji DNA genów supresorowych w zmianach wywodzących się z komórek pęcherzykowych tarczycy: FA, FTC i PTC oraz w NG. Badania wykazały porównywalny poziom ekspresji genów *CDKN2A, KCNQ1* oraz *CDHI* w tkance nowotworowej i materiale z bioptatów dla

całej grupy, jak i w poszczególnych grupach rozpoznać. To ważna obserwacja, która sugeruje, że geny te mogą potencjalnie służyć jako biomarkery różnicujące podtypy histopatologiczne raka tarczycy: poziom ekspresji genów *FAM129A* i *CDHI* był najwyższy w grupie PTC, natomiast genu *CDKN2A* w grupie FA. Natomiast zaobserwowane istotne statystycznie różnice w ekspresji genów *ARHI* i *PTEN* pomiędzy tkanką guza a bioptatem guzka uniemożliwiają uznanie tych genów jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych do wykorzystania w materiale biopsyjnym. Poziom ekspresji *ARHI* i *PTEN* była znacząco podwyższony w materiale z biopsji śródoperacyjnej, natomiast poziom ekspresji *TIMP3* był obniżony, choć bez istotności statystycznej.

W tej grupie przeprowadziliśmy analizę występowania mutacji V600E genu *BRAF* (w obrębie egzonu 15). Mutacje genu *BRAF* stwierdziliśmy jedynie u 6/56 pacjentów, również w grupie FA i NG (1 i 2 przypadki, odpowiednio), co może wskazywać na potencjał przekształcenia zmian łagodnych w kierunku nowotworu złośliwego.

Przeprowadzona ocena poziomu metylacji regionów promotorowych genów *ARHI*, *CDKN2A*, *KCNQ1*, *TIMP3* i *TFF3* wykazała obecność alleli zmetylowanych dla wszystkich badanych genów oraz we wszystkich grupach rozpoznać. Najwyższy poziom metylacji, sięgający 100% (co oznacza obecność tylko alleli zmetylowanych), zaobserwowaliśmy dla genu *ARHI*, natomiast najniższy poziom metylacji dla genu *CDKN2A* – allel M obecny był tylko w 19% próbek. W przypadku genów *TIMP3* i *TFF3* wykazaliśmy istotną korelację pomiędzy poziomem ich ekspresji, jak również pomiędzy metylacją ich regionów promotorowych. Taki wynik może sugerować możliwość wykorzystania genów *TIMP3* i *TFF3* w potencjalnym panelu genowym.

Wyniki analizy niestabilności genetycznej w postaci utraty heterozygotyczności (LOH) i niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) wykazały zróżnicowaną częstość LOH/MSI pomiędzy regionami w różnych stadiach rozwoju nowotworu tarczycy, co może mieć znaczenie diagnostyczne i prognostyczne: LOH/MSI w 3p21.3 było charakterystyczne dla wczesnego etapu karcynogenezy, natomiast niestabilność genetyczną w 1p31.2 i 11p15.5 zaobserwowaliśmy w bardziej zaawansowanych stadiach procesu karcynogenezy tarczycy. Obliczona wartość indeksu FAL korelowała z wielkością guza w skali pTNM pT2-T4 vs. pT1 oraz ze średnicą guza. Na podstawie uzyskanych danych wnioskujemy, że dokonana przez nas ocena wartości FAL może być przydatna w predykcji progresji nowotworu. Ponadto, zaobserwowane istotne podwyższenie wartości FAL w FA/FTC może okazać się przydatne jako biomarker różnicujący zmiany PTC i NG od FA i FTC.

Najwyższą częstość LOH/MSI stwierdziliśmy dla markera D10S215 w 10q24 (*locus* genu *PAPSS2*) - 23% (8/35 informatywnych *loci*) i dla markera D10S541 w 10q23.2 (*locus* genu *PTEN*) - 18% (13/73 informatywnych *loci*). Podwyższona częstość występowania LOH/MSI w *locus* genu *PAPSS2* (10q24, marker D10S215) była statystycznie istotna.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane podczas polskich i europejskich kongresów endokrynologicznych w formie 6 prac zjazdowych (załącznik 4, pkt III B, poz. 39, 55-59), manuskrypty prac oryginalnych są w przygotowaniu.

Z zakresu tematyki zmian molekularnych związanych z procesem karcynogenezy w gruczole tarczowym, współuczestniczyłam w napisaniu dwóch prac poglądowych (załącznik 4, pkt II A, poz. 24, 25). Pierwsza z nich opisuje zmiany genetyczne i epigenetyczne w obrębie genów kodujących białka dwóch szlaków sygnałowych, MAPK/ERK i PI3K/Akt, takich jak: *RET*, *RAS*, *BRAF*, *PI3K*, *PTEN*, *AKT*, które mają znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórki pęcherzykowej tarczycy. Poznanie i zrozumienie tego typu mechanizmów molekularnych może stać się podstawą opracowania nowych strategii terapeutycznych hamujących onkogeną aktywność szlaków sygnałowych. Druga natomiast praca (załącznik 4, pkt II A, poz. 25) dotyczy niestabilności mikrosatelitarnej typu LOH/MSI jako mechanizmu wyciszającego ekspresję genów supresorowych i jego znaczenia w rozwoju i prognozowaniu przebiegu nowotworów tarczycy oraz możliwości wykorzystania jako markerów o znaczeniu diagnostycznym lub prognostycznym.

W ramach statutowych badań naukowych Zakładu Molekularnych Podstaw Medycyny analizowaliśmy kolejny mechanizm uczestniczący w karcynogenezie płuca, a mianowicie szlak sygnałowy JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), którego zaburzona aktywacja pełni jedną z centralnych ról w nowotworzeniu. Szlak JAK/STAT jako jedna ze ścieżek transdukcji sygnału w komórce przekazuje sygnały od cytokin, interleukin i czynników wzrostowych, które działają poprzez liczne rodziny receptorów transbłonowych. Wewnątrzkomórkowe części (ogony) tych receptorów związane są z nieaktywnymi kinazami, nazywanymi kinazami Janus (JAKs, *Janus kinases*), które po aktywacji rekrutują białka o funkcji przekaźników sygnału oraz aktywatorów transkrypcji (STATs, *signal transducers and activators of transcription*). Te z kolei, po fosforylacji (pSTAT), w postaci dimerów (homo- bądź heterodimerów) przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie aktywują proces transkrypcji wielu genów, zaangażowanych m.in. w procesy proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek.

Chociaż mechanizm w większości przypadków pozostaje nieznany, aktywacja szlaku JAK/STAT jest cechą licznych typów nowotworów. To skłania do poszukiwań nowych metod terapii opartych na blokowaniu konstytutywnie aktywowanych cząsteczek STAT3/STAT5, co - jak wskazują dostępne dane - prowadzi do apoptozy komórek guza, bez wpływu na komórki prawidłowe. Trwają również badania nad metodami supresji aktywności STATs, m.in. z wykorzystaniem siRNA, naturalnych bądź syntetycznych produktów uniemożliwiających zwiążanie się białek STAT z receptorem lub docelowym regionem DNA.

W naszych badaniach dotyczących cząsteczek szlaku sygnałowego JAK/STAT analizowaliśmy ekspresję i polimorfizm genu *STAT3* (załącznik 4, pkt II A, poz. 10) oraz poziom ekspresji genów *STAT5*, *COX-2* i *PIAS3* (załącznik 4, pkt II A, poz. 11) u pacjentów z NSCLC.

Gen *STAT3* (*locus* 17q21) pełni rolę onkogenu i regulatora procesów immunologicznych. Aktywacja *STAT3* na poziomie białka w wyniku fosforylacji pobudza procesy angiogenezy, przerzutowania i inwazyjność guza, oraz hamuje apoptozę komórek nowotworowych. Potwierdzony jest także związek pomiędzy polimorfizmami pojedynczych nukleotydów w sekwencji genu *STAT3* a podatnością na nowotworzenie.

Dwie izoformy *STAT5*, *STAT5A* i *STAT5B* (kodowane przez dwa tandemowo sprzężone geny w *locus* 17q11.2) działają jako niezależne czynniki transkrypcyjne, które modulują ważne procesy komórkowe (różnicowanie, proliferacja, przeżycie) w różny sposób w komórkach prawidłowych i w nowotworowych. Pomimo badań opisujących wzrost ekspresji *STAT5* w kilku typach nowotworów (rak piersi, prostaty) [61], mało jest podobnych analiz w raku płuca.

*COX-2* (*cyclooxygenase-2*) to kluczowy enzym w syntezie prostaglandyn, pełniący rolę w odpowiedzi zapalnej, zaangażowany w proces inicjacji i progresji guzów *in situ*, którego zwiększony poziom ekspresji mRNA zaobserwowano w wielu typach nowotworów, w tym NSCLC [62]. Brak jest jednak badań wiążących karcynogeny wpływ nadekspresji *COX-2* i *STAT5* u pacjentów z NSCLC.

*PIAS3* (*protein inhibitor of activated STAT3*) moduluje onkogeną aktywność *STAT3*, natomiast jego interakcja z *STAT5* nie została w pełni wyjaśniona. Podobnie, w niewielkiej liczbie prac analizowano udział *PIAS3* w procesie onkogenezy, włączając raka płuca. W liniach komórkowych NSCLC wykazano, że nadekspresja *PIAS3* wywiera hamujący wpływ na wzrost guza [63].

Wyniki uzyskane przez nasz Zespół ujawniły zwiększony poziom ekspresji genów *STAT5A*, *STAT5B* i *COX-2* w, odpowiednio, 69%, 79% i 71% próbach NSCLC oraz obniżony poziom ekspresji genu *PIAS3* w 69% badanych tkanek płuca (załącznik 4, pkt II A, poz. 11).

Wykazaliśmy zróżnicowany poziom ekspresji obydwóch badanych izoform genu *STAT5* w tkance NSCLC: poziom ekspresji *STAT5B* był istotnie wyższy w porównaniu do *STAT5A*, co może sugerować odmienne funkcje obydwóch izoform w raku płuca, w tym różne geny docelowe (np. onkogeny) pobudzane przez *STAT5A* i *STAT5B*. Dodatkowo, ekspresja *STAT5B* była istotnie wyższa w grupie guzów zakwalifikowanych pod względem wielkości (cecha T) jako T2, co podkreśla znaczenie tej izoformy w karcynogenezie płuca. Związek poziomu ekspresji *STAT5B* z progresją NSCLC wymaga jednak dalszych badań i potwierdzenia, ponieważ jak dotąd brak jest prac analizujących *STAT5B* pod kątem prognostycznym bądź rokowniczym w raku płuca.

Zaobserwowaliśmy także istotną ujemną korelację pomiędzy *STAT5B* i *PIAS3*, co może potwierdzać hamujący wpływ *PIAS3* na aktywność transkrypcyjną izoformy *STAT5B*.

W odniesieniu do *COX-2*, potwierdziliśmy zwiększony poziom ekspresji genu w NSCLC, niezależnie od podtypu histopatologicznego. Obserwacje innych badaczy wskazują na zwiększony poziom ekspresji białka *COX-2* w AC [64]. Uzyskany wynik może więc świadczyć o potranslacyjnych modyfikacjach białka w komórkach raka płuca.

Interesującym wynikiem, jaki uzyskaliśmy, jest istotna dodatnia korelacja pomiędzy zwiększonym poziomem ekspresji *COX-2* a zwiększonym poziomem ekspresji *STAT5B*. Może to potwierdzać wyniki przedstawione przez Cao i wsp. [65], którzy w podtypie AC opisali stymulujący wpływ aktywacji szlaku *STAT5* na ekspresję *COX-2*.

Pomimo ważnej roli genu *STAT3* w nowotworzeniu, badania analizujące obecność polimorfizmów w obrębie sekwencji genu, poziom ekspresji tego genu, jak również ich wzajemną korelację w raku płuca są nieliczne, zwłaszcza w populacjach europejskich. Badanie opublikowane w 2011 roku udokumentowało związek pomiędzy ekspresją *STAT3* a wzrostem i przeżyciem komórek NSCLC, jak również ich opornością na radioterapię [66]. Natomiast znaczenie kilku SNP w genie *STAT3* u pacjentów z NSCLC opisano w populacji azjatyckiej, ale nie skorelowano ich z ekspresją genu [67].

W naszym badaniu (załącznik 4, pkt II A, poz. 10) analizowaliśmy występowanie dwóch polimorfizmów w genie *STAT3* (rs744166 i rs3816769) i ocenialiśmy związek pomiędzy genotypami oraz wariantami allelicznymi genu a predyspozycją do rozwoju NSCLC. Ponadto, korelowaliśmy badane genotypy z poziomem ekspresji genu. Zgodnie z naszą wiedzą jest to pierwsze tego typu badanie przeprowadzone u pacjentów z NSCLC z populacji europejskiej.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują istotny wpływ obydwóch polimorfizmów (rs744166 i rs3816769) na rozwój raka płuca. Stwierdziliśmy ochronny wpływ genotypów *STAT3* CC (rs3816769) i AA (rs744166) oraz istotny związek z podatnością na rozwój NSCLC genotypów TT (rs3816769) i GG (rs744166). Należy jeszcze raz podkreślić, że w przypadku polimorfizmu rs3816769 brak jest innych badań analizujących ten SNP w raku płuca, natomiast związek drugiego z badanych polimorfizmów, rs744166, z ryzykiem rozwoju NSCLC został wykazany w populacji chińskiej, w której jednak stwierdzono, że obecność genotypu GG wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju raka płuca [67]. Taki przeciwstawny wynik może wynikać z różnic populacyjnych.

Analiza względnej ekspresji *STAT3* wykazała zwiększony poziom ekspresji genu w ponad 70% prób NSCLC. Najwyższy poziom ekspresji genu stwierdzono w SCC, najniższy w LCC – różnica pomiędzy tymi podtypami była istotna statystycznie. Według naszej wiedzy, to również pierwsza praca analizująca poziom ekspresji *STAT3* na poziomie mRNA w raku płuca. Praca opublikowana w roku 2012 dotyczyła ekspresji *STAT3* na poziomie białka w raku drobnokomórkowym płuca [68].

Co istotne, dodatkowo stwierdziliśmy dodatnią korelację pomiędzy nadekspresją genu *STAT3* a genotypem TT (rs3816769) predysponującym do zwiększonego ryzyka rozwoju NSCLC.

Tak więc uzyskane przez nas wyniki potwierdziły zaburzoną regulację ekspresji genów kodujących cząsteczki szlaku JAK/STAT i ich rolę w karcynogenezie płuca. Tym samym potwierdziliśmy zasadność badań ukierunkowanych na analizę i poszukiwanie selektywnych inhibitorów cząsteczek szlaku JAK/STAT w terapii celowanej raka płuca związanej z obniżeniem aktywności szlaku. Istotne różnice w poziomie ekspresji *STAT3* pomiędzy podtypami NSCLC mogą

sugerować możliwość uznania genu za marker o znaczeniu diagnostycznym; dodatkowo zaobserwowany związek pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *STAT3* a rozwojem NSCLC, oraz korelacja genotypu TT z wysokim poziomem ekspresji genu może również sugerować możliwość jej wykorzystania w przyszłości w diagnostyce raka niedrobnokomórkowego płuca u polskich pacjentów (konieczność przeprowadzenia potwierdzających badań na większej grupie chorych).

Wyniki naszych badań zostały przedstawione również w formie 4 doniesień zjazdowych (*załącznik 4, pkt III B, poz. 30, 33, 37, 38*).

Oprócz analizy poziomu ekspresji molekuł szlaku sygnałowego JAK/STAT na poziomie mRNA, dokonaliśmy również analizy poziomu ekspresji białek pSTAT3, pSTAT5 i pSTAT6 (form ufosforylowanych), jak również PIAS3, SOCS3 i COX-2. Zagadnienie było interesujące ze względu na fakt, że poziom białka nie musi odzwierciedlać poziomu mRNA - z powodu alternatywnego splicingu bądź modyfikacji potranslacyjnych. W przeprowadzonym badaniu nadekspresję wszystkich białek STAT stwierdziliśmy w 52-77% prób NSCLC, a istotnie wyższy poziom immunoekspresji pSTAT3 i pSTAT6 odnotowaliśmy w podtypie SCC, co w przypadku pSTAT3 potwierdziło nasze wyniki dotyczące poziomu mRNA genu *STAT3*. Tak więc obydwie białka (pSTAT3 i pSTAT6) mogą mieć znaczenie jako markery różnicujące podtypy NSCLC. Zgodnie z naszą wiedzą, przeprowadzona przez nas analiza poziomu immunoekspresji pSTAT6 była pierwszym takim badaniem w NSCLC. W przypadku białka pSTAT5 statystycznie istotne różnice zaobserwowaliśmy pomiędzy tkanką nowotworową a niezmienioną makroskopowo, co może sugerować diagnostyczne znaczenie tego białka i możliwość uznania pSTAT5 za potencjalny cel terapeutyczny. Pod względem wielkości guzów (cecha T w skali pTNM) istotnie wyższy poziom białka pSTAT5 został stwierdzony w grupie największych guzów (pT3+pT4), wskazując na rolę tego białka w zaawansowanych stadiach raka płuca i w progresji NSCLC. Poziom ekspresji inhibitorów STAT (PIAS3 i SOCS3) był obniżony w 52-92% prób NSCLC. Wyniki naszych badań potwierdziły rolę konstytucyjnie aktywowanych białek STAT w karcynogenezie płuca. Stąd wydaje się, że zablokowanie aktywności STAT – albo na poziomie mRNA albo białka – może stać się celem terapii przeciwnowotworowej, która zahamuje wzrost guza bądź wzmocni odpowiedź immunologiczną organizmu. Z drugiej strony, potwierdzenie obniżonego poziomu inhibitorów STAT (mRNA/białko) wskazuje na ich potencjalne znaczenie w terapii NSCLC poprzez inhibicję białek STAT. W kontekście potencjalnej terapii ważna wydaje się także zaobserwowana – według naszej wiedzy po raz pierwszy w raku płuca – ujemna korelacja pomiędzy pSTAT5 a PIAS3, która wskazuje na możliwość modulacji aktywności STAT5 poprzez mechanizm PIAS3.

Wyniki badania dotyczącego analizy szlaku JAK/STAT na poziomie ekspresji białek zostały zaprezentowane w formie doniesienia zjazdowego (*załącznik 4, pkt III B, poz.48*), w recenzji znajduje się także manuskrypt, którego jestem pierwszym autorem.



Równoległe do badań związanych z analizą podłoża molekularnego rozwoju raka płuca i tarczycy, współuczestniczyłam w badaniach dotyczących raka prostaty (*załącznik 4, pkt II A, poz. 9*), dzięki współpracy z Katedrą Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego oraz zmian nowotworowych (śródnaślukowa neoplazja) szyjki macicy (*załącznik 4, pkt II A, poz. 12*) – materiał do badań uzyskaliśmy w wyniku współpracy z Kliniką Ginekologii Operacyjnej i Ginekologii Onkologicznej ICZMP w Łodzi. W przypadku raka prostaty uczestniczyłam w analizie częstości występowania niestabilności genetycznej typu LOH/MSI, której celem było zidentyfikowanie markerów molekularnych związanych z rozwojem i progresją choroby nowotworowej. Do analizy LOH/MSI w materiale biopsyjnym wykorzystaliśmy 16 markerów mikrosatelitarnych z następujących regionów chromosomowych: 1p31.2, 3p21.3-25.3, 7q32.2, 9p21.3, 11p15.5, 12q23.2 i 16q22.1. Najwyższy odsetek LOH/MSI zaobserwowaliśmy w regionach 7q32.2 (31.25%) i 16q22.1 (26.60 %). Obliczony wskaźnik FAL w sposób istotny korelował z wielkością guza (klasyfikacja TNM). Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że niestabilność genetyczna jest częstym zjawiskiem związanym z rozwojem raka prostaty, a wskaźnik FAL może mieć kliniczne znaczenie w klasyfikacji molekularnej nowotworu. Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących niestabilności genetycznej w raku prostaty możemy wnioskować o użyteczności obliczania wskaźnika FAL – w oparciu o zmiany LOH/MSI w kilku regionach chromosomowych – jako uniwersalnym markerze korelującym z czynnikami istotnymi w nowotworzeniu.

W przypadku pacjentek ze śródnaślukowymi zmianami szyjki macicy (o różnym stopniu nasilenia), analizowaliśmy poziom ekspresji genów związanych z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) typu 16 (*załącznik 4, pkt II A, poz. 12*). Podwyższoną ekspresję genów *E6\*I/E6\*II* i *E7* stwierdziliśmy we wszystkich badanych grupach. Statystycznie istotną korelację pomiędzy poziomami ekspresji genów *E6\*I* i *E6\*II* odnotowaliśmy w grupie pacjentek ze zmianami średniego i dużego stopnia (CIN2/CIN3). Wnioskiem tego pilotażowego badania jest możliwość uznania poziomu ekspresji genu *E6\*II* jako wskaźnika wyższego stopnia zaawansowania zmian w komórkach szyjki macicy lub czynnika ryzyka związanego z progresją choroby u pacjentek ze średnim i dużym stopniem śródnaślukowej neoplazji szyjki macicy. Wyniki pracy zostały zaprezentowane również w formie doniesienia zjazdowego na konferencji zagranicznej (*załącznik 4, pkt III B, poz. 35*). Ponadto, w tym samym materiale biologicznym analizowaliśmy niestabilność genetyczną LOH/MSI, a wyniki pracy przedstawiłmy na konferencji naukowej (*załącznik 4, pkt III B, poz. 31*).

W zakresie moich zainteresowań badawczych była też analiza podłoża molekularnego rozwoju autoimmunologicznych chorób tarczycy związana z oceną występowania polimorfizmów w genie *CTLA-4*. Dokładna etiologia AITD nadal pozostaje nieznaną, szacuje się, że za progresję choroby odpowiadają w 79% czynniki genetyczne, a więc mutacje i polimorfizmy genów związanych z funkcją układu odpornościowego i w 21% czynniki środowiskowe, w tym podatność osobniczą. Zidentyfikowano kilka genów odpowiedzialnych za powstawanie AITD. Są to geny

immunomodulujące, takie jak molekuly głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC klasy II, geny odpowiadające za odpowiedź immunologiczną, jak antygen-4-cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4), cząsteczka CD40, białko fosfatazy tyrozynowej-22 (PTPN 22) oraz geny specyficzne dla gruczołu tarczowego: TG, TPO i TSHR.

CTLA-4 jest głównym negatywnym regulatorem aktywacji limfocytów T poprzez współzawodnictwo w wiązaniu białka B7, obecnego na powierzchni komórek prezentujących antygen z cząsteczką kostymulującą CD28. Dlatego mutacje w genie *CTLA-4* mogą powodować nadmierną aktywację limfocytów T i rozwój autoimmunizacji. Związanie cząsteczki CTLA-4 z przeciwciałem monoklonalnym daje zwiększoną proliferację komórek T i produkcję interleukiny-2. Dodatkowo polimorfizmy genu *CTLA-4*, zwłaszcza A49G i CT60, są związane z wszelkimi formami AITD w wielu populacjach. Jednak, do momentu badań przeprowadzonych przez nasz Zespół, brak było tego typu badań w populacji polskiej.

Dzięki współpracy z Zakładem Zaburzeń Endokrynych i Metabolizmu Kostnego UM w Łodzi, w materiale biologicznym (krew obwodowa) uzyskanym od osób dorosłych z chorobą Gravesa (GD) i zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT) badaliśmy częstość występowania polimorfizmów A49G, 1822 C/T i CT60 A/G (załącznik 4, pkt II A, poz. 7), natomiast w grupie dzieci i młodych osób (wiek 10-19 lat) z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (współpraca z Zakładem Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Kształcenia Podyplomowego, Warszawa) analizowaliśmy polimorfizmy +49 A/G i -318 C/T (załącznik 4, pkt II A, poz. 8). Uzyskane przez nasz Zespół wyniki wykazały rolę polimorfizmu *CTLA-4* A49G w rozwoju autoimmunologicznych chorób tarczycy u osób dorosłych: związek genotypu CTLA-4 GG z rozwojem choroby Gravesa i zapalenia tarczycy typu Hashimoto oraz ochronny wpływ genotypu CTLA-4 AA (załącznik 4, pkt II A, poz. 7). W grupie młodych pacjentów występowanie polimorfizmów genu *CTLA-4* dodatkowo korelowaliśmy z poziomem przeciwciał przeciwtarczycowych (TPOAb i TgAb) (załącznik 4, pkt II A, poz. 8). Genotypowanie SNP przeprowadzaliśmy z użyciem sond TaqMan. Uzyskane wyniki wykazały, że genotypy CTLA-4 +49 GG i -318 CT istotnie częściej występowały u pacjentów, natomiast genotypy +49 AA i -318 CC w grupie kontrolnej. Statystycznie wyższe poziomy TPOAb i TgAb były skorelowane z allelem G u pacjentów z HT, a z allelem T u pacjentów z GD. Tak więc wyniki badania potwierdziły, że obydwie analizowane polimorfizmy mają istotne znaczenie jako podłoże genetyczne rozwoju autoimmunologicznych chorób tarczycy, a ich obecność wiąże się z wysokimi stężeniami przeciwciał przeciwtarczycowych. Wyniki pracy zostały zaprezentowane również w formie doniesienia zjazdowego (załącznik 4, pkt III B, poz. 32).

W materiale uzyskanym od pacjentów z AITD analizowaliśmy także częstość występowania polimorfizmów w genie *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*): rs3816769 C>T i rs744166 A>G (załącznik 4, pkt II A, poz. 16). STAT3 jako cząsteczka szlaku sygnałowego Jak/STAT, pełni istotną rolę w regulacji układu odpornościowego, uczestnicząc w działaniu różnych cytokin.

Celem badania była korelacja badanych polimorfizmów z ryzykiem rozwoju AITD, z poziomem przeciwciał przeciwtarczycowych (TPOAb, TgAb, TRAb) oraz z poziomem prozapalnych cytokin IL6 i IL17 w surowicy pacjentów. Uzyskane przez nasz Zespół wyniki wykazały istotnie wyższą częstość występowania allele A (rs744166 A>G) u pacjentów z AITD, natomiast allele G w grupie kontrolnej. Podobnie allel C i genotyp CC (rs3816769 C>T) częściej występował u osób zdrowych. Z genotypem CT rs3816769 u pacjentów z HT wiązał się istotnie wyższy poziom TgAb, natomiast stężenie w IL6 i IL17 wykazywało dodatnią korelację z TPOAb. Wyniki badania wskazują, że obydwa polimorfizmy odgrywają ważną rolę w rozwoju AITD, a polimorfizmy w genie *STAT3* mogą wpływać na poziom przeciwciał przeciwtarczycowych u pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

Kolejne prace badawcze wiążą się ze współpracą z Kliniką Pneumonologii i Alergologii UM. Współuczestniczyłam w analizie ekspresji i immunoekspresji molekuł szlaku IL-4/IL-13/STAT6 w surowicy pacjentów ze zdiagnozowaną oskrzelową astmą atopową (załącznik 4, pkt II A, poz. 19). Celem badania było włączenie w poszukiwanie informatywnych markerów diagnostycznych charakterystycznych dla poszczególnych fenotypów astmy, co mogłoby wspomóc rozpoznanie tej choroby, jej klasyfikację i leczenie. Analizowaliśmy zależności pomiędzy poziomem ekspresji/immunoekspresji badanych genów/białek a stopniem kontroli astmy (astma kontrolowana i niekontrolowana), cechami klinicznymi pacjenta (wiek, płeć, palenie papierosów) oraz parametrami czynnościowymi płuc (PEF%, FEV1%, FVC%, FEV1/FVC), poziomem IgE i nasileniem eozynofilii.

Pośród białek STAT kluczowe znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej i patogenezie astmy atopowej odgrywa aktywacja STAT6 poprzez IL-4 i IL-13, stymulując odpowiedź humoralną organizmu oraz regulując transkrypcję genów docelowych. Uzyskane wyniki podkreśliły rolę cytokin IL-4 i IL-13 oraz STAT6 w rozwoju atopii i astmy, poprzez promowanie nadreaktywności i stanów zapalnych dróg oddechowych. Nowością badania była analiza ekspresji *IL-4*, *IL-13* i *STAT6* na poziomie mRNA – tego typu badań u pacjentów z astmą opublikowano niewiele. Uzyskane wyniki wykazały wyższy poziom ekspresji badanych genów u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, a różnice dotyczące *IL-13* były istotne statystycznie. Dodatkowo, wyższy poziom ekspresji tej cytokiny, podobnie jak *IL-4*, zaobserwowaliśmy zwłaszcza u pacjentów z niekontrolowaną astmą atopową. Ekspresja genu *IL-13* korelowała z poziomem immunoekspresji IgE w surowicy pacjentów, co sugeruje związek nadekspresji *IL-13* z atopią. W przypadku IL-4 uzyskane przez nas wyniki wykazały dodatnią korelację z poziomem ekspresji genu *STAT6*, co potwierdziło stymulujący wpływ aktywacji czynnika transkrypcji STAT6 na ekspresję *IL-4*. Również dodatnia korelacja pomiędzy poziomem ekspresji *IL-13*, poziomem ekspresji i immunoekspresji STAT6 oraz poziomem IgE w surowicy pacjentów wskazała na rolę tych genów i białek w przebiegu astmy. Nadekspresja genów *STAT6* i *IL-13* może w przyszłości stać się celem inhibicji w terapii pacjentów z atopową astmą. Wyniki badania zostały przedstawione także w formie doniesienia zjazdowego (załącznik 4, pkt III B, poz. 49).

Materiałem badawczym uzyskanym od pacjentów chorujących na astmę oskrzelową był także płyn z płuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*), z którego pozyskiwaliśmy makrofagi do dalszych badań. Moim zadaniem była standaryzacja metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP, *chromatin immunoprecipitation*) i izolacji DNA związanego z acetylowanymi histonami H4 oraz analiza stopnia acetylacji histonów. Z makrofagów izolowaliśmy także białka jądrowe w celu oceny poziomu immunoekspresji deacetylaz histonowych (HDAC) 1, 2 i 8 metodą ELISA. Celem tych badań była analiza zmian epigenetycznych związanych z przebudową chromatyny i mających wpływ na regulację procesów na poziomie komórki, co badaliśmy oceniając poziom ekspresji wybranych genów (*GM-CSF*, *IL-8*), jak również poszukiwanie biomarkerów molekularnych wspomagających kliniczną klasyfikację chorych (astma kontrolowana i niekontrolowana), markerów skorelowanych z ryzykiem zaostrzeń, przydatnych w monitorowaniu i leczeniu chorych z astmą oskrzelową. Wyniki badań zostały już opracowane, a manuskrypt wysłany do czasopisma (*załącznik 4, pkt II A, poz. 22*), natomiast z zakresu tej tematyki współuczestniczyłam w napisaniu dwóch prac poglądowych, z których jedna dotyczy czynników molekularnych (genetycznych i epigenetycznych) związanych z opornością na glukokortykoidy obserwowaną u pacjentów chorujących na astmę oskrzelową (*załącznik 4, pkt II D, poz. 12*), a druga opisuje związek pomiędzy zmianami epigenetycznymi wpływającymi na remodeling chromatyny a działaniem receptora glukokortykoidowego (*załącznik 4, pkt II A, poz. 26*). Lepsze rozumienie mechanizmów epigenetycznych w przebiegu astmy może stać się podstawą do tworzenia nowych strategii zapobiegania rozwojowi schorzenia lub spersonalizowanych metod terapeutycznych. Już obecnie, w oparciu o poznawane mechanizmy epigenetyczne, tworzone są nowe strategie leczenia wielu schorzeń, w tym astmy oskrzelowej.

Obecnie, moje zainteresowania badawcze zostały nakierowane na badanie roli miRNA w karcynogenezie płuca. Kontynuacją tej bardzo interesującej tematyki (*załącznik 4, pkt I B, poz. 2* – publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego) jest dalsza analiza poziomu ekspresji kolejnych miRNA (miR-20a, miR-17) oraz docelowych dla nich genów: metaloproteinazy 2 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2) i tkankowego inhibitora metaloproteinaz (TIMP-3) w tkance niedrobnokomórkowego raka płuca. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) to endoproteinazy, które degradują białkowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Zmiany w strukturze ECM towarzyszą wielu procesom fizjologicznym, a aktywność enzymów jest regulowana na poziomie transkrypcji, aktywacji prekursorowych zymogenów proMMP i oddziaływań z endogennymi inhibitorami (TIMP). Zaburzenia równowagi w układzie MMP/TIMP wpływają na rozwój wielu chorób, między innymi nowotworów. Cel badania wpisuje się w poszukiwanie panelu markerów molekularnych (miRNA) związanych z wczesnym etapem rozwoju NSCLC, jak również – ze względu na dużą heterogenność podtypów NSCLC – różnicujących jego podtypy histopatologiczne. Ustalenie panelu markerów o znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym będzie

miało istotne znaczenie wspomagając wczesne rozpoznanie zmian nowotworowych w tkance płuca, jak również zwiększy szanse na opracowanie w przyszłości indywidualnej terapii celowanej.

Z zakresu roli miRNA w karcynogenezie płuca, analizowaliśmy również poziom ekspresji miR-34a, miR-141, miR-143 i miR-217 korelując uzyskane wyniki z poziomem ekspresji ich genów docelowych: *RARB* i *FHIT*. Materiałem biologicznym była tkanka płuca pobrana ze zmiany pierwotnej (NSCLC) oraz marginesu operacyjnego (grupa kontrolna). Zaobserwowaliśmy obniżenie poziomu ekspresji obydwóch genów supresorowych (*RARB* w 52% prób, *FHIT* w 45% prób) oraz miR-34a (63%) i miR-143 (71%), natomiast poziom ekspresji miR-141 i miR-217 był podwyższony (odpowiednio w 63% i 72% prób). W grupie NSCLC stwierdziliśmy dodatnią korelację między poziomami ekspresji *FHIT* i miRNA-217, co może sugerować ich wzajemny regulatorowy związek. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników możemy wnioskować, że miR-141 i miR-217 mogą pełnić funkcję onkogenną w przebiegu NSCLC, a miR-34a i miR-143 – funkcję supresorową. Wyniki badania zostały zaprezentowane w formie doniesienia zjazdowego (załącznik 4, pkt III B, poz. 61).

Informacje na temat roli pełnionej przez miRNA w różnych typach nowotworów są cenne z punktu widzenia terapii. Celem terapii mogą być miRNA ulegające zarówno podwyższonej, jak i obniżonej ekspresji. Antysensowne oligonukleotydy komplementarne do dojrzałych miRNA (antagomiry) mogą powodować ich inhibicję, tak więc skutkiem wprowadzenia takich cząsteczek do tkanek nowotworowych będzie przywrócenie ekspresji wyciszanego wcześniej supresora nowotworu. Natomiast obniżenie ekspresji miRNA w nowotworach może być kompensowane poprzez wprowadzenie specjalnie zaprojektowanych wektorów zawierających kasetę ekspresyjną miRNA, wówczas podwyższenie ekspresji miRNA spowoduje wyciszenie onkogenu, a tym samym obniżenie proliferacji i wzrost apoptozy komórek nowotworowych.

Od grudnia 2015 roku pełnię funkcję p.o. kierownika Uczelnianego Laboratorium Antropometrii Trójwymiarowej CDUM w Łodzi. W laboratorium możliwe jest dokonanie takich pomiarów, jak analiza składu ciała czy skan 3D całego bądź fragmentu ciała z wykorzystaniem wysoce specjalistycznej aparatury. Efektem badań wykonanych w 2016 roku były prace oryginalne prezentowane na Kongresie Naukowym Polskiego Towarzystwa Medycyny Sportowej (23.09-24.09.2016, Łódź):

1. Metoda bioimpedancji i antropometrii 3D jako monitorowanie wpływu treningu oraz diety na remodeling ciała u kobiet trenujących fitness. Autorzy: D. Domańska-Senderowska, A. Jegier, P. Kulesza, A. Michalski, E. Brzezińska-Lasota

2. Ocena efektów remodelingu ciała pod wpływem różnych form treningu i personalnie zbilansowanej diety – metoda bioimpedancji i antropometrii 3D. Autorzy: D. Domańska-Senderowska, A. Michalski, E. Brzezińska-Lasota

3. Ocena przebudowy ciała oraz siły mięśniowej u zawodników trenujących łyżwiarstwo szybkie po wybranym cyklu treningowym. Autorzy: D. Domańska-Senderowska, A. Jegier, A. Jabłońska, G. Padula, K. Kopacz, M. Fronczek-Wojciechowska, A. Michalski, E. Brzeziańska-Lasota

W ostatnim czasie jestem także zaangażowana w badania molekularne z zakresu sportu. Interesujące nas zagadnienia to czynniki genetyczne i epigenetyczne warunkujące wydolność i procesy adaptacji do wysiłku u sportowców (załącznik 4, pkt III B, poz. 66-68).

## Piśmiennictwo

- [1] Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer* 1995;75:191-202
- [2] Couraud S, Zalcman G, Milleron B, et al. Lung cancer in never smokers--a review. *Eur J Cancer* 2012; 48:1299-311. doi: 10.1016/j.ejca.2012.03.007
- [3] Brambilla E, Pugatch B, Geisinger K, et al. Large cell carcinoma. In: Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, et al. editors. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. WHO Press, Geneva, 2004:45-50
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332
- [5] Rak płuca, standardy diagnostyki i leczenia w Polsce RAPORT. <http://docplayer.pl/5309066-Rak-pluca-standardy-diagnostyki-i-leczenia-w-polsce-raport.html>
- [6] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016; 5(3):288-300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07
- [7] Rossi G, Pelosi G, Barbareschi M, et al. Subtyping non-small cell lung cancer: relevant issues and operative recommendations for the best pathology practice. *Int J Surg Pathol*. 2013; 21(4):326-36. doi: 10.1177/1066896913489346
- [8] Lu Y, Wang L, Liu P, et al. Gene-expression signature predicts postoperative recurrence in stage I non-small cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2012; 7(1):e30880. doi: 10.1371/journal.pone.0030880
- [9] Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, et al. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*. 2004; 22(5):811-9
- [10] Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, et al. Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(10):2946-54
- [11] Raponi M, Zhang Y, Yu J, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*. 2006; 66(15):7466-72
- [12] Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, et al. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene*. 2005; 24(47):7105-13
- [13] Guz M, Rivero-Müller A, Okoń E, et al. MicroRNAs-role in lung cancer. *Dis Mark*. 2014. doi: 10.1155/2014/218169
- [14] Sanfiorenzo C, Ilie MI, Belaid A, et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One* 2013; doi: 10.1371/journal.pone.0054596
- [15] Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A, et al. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2012; doi: 10.1371/journal.pone.0032307
- [16] Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, et al. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2010; doi: 10.1186/1471-2407-10-75
- [17] Heller G, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Lung cancer: From single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29:95-107. doi: 10.1007/s10555-010-9203-x
- [18] Liloğlu T, Bediaga NG, Brown BR, et al. Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Cancer Lett*. 2014; 342:200-12
- [19] Foulks JM, Parnell KM, Nix RN, et al. Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *J Biomol Screen*. 2012; doi: 10.1177/1087057111421212
- [20] Guo S, Yan F, Xu J, et al. Identification and validation of the methylation biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Epigenetics*. 2015; doi: 10.1186/s13148-014-0035-3
- [21] Awakura Y, Nakamura E, Ito N, et al. Methylation-associated silencing of TU3A in human cancers. *International Journal of Oncology* 2008; 33, 893-9

- [22] Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, et al. PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:1128-36
- [23] van den Boom J, Wolter M, Blaschke B, et al. Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *International Journal of Cancer* 2006; 119: 2330-38
- [24] Liu WJ, Tan XH, Guo BP, et al. Associations between RASSF1A promoter methylation and NSCLC: a meta-analysis of published data. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(6):3719-24. doi: 10.7314/APJCP.2013.14.6.3719
- [25] Li W, Deng J, Tang JX. Combined effects methylation of FHIT, RASSF1A and RAR $\beta$  genes on non-small cell lung cancer in the Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(13):5233-7. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.13.5233
- [26] Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, et al. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC) *Folia Histochem Cytobiol.* 2009; 47(2):275-80
- [27] Prudkin L, Behrens C, Liu DD, et al. Loss and reduction of FUS1 protein expression is a frequent phenomenon in the pathogenesis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(1):41-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1252
- [28] Dammann R, Li C, Yoon JH, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 2000; 25:315-19. doi: 10.1038/77083
- [29] Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, et al. Methylation of the DLEC1 gene correlates with poor prognosis in Japanese lung cancer patients. *Oncol Lett.* 2010; 1:283-7
- [30] Zhang Y, Miao Y, Yi J, et al. Frequent epigenetic inactivation of deleted in lung and esophageal cancer 1 gene by promoter methylation in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2010; 11:264-70
- [31] Geng X, Wang F, Zhang L, Zhang WM. Loss of heterozygosity combined with promoter hypermethylation, the main mechanism of human MutL Homolog (hMLH1) gene inactivation in non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Tumori.* 2009; 95:488-94
- [32] Seng TJ, Currey N, Cooper WA, et al. DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Br J Cancer.* 2008;99:375-82
- [33] Li W, Deng J, Jiang P, et al. Methylation of the RASSF1A and RAR $\beta$  genes as a candidate biomarker for lung cancer. *Exp Ther Med* 2012; 3(6):1067-71
- [34] Tan C, Jin YT, Xu HY, et al. Correlation between RARbeta gene promoter methylation and P53 gene mutations in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012; 29(2):131-6
- [35] Kim JS, Kim JW, Han J, et al. Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66 (8): 4049-54
- [36] Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, et al. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 2004; 17: 440-8
- [37] Pavelic K, Krizanac S, Cacev T, et al. Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis-clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 2001; 7: 442-53
- [38] Chang JW, Chen YC, Chen CY, et al. Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:1639-46
- [39] Yoshino I, Fukuyama S, Kameyama T, et al. Detection of loss of heterozygosity by high-resolution fluorescent system in non-small cell lung cancer: association of loss of heterozygosity with smoking and tumor progression. *Chest.* 2003; 123:545-50. doi: 10.1378/chest.123.2.545.
- [40] Picard E, Seguin C, Monhoven N, et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1059-66. doi: 10.1093/jnci/91.12.1059
- [41] Xinarianos G, Liloglou T, Prime W, et al. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 2000; 60:4216-21
- [42] Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene.* 2001; 20:1509-18. doi: 10.1038/sj.onc.1204175
- [43] Ding XJ, Liu MX, Ao L, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 12q in non-small-cell lung carcinomas. *Virchows Arch.* 2011; 458(5):561-9. doi: 10.1007/s00428-011-1042-9
- [44] Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, et al. Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer.* 2000; 82:65-73. doi: 10.1054/bjoc.1999.0878
- [45] Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene.* 2002; 21(45):6877-83. doi: 10.1038/sj.onc.1205836
- [46] Berker-Karazüm S, Lülecı G, Ozbilim G, et al. Cytogenetic findings in thirty lung carcinoma patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 100:114-23. doi: 10.1016/S0165-4608(96)00422-0

- [47] Czarnecka K, Pastuszek-Lewandoska D, Migdalska-Sek M, et al. Aberrant methylation as a main mechanism of TSGs silencing in PTC. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3:137-57
- [48] Downing TE, Oktay MH, Fazzari MJ, Montagna C. Prognostic and predictive value of 16p12.1 and 16q22.1 copy number changes in human breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 198:52-61. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.12.007
- [49] Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, et al. Relationship between the loss of heterozygosity and tobacco smoking in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol Res*. 2007; 16:333-9
- [50] Leinonen T, Pirinen R, Böhm J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histol Histopathol*. 2008; 23:693-700. doi: 10.14670/HH-23.693
- [51] Dang X, Ma A, Yang L, et al. MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells. *Cancer Genet*. 2012. doi:10.1016/j.cancergen.2012.01.002
- [52] Wang H, Guan X, Tu Y, et al. MicroRNA-29b attenuates non-small cell lung cancer metastasis by targeting matrix metalloproteinase 2 and PTEN. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015. doi:10.1186/s13046-015-0169-y
- [53] Pang Y, Mao H, Shen L, et al. MiR-519d represses ovarian cancer cell proliferation and enhances cisplatin-mediated cytotoxicity in vitro by targeting XIAP. *Oncotargets Ther*. 2014. doi:10.2147/OTT.S60289
- [54] Tsai HC, Su HL, Huang CY, et al. CTGF increases matrix metalloproteinases expression and subsequently promotes tumor metastasis in human osteosarcoma through down-regulating miR-519d. *Oncotarget*. 2014; 5:3800-12
- [55] Fornari F, Milazzo M, Chieco P, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol*. 2012. doi:10.1002/path.3995
- [56] Page DB, Yuan J, Wolchok JD. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 in immunotherapies for melanoma and other cancers. *Immunotherapy* 2010; 2(3):367-79
- [57] Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the brake on the immune system: ipilimumab in melanoma and other tumours. *Cancer Biother Radiopharm* 2010; 25:601-13
- [58] Salvi S, Fontana V, Boccardo S, et al. Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2012; 61(9):1463-72
- [59] Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer* 2005; 117:538-50
- [60] Høgdall EVS, Kjaer SK, Glud E, et al. Evaluation of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene in ovarian cancer patients. From the Danish “malova” ovarian cancer study. *Anticancer Research* 2003; 23(4):3397-3404.
- [61] Tan SH, Nevalainen MT. Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 367-90
- [62] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89: 2637-45
- [63] Ogata Y, Osaki T, Naka T, et al. Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores the drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation. *Neoplasia* 2006; 8: 817-25
- [64] Li F, Liu Y, Chen H, et al. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30: 27
- [65] Cao S, Yan Y, Zhang X. EGF stimulates cyclooxygenase-2 expression through the STAT5 signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int J Oncol*. 2011; 39: 383–91
- [66] Yin ZJ, Jin FG, Liu TG, et al. Overexpression of STAT3 potentiates growth, survival, and radioresistance of non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. *J Surg Res*. 2011; 171: 675-83
- [67] Jiang B, Zhu ZZ, Liu F, et al. STAT3 gene polymorphisms and susceptibility to non small cell lung cancer. *Genet Mol Res*. 2011; 10:1856-65
- [68] Zhao X, Sun X, Li XL. Expression and clinical significance of STAT3, P-STAT3, and VEGF-C in small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(6):2873-7



Efekty mojej dotychczasowej pracy naukowej obejmują współautorstwo 36 publikacji oryginalnych, w tym 30 w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz 10 publikacji poglądowych, w tym 4 w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). **Sumaryczny IF według roku publikacji wynosi 70,547 (w tym 22,002 przypada na pierwszoautorские prace oryginalne). Indeks Hirscha wynosi 7 (WoS Core Collection, czerwiec 2017). Łącznie liczba cytowań prac wynosi 207 (WoS Core Collection, czerwiec 2017).**

Brałam udział w 21 projektach badawczych, w tym:

- 12 krajowych finansowanych ze środków zewnętrznych: Grant KBN (9), Grant MNiSW (1), Grant NCN (2)
- 9 finansowanych ze środków MNiSW na działalność statutową (tzw. prace własne UM oraz projekty naukowe dla młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich UM).

Za swoją działalność naukową zostałam kilkakrotnie nagrodzona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nagrodą dla Nauczycieli Akademickich (nagrody zespołowe I-go stopnia w latach: 2013, 2014, 2016).

Pełny wykaz opublikowanych prac naukowych oraz prac prezentowanych na konferencjach zagranicznych i krajowych, a także informacje dotyczące osiągnięć dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zostały zamieszczone w Załączniku 4.

*Dorota Pastuszak-Lewandoska*

*Łódź, 20.07.2017*