



Narodowy Instytut Onkologii

**im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach**

AUTOREFERAT

dr n. med. Agnieszka Mazurek

Agnieszka Mazurek
Agnieszka.Mazurek@io.gliwice.pl

Spis treści

Przedmowa.....	2
1. Imię i Nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
4.1. Cykl publikacji pod tytułem:	4
<i>Rola pozakomórkowego DNA w diagnostyce nowotworów regionu głowy i szyi</i>	4
Wprowadzenie i cel prowadzonych badań	5
Optymalizacja i dobór metody do pomiaru cfDNA i oznaczania cfHPV16	8
Pomiar cfDNA i detekcja biomarkerów we krwi chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz). ...	9
Znaczenie DNA HPV16 (cfHPV16) w diagnostyce chorych na raka gardła środkowego (RGŚ)	11
4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	15
Rola neuropiliny -1 oraz semaforyn klasy trzeciej w procesie migracji komórek	15
Badanie znaczenia białek rodziny szoku cieplnego w kancerogenezie.	16
Poszukiwanie nowych markerów nowotworowych o znaczeniu prognostycznym lub predykcyjnym	17
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną.....	18
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	19
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	20
Kierowanie projektami grantowymi.....	20
Nagrody i wyróżnienia.....	20
Literatura	21

Przedmowa

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji, które były realizowane w ramach moich dwóch projektów (NCN i NCBR) są moim samodzielnym i oryginalnym osiągnięciem poznawczym.

Po ukończeniu studiów w 1996 i rozpoczęciu pracy naukowo-badawczej w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddziale w Gliwicach nabyłam szerokie doświadczenie badawcze w Zakładzie Biologii Nowotworów oraz podczas stażu na Uniwersytecie Drexel, które wykorzystałam do samodzielnego planowania badań i prowadzenia eksperymentów uzyskując ostatecznie stopień doktora w 2007 roku. Prowadzone w tym czasie badania, wspierane doskonałą znajomością różnych technik molekularnych, ugruntowały moją umiejętność naukowo-badawczą w zakresie doboru metodologii i koncepcji badawczej. Zaś głównym atutem osobowości było wytrwałość w weryfikacji szczegółowych założeń badawczych.

Przedstawiona przeze mnie rozprawa habilitacyjna rozpoczyna się od weryfikacji oryginalnej koncepcji wykorzystania pozakomórkowego DNA (cfDNA) przedstawionej w projekcie grantowym w 2010 roku, poprzez wykazanie słuszności stawianej hipotezy, aż do uzyskania aplikacyjnego efektu realizowanego w ramach projektu TANGO2. Szczególnym etapem okresu po uzyskaniu stopnia doktora było samokształcenie w posługiwaniu się zaawansowanymi analizami statystycznymi, w szczególności modelami regresji umożliwiającymi wyjaśnienie skomplikowanych zależności parametrów klinicznych i molekularnych, a nabycie wiedzy o komercjalizacji wyników badań naukowych znacząco poszerzyło moje umiejętności inspirując mnie do dalszego rozwoju nauki. Najważniejszym moim sukcesem istotnym w rozwoju medycyny jest opracowanie badania DNA HPV16 (cfHPV16) we krwi i wykazanie jego przydatności diagnostycznej w praktyce klinicznej.

1. Imię i Nazwisko

Agnieszka Mazurek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

– z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

11.05.2016 uzyskanie tytułu specjalisty laboratoryjnej genetyki medycznej po złożeniu Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego Diagnostów Laboratoryjnych i zrealizowaniu programu specjalizacji w latach 2010-2015 pod kierunkiem dr hab. n. med. Ryszarda Ślęzaka. Miejszem specjalizacji była Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Marcinkowskiego 1, Wrocław.

31.01.2008 uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego uchwałą Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych z dnia 31 stycznia 2008.

02.10.2007 uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Rola neuropiliny-1 oraz semaforyn klasy trzeciej w procesie migracji komórek nowotworowych czerniaka B16”, promotor prof. Zdzisław Krawczyk

11.06.1996 uzyskanie dyplomu magistra biologii po odbyciu studiów na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w latach 1991-1996.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2010 – do nadal Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, adiunkt, obecnie Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach,

2008 – 2010 Zakład Radioterapii, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, adiunkt od 07.04.2010,

2000 – 2003 Department of Neurobiology and Anatomy, Drexel University, Philadelphia, USA, staż naukowy pod kierunkiem Prof. Douglasa Baird'a

1997 – 2008 Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, biolog w latach 1997-2003, a następnie asystent w latach 2003-2008.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Cykl publikacji pod tytułem:

Rola pozakomórkowego DNA w diagnostyce nowotworów regionu głowy i szyi

stanowiący podstawę habilitacji :

1. Mazurek AM*, Fiszer-Kierzkowska A, Rutkowski T, Składowski K, Pierzyna M, Scieglińska D, Woźniak G, Głowacki G, Kawczyński R, Małusecka E. Optimization of circulating cell-free DNA recovery for KRAS mutation and HPV detection in plasma. Cancer Biomark. 2013;13(5):385-94. doi: 10.3233/CBM-130371.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF = 1,186**

2: Mazurek AM*, Rutkowski T, Fiszer-Kierzkowska A, Małusecka E, Składowski K. Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients. Oral Oncol. 2016 Mar;54:36-41. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.12.002.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF = 4,794**

3: Mazurek AM*, Rutkowski T, Śnietura M, Piękowski W, Suwiński R, Składowski K. Detection of circulating HPV16 DNA as a biomarker in the blood of patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. Head Neck. 2019 Mar;41(3):632-641. doi: 10.1002/hed.25368.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF = 2,442**

4. Mazurek AM*, Wygoda A, Rutkowski T, Olbryt M, Pietrowska M, Celejewska A, Składowski K, Widłak P. Prognostic significance of Epstein-Barr virus viral load in patients with T1-T2 nasopharyngeal cancer. J Med Virol. 2020 Mar;92(3):348-355. doi: 10.1002/jmv.25606.

***Główny badacz i korespondencyjny autor; IF = 2,049**

5: Rutkowski TW, Mazurek AM*, Śnietura M, Hejduk B, Jędrzejewska M, Bobek-Billewicz B, d'Amico A, Piękowski W, Wygoda A, Składowski K, Kołosza Z, Widłak P. Circulating HPV16 DNA may complement imaging assessment of early treatment efficacy in patients with HPV-positive oropharyngeal cancer. J Transl Med. 2020 Apr 15;18(1):167. doi: 10.1186/s12967-020-02330-y.

***Jeden z dwóch głównych badaczy (Rutkowski TW i Mazurek AM w równym stopniu przyczynili się do tej pracy); IF = 4,098**

Łączny IF cyklu stanowiącego podstawę habilitacji wynosi 14,663 (MNIŚW = 325)

Załącznik 4 - Kopia cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących podstawę habilitacji.

Załącznik 5. - Oświadczenia habilitanta oraz współautorów wskazujące na merytoryczny wkład każdego z autorów w powstanie publikacji.

Wprowadzenie i cel prowadzonych badań

Pozakomórkowy krążący we krwi, DNA (kwas deoksyrybonukleinowy), w skrócie cfDNA (ang. circulating cell-free DNA), odnosi się do pofragmentowanego DNA wykrywanego we krwi (Mandel i Metais , 1948; Leon i wsp., 1977). Główna frakcja całkowitego cfDNA pochodzi z komórek prawidłowych i jest powszechnym zjawiskiem, a jedynie tylko jego część (od ok. 3% do 63%) pochodzi z komórek nowotworowych guza (Diehl i wsp., 2005; Jahr i wsp., 2001; Mouliere i wsp., 2013). Funkcjonujące w onkologii pojęcie ctDNA, odnosi się właśnie do tej frakcji nowotworowej (nowotworowy krążący DNA, ang. *circulating tumor DNA*). Zmiany genetyczne lub epigenetyczne w DNA z osocza bądź surowicy krwi są identyczne z tymi znajduwanymi w komórce nowotworowej guza. Stosunek zgodności wykrywanych zmian genetycznych w osoczu do ich identyfikacji w guzach jest różny i przykładowo wynosiła 70% dla mutacji EGFR u chorych na raka płuca (Kuang i wsp., 2009, Bai i wsp., 2009) lub 100% dla EBV u pacjentów chorych na raka nosogardła (Yu i wsp., 2004). Rozbieżności wynikają nie tylko z czułości zastosowanej techniki, ale również z heterogenności guza. Obserwowane jest bowiem zjawisko, gdzie wykrywane zaburzenia genetyczne w osoczu są różne od tych znalezionych w skrawkach, lub pojawiały się przypadki wykrywania mutacji tylko w osoczym DNA (Kuang i wsp., 2009, Bai i wsp., 2009).

Badanie krążących kwasów nukleinowych we krwi otworzyło perspektywę wielokrotnej analizy kwasów nukleinowych identycznych z nowotworowym DNA. Rutynowe ich oznaczanie, zwane płynną biopsją, zwiększało prawdopodobieństwo wykrywania nowotworu, zaletę stanowi łatwo dostępny materiał jakim jest krew oraz zastosowanie czułej metody ilościowego PCR (qPCR). Literatura światowa wskazuje na dwa kierunki badań naukowych, badanie całkowitej ilości cfDNA (stężenie cfDNA) oraz badanie specyficznych biomarkerów (zmian genetycznych lub epigenetycznych). Nadrzędnym celem obu kierunków jest standaryzacja oznaczenia i wprowadzenie do rutynowej procedury diagnostycznej. Badanie stężenia cfDNA oparto na amplifikacji różnej wielkości ampikonów różnych genów (np. TERT, ACTB, HBB) (Sozzi i wsp., 2003, Herrera i wsp., 2005, Silva i wsp. 2001) co znacznie utrudnia porównanie tych wyników, interpretację i uniwersalne zastosowanie wartości progowej. Na problem niskiej wartości diagnostycznej oznaczania całkowitej ilości cfDNA zwrócił uwagę Leon i wsp. pokazując, że pomimo utrzymującego się wysokiego (lub zwiększającego się) stężenia cfDNA we krwi sygnalizującego nawrót nowotworu, obserwowano stosunkowo wysoki odsetek pacjentów z rakiem mających prawidłowy poziom cfDNA (Leon i wsp., 1981). Inni badacze wykazali obecność cfDNA w stanach patologicznych takich jak zapalenie stawów (Dunaeva i wsp., 2015), urazy (Lo i wsp., 2000) czy wyczerpujący wysiłek (Atamaniuk i wsp., 2004). Drugim kierunkiem badania pozakomórkowego DNA we krwi jest oznaczanie biomarkerów specyficznych dla nowotworów, głównie mutacji lub DNA wirusowego. W tym aspekcie zaczęto powszechnie stosować nazwę *płynna biopsja*. Dobrym

przykładem klinicznego zastosowania płynnej biopsji są badania wirusa Epsteina-Barr (EBV) w osoczu chorych na raka nosogardła (NPC). Dobrze udokumentowano onkogenne działanie EBV w rozwoju raka nosogardła, wysoce rozpowszechnionego w populacjach południowych Chin, jak również wykazano diagnostyczne znaczenie EBV we krwi chorych z tym nowotworem. Metaanaliza badań Song i Yang wykazała, że badanie DNA EBV w osoczu do diagnozowania NPC przewyższała testy z wykorzystaniem przeciwciał VCA-IgA, wykazując lepszą czułość i swoistość (Song C. i Yang S., 2013). Badania Liu i wsp. wykazały, że wysoki poziom DNA EBV przed leczeniem może być użytecznym wskaźnikiem prognostycznym (Liu i wsp., 2017). Jednakże, stosunkowo niewiele jest prac dotyczących badań EBV w nieendemicznych regionach świata, w tym w Polsce.

Problematyka badawcza cfDNA oraz wykrywania w nim ctDNA była tematem mojego projektu grantowego z MNiSW/NCN pt. *„Ocena przydatności oznaczania krążącego DNA i poszukiwania w nim mutacji somatycznych genów EGFR i KRAS w rakach płuca oraz głowy i szyi”*, który realizowałam w latach 2010-13 i którego byłam kierownikiem. Następnie, na podstawie otrzymanych osiągnięć badawczych tego grantu, aplikowałam o projekt TANGO2 w ramach wspólnego przedsięwzięcia Narodowego Centrum Nauki oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Efektem było otrzymanie dofinansowania z NCBR na projekt (którego jestem kierownikiem) pt. *„Opracowanie strategii diagnostyczno-terapeutycznej HPV-zależnych nowotworów w oparciu o uwarunkowania genetyczne w celu optymalizacji leczenia”*. Poniżej przedstawiony jest zarys podjętej problematyki wykorzystania biomarkera HPV do wykrywania wznowy i choroby resztkowej podczas leczenia chorych na raka regionu głowy i szyi.

Głównym założeniem oznaczania HPV jako biomarkera nowotworu (czyli *de facto* ctDNA) jest fakt obecności genomu wirusa HPV w każdej komórce nowotworowej podczas proliferacji. Podczas onkogenezy raka zależnego od HPV dochodzi do takiej rearanżacji komórki, która umożliwia egzystowanie genomu wirusa w komórce gospodarza jako samodzielnej cząsteczki (tzw. episom) przekazywanej potomnym komórkom podczas mitozy (Juillard i wsp. 2016). Kolejnym etapem w progresji nowotworowej jest integracja jednej bądź wielu kopii genomu wirusa z genomem gospodarza i przekazywanie jej jako integralnej części chromosomu podczas podziałów mitotycznych (Groves i wsp., 2015).

Raki regionu głowy i szyi są heterogenną grupą obejmującą: raka krtani, gardła dolnego, nosogardła, jamy ustnej, zatok, ślinianek oraz gardła środkowego. Poza czynnikami onkogennymi jak picie alkoholu i palenie tytoniu, w obrębie tych nowotworów wyróżnia się grupą chorych na raka gardła środkowego (RGŚ) o etiologii HPV. Dominującym genotypem jest HPV16, wykrywany w 95% przypadków, a wszystkie pozostałe typy onkogenne tego wirusa nie przekraczają 5% przypadków

(Guily i wsp., 2012). Chorzy na RGŚ zależnego od HPV w większym odsetku dobrze odpowiadają na leczenie i żyją dłużej (Lassen i wsp., 2009; Fakhry i wsp., 2008; Syrjanen i wsp., 2008; Ragin i wsp., 2007). Jednakże, w ostatnim dwudziestoleciu zaobserwowano silną tendencję wzrostową odsetka chorych na RGŚ zależnego od HPV (z 40% do 72%) (Mehanna i wsp., 2012).

Celem leczenia chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz) niezależnie od etiologii jest wyleczenie z zachowaniem funkcji narządu. Dla większości chorych na RRGiSz radioterapia (RT) jest leczeniem, które daje podobne wyniki jak leczenie chirurgiczne oferując dodatkowo zachowanie narządu i jego funkcji. Dla chorych na zaawansowanego raka wykazano korzyść z dodania chemioterapii (CHT) (Pignon i wsp., 2009). Pomimo, że chorzy leczeni są tak silnymi lekami to część z nich nie będzie wyleczona, lub nie będzie miała wyleczonych węzłów chłonnych (Pignon i wsp., 2009, Ang i wsp., 2001). Dodatkowo, u przynajmniej 20% chorych, bezpośrednio po zakończeniu RT lub CHRT, pozostanie guz resztkowy w miejscu pierwotnego guza nowotworowego (lub w miejscu przerzutu do węzłów chłonnych).

Dostępność materiału tkankowego do analizy molekularnej w niektórych typach nowotworów jest niska, a monitorowanie powstawania przerzutów czy nawrotu choroby nowotworowej wręcz niemożliwe. Wczesne rozpoznanie przetrwałej (aktywnej) choroby nowotworowej umożliwia przeprowadzenie skutecznego ratującego leczenia chirurgicznego. Opóźnienie takiej diagnozy, a tym samym opóźnienie przeprowadzenia leczenia ratującego, znamienne obniża jego skuteczność. Odsetek chorych z 5-letnim przeżyciem, którzy przeszli ratującą operację wynosi 55,8% w porównaniu do 17,4% chorych bez takiej operacji (Jin i wsp. 2013). W przypadku pojawienia się wznowy miejscowej lub węzłowej, operacyjne leczenie ratujące jest postępowaniem z wyboru u chorych z rozpoznaną wznową nowotworu. Guo i wsp. stwierdzili znamienne wyższy odsetek chorych po chirurgicznym leczeniu ratującym w porównaniu do chorych leczonych nieoperacyjnie niezależnie od etiologii wirusowej nowotworu (Guo i wsp., 2015). Na etapie podejmowania decyzji o operacji ratującej pojawia się problem diagnostyki radiologicznej, bowiem w większości przypadków aktywny proces nowotworowy jest trudny do rozróżnienia od zmiany po przebytym leczeniu (Bree i wsp., 2009). Wydaje się, że najbardziej wiarygodną oceną odpowiedzi na leczenie może być obrazowanie przy zastosowaniu FDG-PET/CT (obrazowanie z zastosowaniem ¹⁸F-Fludeoksyglukozy), chociaż i tu należy brać pod uwagę ograniczenia metody w postaci niespecyficzności w wychwycie radioznacznika i słabej rozdzielczości między tkanką nowotworową i procesem zapalnym. Podobnie, fałszywie pozytywny obraz może dotyczyć obszarów węzłowych (Imaizumi i wsp., 2012).

Interpretacja wyniku PET jest tym bardziej niejednoznaczna im krótszy czas upłynął od zakończenia leczenia (McCollum i wsp., 11). Biopsja obszarów podejrzanych o niewyleczenie może dać wynik fałszywie ujemny lub fałszywie dodatni, w związku z czym zaleca się przeprowadzenie PET nie

wcześniej niż 8 tygodni od zakończenia leczenia (Tantiwongkosi i wsp., 2014; Andrade i wsp., 2006). Płynna biopsja stwarza zatem szanse wykrywania aktywnej choroby poprzez wielokrotną analizę próbek krwi pod kątem obecności DNA pochodzącego z nowotworu (Crowley E. i wsp., 2013).

Cel naukowy przedstawionego poniżej cyklu badań obejmuje: poszerzenie wiedzy dotyczącej znaczenia stężenia całkowitego cfDNA we krwi, korelacji cfDNA z danymi klinicznymi, oszacowanie liczności wykrywanych zmian genetycznych bądź epigenetycznych u chorych na raka regionu głowy i szyi. Nadrzędnym celem było postawienie i testowanie hipotezy zakładającej, że DNA HPV16 we krwi (cfHPV16) jest fragmentem DNA pochodzącym z nowotworu, którego wykrywanie we krwi świadczy o obecności aktywnej choroby nowotworowej.

Optymalizacja i dobór metody do pomiaru cfDNA i oznaczania cfHPV16

Badania rozpoczęłam od optymalizacji izolacji DNA z osocza i wybrania najlepszej metodologii wykrywania zmian genetycznych. Porównałam dwie metody qPCR (tzw. PCR w czasie rzeczywistym lub ilościowy PCR), a mianowicie metodę HRM (ang. High Resolution Melting) opierającą się na pomiarze zmiany temperatury topnienia oraz metodę TaqMan opierającą się na specyficznych sondach. Z danych literaturowych wynikało, że metody są najczulszymi metodami do wykrywania zmian genetycznych (mutacji) lub epigenetycznych (wirusy). Metoda HRM została wcześniej przeze mnie dopracowana i zastosowana do badania mutacji w genomowym DNA oraz wykrywania dziedzicznych mutacji w kierunku Zespołu Lyncha. Jednak badanie skrawków guzów lub osocza wykazało, że metoda HRM jest mało specyficzną metodą do analizy DNA izolowanego. Każda próbka dodatnia wymagała potwierdzenia za pomocą sekwencjonowania co komplikowało i podrażało metodologię. Z moich obserwacji wynikało, że czystość DNA, ma kluczowe znaczenie w zastosowaniu metody HRM. Biorąc pod uwagę wyniki tych badań, zarówno pomiar stężenia cfDNA, jak również detekcję zmian genetycznych oparłam na technologii qPCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan (Mazurek i wsp., 2013, załącznik 7, p. I.1). Wykonałam badanie porównawcze wydajności izolacji 4 różnych zestawów (QIAamp DNA Blood Mini, QIAamp Circulating Nucleic Acid, Sherlock AX i Mini AX Body Fluids). Do badań wykorzystałam pulowane osocze od chorego na raka jelita grubego z wykrytą mutacją w genie KRAS w osoczu, której obecność potwierdzono w badaniu na skrawku z guza. Najmniejszą wydajność wykazywał zestaw QIAamp DNA Blood Mini, a ilość kopii zmutowanego genu KRAS w uzyskiwanym cfDNA była na tyle mała, że nie wykrywaliśmy mutacji. Dodatkowe badania pozostałych zestawów pokazały, że najwięcej cfDNA (największe stężenie) uzyskiwaliśmy stosując QIAamp Circulating Nucleic Acid oraz Mini AX Body Fluids. Zaletą Genomic Mini AX Body Fluids była możliwość zawieszenia DNA w małej ilości buforu, co umożliwiało uzyskiwanie wysokiego stężenia i zwiększało czułość, poza tym koszt jednej izolacji był niższy około 5-krotnie w porównaniu do zestawu QIAamp Circulating Nucleic Acid. Ostatnim elementem w przedstawionej pracy było wykazanie, że

zwiększenie ilości osocza do izolacji wraz z zagęszczeniem eluatu zwiększało prawdopodobieństwo wykrycia HPV16. Zwiększenie wyjściowej ilości badanego osocza wraz z zagęszczeniem eluatu umożliwiło uzyskiwanie wyższych stężeń cfDNA i zwiększyło prawdopodobieństwo wykrycia HPV16 w osoczu (Mazurek i wsp., 2013 załącznik 7, p. I.1).

Pomiar cfDNA i detekcja biomarkerów we krwi chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz).

Badania stężenia cfDNA wykazały, że chorzy na RRGiSz wykazują węższy zakres całkowitego cfDNA w porównaniu do chorych na raka płuca, stanowiąc tym samym bardziej jednorodną grupę. W odniesieniu do klasyfikacji T, stężenie cfDNA nieznacznie wzrastało począwszy od T1 aż do T4. Pacjenci z zajęтыми węzłami chłonnymi N2-N3 mieli znacznie podwyższony poziom cfDNA w porównaniu do chorych z N0-N1 ($p = 0,015$). Ponieważ klasyfikacja N i klasyfikacja T wpływają na stadium zaawansowania, to oczywistym było wykazanie znacznie wyższego stężenia cfDNA u chorych z najwyższym, IV stopniem zaawansowania (wg klasyfikacji AJCC) w porównaniu do pozostałych chorych (I-III, $p=0,011$). Spośród wszystkich RRGiSz najwyższe wartości całkowitego cfDNA obserwowaliśmy u chorych na raka gardła środkowego (RGŚ) w porównaniu z innymi rakami regionu głowy i szyi (krtani, nosogardła, gardła dolnego i jamy ustnej, $p = 0,011$). Chorzy powyżej 63 r.ż. mieli wyższe stężenie cfDNA w porównaniu z chorymi młodszymi ($p=0,001$). Analiza w kilku punktach podczas leczenia i po zakończonym leczeniu wykazała znaczny wzrost poziomu cfDNA podczas leczenia, szczególnie po drugim cyklu chemioterapii obserwowano wyraźny „skok” stężenia cfDNA ($p=0,02$). Natomiast w końcowej fazie leczenia i po zakończonym leczeniu następował wyraźny spadek stężenia cfDNA, aż do poziomu charakterystycznego dla zdrowych w około rok po zakończonym leczeniu. Opisaną powyżej charakterystykę kliniczną pod kątem badania całkowitej ilości cfDNA u chorych na RRGiSz przedstawiłam w publikacji Mazurek i wsp. 2016 (załącznik 7, p. I.1). Jednak badania całkowitej ilości cfDNA wskazały na niską wartość diagnostyczną oznaczania stężenia cfDNA ze względu na wysokie wartości odchylenia standardowego, duże współczynniki zmienności oraz brak możliwości wyznaczenia punktów odcięcia.

Badania detekcji najczęstszych mutacji w genie KRAS oraz EGFR w cfDNA nie wykazały ich obecności w grupie chorych na RRGiSz, natomiast badanie HPV16 i HPV18 w osoczu wykazało, że 14% pacjentów było pozytywnych, z których większość (96,4%) miała genotyp HPV16. Ilość całkowitego cfDNA była na porównywalnym poziomie u chorych z wynikiem pozytywnym w porównaniu z chorymi z wynikiem negatywnym co sugerowało, że prawdopodobieństwo znalezienia DNA wirusa HPV16 u chorego z małą ilością cfDNA jest takie samo jak u chorego z wysokim poziomem cfDNA (Mazurek o wsp., 2016, załącznik 7, p. I.1). Zgodnie z danymi literaturowymi badań wykonanych na skrawkach, pozytywny wynik cfHPV16 w osoczu korelował ($p=0,001$) z lokalizacją guza w gardle środkowym, wobec czego w kolejnych badaniach skupiliśmy się na tej grupie chorych.

Podczas realizacji grantu w latach 2010-2013, powstała koncepcja przeprowadzenia badania DNA EBV we krwi chorych na raka części nosowej gardła. Chorych na raka nosogardła jest bardzo mało w polskiej populacji, dane epidemiologiczne podają 162 zachorowania w Polsce w 2016 roku. Dlatego do zebranej przeze mnie grupy dołączyłam próbki zarchiwizowane przez innych badaczy w naszej jednostce. Obecność DNA EBV w osoczu wykazaliśmy w połowie polskich pacjentów z rakiem części nosowej gardła. Jest to mała częstotliwość, zważając, że w krajach azjatyckich wynosi ona ok. 90%. W grupie ujemnej pod względem EBV dominowali chorzy z N0/N1 (67%), podczas gdy w grupie dodatniej pod względem EBV dominowali chorzy z N2/N3 (63%) i charakteryzowali się wysoką wiremią w porównaniu do N0/N1 (Mazurek i wsp., 2020 załącznik 7, p. I.1).

Wspomagając się modelem proporcjonalnego hazardu Coxa wykazałam, że guzy T3-T4 były niezależnym czynnikiem prognostycznym wznowy lokoregionalnej i u tych chorych EBV nie odgrywał istotnego znaczenia w prognozie wyleczenia. Natomiast, w podgrupie pacjentów z guzami T1-T2 wykazaliśmy, że pacjenci ze statusem ujemnym pod względem EBV i zajętymi węzłami chłonnymi (N1-N3) mieli lepszą wyleczalność w porównaniu z pacjentami ze statusem dodatnim pod względem EBV i N0 ($p = 0,028$). Badania nasze wskazały, że oznaczenie DNA EBV może odgrywać ważną rolę w diagnostyce pacjentów chorych na raka nosogardła z guzami T1-T2. Poziom EBV przed leczeniem należałoby wziąć pod uwagę w pierwotnej stratyfikacji ryzyka jak zaproponował Zhang i wsp. (Zhang i wsp., 2015). Oznaczenia DNA EBV oparte na osoczu powinny być dopracowane w celu opracowania systematycznego modelu stratyfikacji ryzyka, monitorowania choroby i odpowiedzi na leczenie. Walidacja testów na EBV u chorych na raka nosogardła dotyczy unifikacji techniki badania wiremii i ustalenia punktu odcięcia, który w obszarze nieendemicznym może nieco różnić się w porównaniu do wartości podawanych w krajach endemicznych (Mazurek i wsp., 2020 załącznik 7, p. I.1).

Podsumowując pierwszą część mojego autoreferatu związanego z badaniami cfDNA u chorych na raka regionu głowy i szyi uzyskałam następujące wnioski:

- i. oznaczanie całkowitej ilości cfDNA w celach diagnostycznych (wyrażany za pomocą całkowitego stężenia cfDNA w ng/ml) jest problematyczne z powodu zbyt dużego odchylenia standardowego utrudniającego ustalenie progu czułości i specyficzności,
- ii. jednakże pomiar całkowitej ilości cfDNA pozwolił na przeprowadzenie badania porównawczego wydajności izolacji oraz wykazania zależności ilości cfDNA od parametrów klinicznych, ze szczególnie ciekawą obserwacją tendencji „wyrzutu” cfDNA do krwi podczas leczenia,
- iii. badanie DNA EBV we krwi może odgrywać ważną rolę w diagnostyce pacjentów chorych na raka nosogardła z guzami T1-T2, ale wymagają unifikacji metody oznaczania,

- iv. badanie HPV16 i HPV18 w osoczu wykazało, że 14% pacjentów było pozytywnych, z których większość (96,4%) miała HPV16 we krwi.
- v. poszukiwanie nowych markerów wskazało na DNA HPV16 jako biomarkera rokującego na szybkie i nieinwazyjne badanie diagnostyczne chorych na raka gardła środkowego,

Otrzymane rezultaty, wnioski oraz nabyte doświadczenie zaowocowały otrzymaniem dofinansowania z NCBR na badanie aplikacyjne walidacji HPV w osoczu jako markera wznowy (projekt TANGO2, którego jestem kierownikiem) oraz pracami badawczymi opisanymi poniżej.

Znaczenie DNA HPV16 (cfHPV16) w diagnostyce chorych na raka gardła środkowego (RGŚ)

W dalszych badaniach zidentyfikowaliśmy parametry kliniczne wpływające na detekcję DNA HPV16 we krwi chorych na RGŚ. Mając do dyspozycji DNA ze skrawków guzów mogłam przeprowadzić badanie wykrywania HPV16 w guzie i osoczu (Mazurek i wsp., 2019, załącznik 7, p. I.1). Analizy jednoczynnikowe wskazały na kilka czynników istotnie wpływających na detekcję, a mianowicie cfHPV16 był częściej wykrywany u chorych z zajętymi węzłami chłonnymi ($p = 0,011$), u osób niepalących ($p = 0,001$) i nie pijących alkoholu ($p = 0,020$). Badając związek między wszystkimi parametrami (analiza wieloraka T, N, płeć, wiek, palenie, alkohol) a detekcją cfHPV16 wykazałam, że najsilniejszymi parametrami wpływającymi na obecność cfHPV16 we krwi jest zaawansowanie węzłowe wraz z niepaleniem papierosów. Niepalenie papierosów istotnie korelowało z wyższymi wartościami wiremii w guzie, przy czym najwyższe wartości wiremii obserwowano w guzach kobiet niepalących. Analiza chorych z dodatnim wynikiem w guzie wykazała czułość testu cfHPV16 w osoczu na poziomie 72% (u 28% nie wykrywaliśmy cfHPV16 we krwi), a specyficzność oszacowaliśmy na 100% (wszyscy chorzy na RGŚ z wynikiem ujemnym na obecność HPV w guzie mieli również ujemny wynik we krwi). Wiremia HPV16 w guzie silnie korelowała z wiremią w osoczu. Obserwowałam około siedmiokrotnie wyższą wiremię w guzach pacjentów z pozytywnym wynikiem we krwi w porównaniu z guzami chorych z negatywnym wynikiem we krwi ($p = 0,011$). U kobiet, na wykrywanie cfHPV16 we krwi istotnie wpływała wysoka wiremia i zaawansowanie T3/T4. Natomiast u mężczyzn, na wykrywalność wpływała wysoka wiremia (choć była niższa w porównaniu do kobiet) i zaawansowanie węzłowe (Mazurek i wsp., 2019, załącznik 7, p. I.1). Obserwacja specyficznym wysokiej wiremii w guzach kobiet niepalących sugeruje na istnienie dodatkowego, żeńskiego czynnika wpływającego na proces replikacji. Faktem jest również, że chorzy na raka odbytu i wykrywanym cfHPV16 w osoczu to prawie wyłącznie kobiety (92%, badania własne). Można zatem przypuszczać istnienie czynników specyficznych dla płci żeńskiej, najprawdopodobniej hormonów, wpływających na osiąganie wysokiej liczby kopii w komórkach, co przekłada się na powstawanie guzów bardziej zaawansowanych.

Ostatnim badaniem przedstawionego cyklu była weryfikacja postawionej przeze mnie głównej hipotezy, czyli zastosowania cfHPV16 we krwi jako płynnej biopsji w diagnostyce efektów leczenia chorych na RGŚ (Rutkowski i wsp., 2020, załącznik 7, p. I.1). W przypadku przetrwałego po leczeniu guza często trudno jest rozróżnić zmienione na skutek leczenia nienowotworowe tkanki (powodujące efekt masy) od przetrwałego guza nowotworowego, szczególnie w krótkim okresie po zakończonym leczeniu. Jest to spowodowane powstałym po RT włóknieniem, obrzękiem, martwicą tkanek miękkich lub chrząstki, asymetrią, retrakcją tkanek miękkich, niespecyficznym wzmocnieniem kontrastowym. Stosowane rutynowo, w celu oceny efektu leczenia, badania tomografii komputerowej (TK) lub rezonansu magnetycznego (MR) w kontrolach po RT lub CHRT nie umożliwiają w większości przypadków rozróżnienia opisanych wcześniej zmian po leczeniu od aktywnego procesu nowotworowego. Celem naszego badania było sprawdzenie czy cfHPV16 będzie pomocny do oceny efektów leczenia w 12 tygodniu po zakończonym leczeniu. Odpowiedź radiologiczna była porównywana z odpowiedzią molekularną, gdzie całkowitą odpowiedź radiologiczną zdefiniowano jako zanik wszystkich oznak raka w obrazowaniu w odpowiedzi na leczenie, a niepełną odpowiedź radiologiczną zdefiniowano jako obecność resztkowych objawów raka w obrazowaniu. Całkowitą remisję molekularną zdefiniowano jako zanik cfHPV16 we krwi w wyniku leczenia (w skrócie cfHPV16rem). W 12 tygodniu po RT/CHRT 65% chorych osiągnęło całkowitą odpowiedź radiologiczną, a 35% miało niepełną odpowiedź radiologiczną. Natomiast molekularną remisję cfHPV16 osiągnęło 91%, a w 9% cfHPV16 był nadal obecny we krwi. Zestawienie oceny radiologicznej i molekularnej wykazało zgodność w 72%, w tym 64% stanowiło zgodność całkowitej odpowiedzi radiologicznej z remisją cfHPV16, a 8% dotyczyło zgodności niepełnej odpowiedzi radiologicznej z obecnością cfHPV16 we krwi. Natomiast w 28% nie było zgodności pomiędzy oceną radiologiczną a molekularną, przy czym aż w 27% niezgodność ta dotyczyła niepełnej odpowiedzi radiologicznej i remisji cfHPV16. W celu wyjaśnienia co jest przyczyną tej 27%-ej niezgodności, wykonaliśmy biopsję z regionów z radiologicznym podejrzeniem raka (lub jeśli nie otrzymaliśmy zgody pacjenta, prowadziliśmy tylko obserwacje i badanie cfHPV16). We wszystkich pobranych biopsjach tej grupy nie było utkania nowotworowego i nie było HPV16 w skrawkach, co świadczyło że cfHPV16 był prawdziwie negatywnym wynikiem i świadczył o wyleczonym stanie pacjenta. W pozostałych przypadkach, w których nie pobraliśmy biopsji (brak zgody pacjenta) - w kolejnych ocenach radiologicznych nie było oznak raka (czyli również cfHPV16 był prawdziwie negatywnym wynikiem). Oceniając znaczenie diagnostyczne badania molekularnego cfHPV16 w celu przewidzenia niepowodzenia leczenia w 12 tygodniu po zakończonym leczeniu oszacowaliśmy czułość cfHPV16 na 100% i swoistość na 98%, wartość predykcyjną dodatnią (PPV) cfHPV16 wynosiła 83%, a wartość predykcyjną ujemną 100% (Rutkowski i wsp. 2020, załącznik 7, p. I.1.).

Obserwowaliśmy również przypadek obecności cfHPV16 we krwi chorego bez stwierdzenia wznowy w radiologicznym obrazowaniu. W tej sytuacji, na podstawie obecności cfHPV16, zostało wykonane badanie PET, które umożliwiło wykrycie przerzutów odległych. DNA wirusa staje się zatem wykrywalne również przed klinicznymi objawami rozsiewu odległego. U innego chorego z niepełną odpowiedzią radiologiczną i wykrytym cfHPV16 we krwi podjęto decyzję przeprowadzenia operacji ratującej i usunięto podejrzanę radiologicznie węzły chłonne. Podczas podejmowania decyzji o operacji ratującej sugerowano się pozytywnym wynikiem cfHPV16 we krwi potwierdzającym wznowę. W kolejnych badaniach kontrolnych tego chorego nie wykrywano zarówno cfHPV16 we krwi jak i choroby nowotworowej. Pacjent jest obecnie zdrowy (Rutkowski i wsp. 2020, załącznik 7, p. I.1).

Podsumowując drugą część cyklu autoreferatu związanego z badaniami cfDNA u chorych na raka regionu głowy i szyi uzyskałam następujące wnioski:

- i. czułość testu cfHPV16 w osoczu oszacowano na poziomie 72% , a specyficzność na 100%,
- ii. najsilniejszymi parametrami wpływającymi na obecność cfHPV16 we krwi jest zaawansowanie węzłowe wraz z niepaleniem papierosów,
- iii. wysoka wiremia w guzach istotnie wpływa na wykrywalność DNA wirusa we krwi,
- iv. wysokie współczynniki czułości, specyficzności oraz wartość predykcyjnej ujemnej i dodatniej świadczą o wysokiej wiarygodności diagnostycznej testu cfHPV16 w celu przewidzenia niepowodzenia leczenia w 12 tygodniu od zakończenia leczenia,
- v. stosowanie badania cfHPV16 we krwi ułatwiło podjęcie decyzji o wcześniejszym zastosowaniu leczenia ratującego.

Możemy zatem uznać, że cfHPV16 we krwi świadczy o obecności aktywnej choroby nowotworowej. Obecność DNA cfHPV16 we krwi chorego bez cech wznowy lub rozsiewu jest sygnałem do wykonania dodatkowej, bardziej szczegółowej diagnostyki obrazowej (PET, scyntygrafia kości, endoskopia połączona z biopsją błony śluzowej gardła) w celu wykrycia ognisk aktywnej choroby nowotworowej.

Podsumowanie znaczenia badań przedstawionego cyklu autoreferatu w dziedzinie onkologii

Reasumując moje badania w kontekście hipotezy wykorzystania zmian genetycznych w pozakomórkowym cfDNA we krwi, mogę zaprezentować cfHPV16 jako przykład ctDNA (*circulating tumor DNA, ctDNA*) i jego skuteczność w zastosowaniu w płynnej biopsji. Badania naukowe jakie prowadziłam w ostatnim dziesięcioleciu udowadniają zasadność zastosowania klinicznego płynnej biopsji i detekcji cfHPV16 w diagnostyce raka gardła środkowego. Efekt wyników badań cfHPV16 we krwi chorych na raka gardła środkowego jest wielowymiarowy, począwszy od wykorzystania opracowanego przeze mnie badania cfHPV16 jako standardu do wykrywania HPV zależnego RGŚ w kilku projektach Narodowego Centrum Onkologii, oddziału w Gliwicach aż po zastosowanie do

rutynowej diagnostyki (w końcowej fazie pełna walidacja). Obecnie, badania nowotworowego DNA HPV i EBV we krwi są wykorzystywane do realizacji dwóch zadań statutowych Narodowego Instytutu Onkologii, oddziału w Gliwicach (załącznik 7, p. II.7.A.2 i 4), podkreślając tym samym przełomowość moich badań naukowych.

Poza prezentowanym cyklem artykułów naukowych (łączny IF wynoszący 14,663, MNiSW = 325), badania pozakomórkowego DNA w nowotworach regionu głowy i szyi prezentowano na ponad 40 (załącznik 7, p. II.2.) wystąpieniach naukowych, krajowych i międzynarodowych konferencjach, z których część została opublikowana w formie streszczeń w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (załącznik 7, p. II.2.1.A. 2,3,4,5,6,7,10).

4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Rola neuropiliny -1 oraz semaforyn klasy trzeciej w procesie migracji komórek

Jednym z najciekawszych nurtów moich zagadnień naukowych było badanie semaforyn i neuropilin w migracji aksonów oraz komórek. Semaforyny stanowią ligandy dla różnych rodzin receptorów i uczestniczą w modulowaniu ścieżki sygnałowej, nakierowując aksony do właściwych miejsc. Neuropiliny (NRP1 i NRP2) są podstawowymi receptorami semaforyn klasy trzeciej pełniących rolę nawigatorów dla migrujących aksonów oraz komórek nerwowych podczas rozwoju układu nerwowego w fazie embrionalnej i postembrionalnej. Z problematyką tych białek spotkałam się będąc na stażu naukowym na Uniwersytecie Drexel. Celem badań było wyjaśnienie znaczenia semaforyn, neuropilin oraz kinezyn w migracji aksonów do właściwych miejsc podczas rozwoju mózgu. Przeprowadziłam szereg badań hybrydyzacji *in situ* ekspresji semaforyny 3A (Sema3A) i jej receptora neuropiliny-1 (Nrp1) w mózdzku myszy w celu pokazania rozkładu aksonów względem semaforyny 3A. W badaniach *in vitro* pokazaliśmy, że oddziaływanie semaforyn klasy 3 z neuropilinami skutkuje odepchnięciem lub zatrzymaniem wzrostu aksonu (tzw. załamaniem stożka wzrostu), co przyczynia się do kierowania aksonów do ich docelowych obszarów w mózdzku (Sołowska i wsp. 2002). Ścieżka sygnałowa indukowana przez semaforyny prowadzi do przebudowy cytoszkieletu aktynowego. W naszych kolejnych badaniach wykazaliśmy, że Kif15 jest białkiem motorycznym z rodziny kinaz, które ulega ekspresji we wszystkich komórkach podczas mitozy i w neuronach postmitotycznych podczas wzrostu aksonu. W kluczowych obszarach rozwijających się neuronów obserwowaliśmy wyraźnie silną ekspresję Kif15 w neuronach migrujących. Badania wskazały na uczestniczenie Kif15 w sieciowaniu i unieruchomieniu mikrotubul wrzeczona poprzez przeciwstawianie się zdolnościom innych białek motorycznych do generowania niezależnych ruchów mikrotubul (Buster i wsp., 2003).

Tematykę semaforyn i neuropilin kontynuowałam w dziedzinie onkologicznej. Podjęłam się zbadania roli neuropiliny-1 oraz semaforyn klasy trzeciej w procesie migracji komórek nowotworowych, realizując badania w obrębie grantu promotorskiego pod kierunkiem prof. Zdzisława Krawczyka. Celem projektu było zbadanie wpływu wyciszenia neuropiliny-1 na migrację komórek nowotworowych. Badania rozpoczęłam od sprawdzenia linii komórkowych. Silną ekspresję receptora neuropiliny-1 wykryłam w komórkach różnych typów nowotworów m.in. w komórkach raka prostaty PC3 i komórkach czerniaka B16. W pierwszym etapie moich badań opracowałam model (i cząsteczkę siRNA) wyciszenia ekspresji NRP1 za pomocą techniki RNAi. W wyniku wyciszenia ekspresji genu NRP1 zaobserwowałam około trzykrotne zwiększenie liczby migrujących komórek raka prostaty PC3 oraz komórek czerniaka B16(F10) w stosunku do komórek kontrolnych. Dodatkowym

obserwowanym zjawiskiem podczas wyciszania neuropiliny-1 były zmiany morfologiczne i adhezyjne. Komórki raka prostaty PC3 pod wpływem obniżonego poziomu białka przyjmowały kształt bardziej podłużny i dwubiegunowy. W wyniku wytłumienia ekspresji neuropiliny-1 w komórkach czerniaka B16(F10) dochodziło do redukcji wypustek cytoplazmatycznych, a podczas wzrostu komórki te nie wykazywały tendencji do narastania na siebie tylko zwiększały powierzchnię przylegania do podłoża. Wyciszenie ekspresji neuropiliny-1 silnie obniżyło wiązanie do ich powierzchni semaforyny 3A, podczas gdy semaforyna 3C nie wykazywała zdolności wiązania. Można zatem przypuszczać, że neuropilina-1 moduluje zdolności migracyjne oraz właściwości adhezyjne komórek nowotworowych w procesie progresji nowotworowej. Wyniki badań przedstawiłam w pracy doktorskiej oraz w publikacji Mazurek i wsp. (2012).

Badanie znaczenia białek rodziny szoku cieplnego w kancerogenezie.

Kolejna tematyka badawcza dotyczyła białek szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, Hsp). Jest to rodzina wysoce homologicznych białek opiekuńczych, indukowanych w odpowiedzi na stres środowiskowy, fizyczny lub chemiczny, które ograniczają konsekwencje uszkodzenia i ułatwiają regenerację komórek. W ramach współpracy z grupą zajmującą się zagadnieniem tych białek badałam rolę HSP70 w ochronie wrzeciona kariokinetycznego. Przygotowałam konstrukt plazmidowy zawierający gen HSP70 pod kontrolą promotora CMV. Wyprowadziłam linię komórkową V79 stabilnie transfekowaną tym wektorem i następnie traktowałam komórki ekstraktami zanieczyszczeń z powietrza. Badania pokazały, że komórki z nadekspresją HSP70 wykazywały wyższe wskaźniki przeżycia po wystawieniu na szok termiczny, co sugerowało, że białko HSP70 ułatwia przeżycie komórek z uszkodzonymi wrzecionami mitotycznymi i nieprawidłowo posegregowanymi chromosomami (Głowała i wsp. 2002). W kolejnych badaniach uczestniczyłam w badaniu funkcji ludzkiego HSPA2. Wykorzystując różne linie komórkowe ze sprawdzoną ekspresją na poziomie RNA wykazałam specyficzność przeciwciała anti-HSPA2 uzyskanego w wyniku immunizacji myszy. Celem mojej pracy było zidentyfikowanie tej frakcji surowicy (próbki pobrano w różnych momentach czasowych), w której przeciwciało jest najbardziej specyficzne. Specyficzność potwierdziłam poprzez blokowanie antygenem (peptydem wykorzystanym do immunizacji myszy) w badaniach immunohistochemicznych. Dzięki tym badaniom wykazaliśmy frakcje zawierające wysoce specyficzne poliklonalne przeciwciała anti-HspA2. W badaniach immunohistochemicznych pokazaliśmy silną ekspresję HSPA2 w guzach niedrobnokomórkowego raka płuca. W komórkach poddanych szokowi termicznemu białko HSPA2 gromadziło się w centrosomach, sugerując zaangażowanie w ochronę integralności jąder i centrosomów w komórkach rakowych poddanych szokowi termicznemu (Ściegłińska i wsp. 2008). W innej pracy wykazaliśmy silną ekspresję białka HSPA2 w warstwie

podstawnej nabłonka wyściełającego drogi oddechowe, w komórkach kubkowych nabłonka oskrzeli, jelita cienkiego i grubego oraz w komórkach zona reticularis kory nadnerczy (Ścieglikowska i wsp. 2011). Natomiast, w pracy Vydra i wsp. pokazaliśmy silną ekspresję tego białka w wyściółce oskrzeli i jajowodu, nabłonku kolumnowym endometrium, komórkach nabłonkowych siatkówki grasicy, nabłonku przejściowym pęcherza moczowego i komórkach wyściółki pokrywających ściany komór mózgu (Vydra i wsp., 2009).

Poszukiwanie nowych markerów nowotworowych o znaczeniu prognostycznym lub predykcyjnym

Kolejne wyzwania badawcze dotyczą poszukiwania nowych biomarkerów oraz weryfikacja zastosowania ich w klinice. Sprawdzaliśmy możliwości oznaczania pomiaru stężenia cfDNA w diagnostyce raka płuca. W pracy Mazurek i wsp. (2015) pokazaliśmy, że poszczególne typy raka płuca znacząco różnią się poziomem całkowitej ilości cfDNA. Trzykrotnie wyższe stężenie cfDNA było u chorych na raka płuca drobnokomórkowego w porównaniu z chorymi na raka niedrobnokomórkowego. Analiza podgrupy chorych na raka niedrobnokomórkowego wykazała wyraźnie wyższy poziom cfDNA chorych na płaskonabłonkowego raka w porównaniu z pozostałymi przypadkami. Stężenie cfDNA było porównywalne u chorych z T1, T2 i T3, a jedynie u chorych z guzami T4 poziom cfDNA był wyraźnie wyższy. Biorąc pod uwagę zaawansowanie węzłowe (N), nieco wyższy poziom całkowitego cfDNA był u chorych z zajęтыми węzłami chłonnymi niż u chorych z niezajętymi węzłami. Znacząco wyższy poziom cfDNA wykazywali chorzy z odległymi przerzutami w porównaniu z chorymi bez przerzutów. Przeprowadzona przeze mnie analiza porównawcza metody TaqMan/PCR oraz sekwencjonowania próbek cfDNA z krwi od chorych na raka płuca ujawniła obecność mutacji w genie EGFR, w dwóch przypadkach była to delecja, trzeci przypadek to mutacja punktowa (Mazurek i wsp. 2015). Fakt możliwości wykrywania mutacji we krwi potwierdził użyteczność cfDNA jako alternatywnego źródła nowotworowego DNA (ctDNA) do wykrywania mutacji istotnych w leczeniu celowanym inhibitorami kinaz tyrozynowych, ale zastosowanie technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS), w mojej opinii, stwarza możliwości uzyskania więcej informacji, wydaje się być adekwatniejszą metodą i z pewnością w przyszłości uprości oraz rozszerzy zakres wykrywalności mutacji.

Kolejna praca badawcza dotyczyła nielicznej grupy chorych na raka odbytu, w której prawie wyłącznie patogenезę przypisuje się onkogennym typom wirusa brodawczaka (HPV). Po weryfikacji rozpoznania histopatologicznego badaniami objęliśmy płaskonabłonkowego raka odbytu (z wykluczeniem raka odbytnicy). HPV wysokiego ryzyka wykryliśmy w 87% przypadków, spośród których HPV16 był dominującym genotypem (73%), a większość skrawków guzów wykazywała ekspresję białka p16. Wskaźnik pozytywności HPV był wyższy wśród kobiet i niepalących. Zakres wirerii HPV16 (mediana

wynosiła 134 kopii/genom) w raku odbytu był porównywalny do wiremii raka gardła środkowego (mediana 190 kopii/genom) (Małusecka i wsp. 2020). Od roku 2017 prowadzimy również badania wykrywania HPV16 w osoczu chorych na raka odbytu. Najciekawszą obserwacją jest fakt, że 92% wykrytych pozytywnych przypadków w osoczu to kobiety. Najwyraźniej obserwowana przez nas wysoka wiremia w guzach raka gardła środkowego oraz w guzach raka odbytu u kobiet przedkłada się nie tylko na wykrywalność w osoczu, ale świadczy również o istnieniu zależności pomiędzy płcią a wiremią w guzie.

Reasumując moje osiągnięcia naukowo-badawcze, jestem współautorem badań przedstawionych na 80 wystąpieniach, w tym 30 prezentowano na konferencjach o zasięgu międzynarodowym (załącznik 7, II.2.). Sumaryczny IF oryginalnych pełnotekstowych prac opublikowanych w renomowanych czasopismach wynosi 38,654 IF, wg punktacji MNiSW 568. Liczba cytowań prac wynosi 198, a bez autocytowań 185 (wg danych bibliometrycznych Web of Science na dzień 29.06.2020, załącznik 6). Mój indeks Hirscha wynosi 9.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Przebywałam na 3 letnim stażu na Uniwersytecie Drexel. Podczas stażu w Zakładzie Neurobiologii, pod kierunkiem prof. Douglasa Baird'a, uczestniczyłam w badaniach znaczenia semaforyn, neuropilin oraz kinezyn w migracji aksonów do właściwych miejsc podczas rozwoju embrionalnego oraz postembrionalnego. Efektem podjętej współpracy są dwie publikacje. Nabytą wiedzę molekularną oraz doświadczenie wykorzystałam do napisania projektu grantowego promotorskiego (kierownik prof. Zdzisław Krawczyk) na temat badania udziału semaforyn i neuropilin w procesie migracji komórek nowotworowych, którego rezultatem była rozprawa doktorska i publikacja.

Dodatkowo, podczas stażu na Uniwersytecie Drexel, pod kierunkiem Jonathana Nissano'v'a, uczestniczyłam w tworzeniu biblioteki mózgu myszy 3D (MBL - The Mouse Brain Library) składającej się z obrazów o wysokiej rozdzielczości i baz danych. Badania polegały na cyklu krojeń i zdjęć mózgu, które następnie były składane tworząc obrazy histologiczne.

W 2004 roku uzyskałam stypendium Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN na sześciomiesięczny staż naukowy w pracowni prof. Włodzimierza Krzyżosiaka w Instytucie Chemii

Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Podczas stażu realizowałam projekt pt. „Wyciszenie genu neuropiliny-1 za pomocą techniki RNAi”.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Opiekun naukowy pracy dyplomowej magisterskiej: „Pomiar stężenia wolnego krążącego DNA (cfDNA) z wykorzystaniem techniki QPCR oraz detekcja HPV16 we krwi chorych na raka płuca”, Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach.

Opiekun naukowy pracy dyplomowej magisterskiej: „Immunohistochemiczne badanie MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 w skrawkach parafinowych guzów pacjentów z obciążeniem rodzinnym nowotworami złośliwymi –oszacowanie przydatności w diagnostycznym badaniu genetycznym”, Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w Katowicach.

Opiekun naukowy stażystów, nauka i nadzór przeprowadzania badań molekularnych, analizy bioinformatycznej, prowadzenia i pasażowania hodowli komórkowych.

Opiekun naukowy praktykantów II i IV roku Wydziału Nauk Farmaceutycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, kierunków Analityka Medyczna oraz Biotechnologia Medyczna.

Dodatkowo, w ramach prowadzonej dydaktyki, prowadziłam wykłady dotyczące wykorzystania badań molekularnych w diagnostyce.

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka.

W latach 2008 – 2011 prowadziłam badania naukowe dotyczące potencjalnego wykorzystania barwienia immunohistochemicznego skrawków guzów oraz metody HRM (High Resolution Melting) w celu wykrywania mutacji w genach MLH1 i MSH2. Efektem podjętej tematyki było wdrożenie badania HRM do wykrywania mutacji w genach MLH1 i MSH2 u chorych z podejrzeniem dziedzicznego raka jelita grubego niezwiązanego z polipowatością (HNPCC, Zespół Lynch I i II). Na podstawie opracowanej walidacji wykonywałam badania genetyczne wykrywania mutacji w MLH1 i MSH2 dla Poradni Genetyki Onkologicznej i Diagnostyki Molekularnej Przychodni Przyklinicznej IO w latach 2011 – 2016.

W latach 2013 – 2017 prowadziłam prace badawcze związane z wykrywaniem DNA EBV u chorych na raka nosogardła. Efektem podjętej tematyki było wdrożenie i wykonywanie diagnostyki badania EBV u chorych na raka nosogardła w latach 2016 – 2017.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Kierowanie projektami grantowymi

1. Jestem kierownikiem grantu finansowanego w ramach wspólnego przedsięwzięcia Narodowego Centrum Nauki i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, dofinansowanego z NCBR pt. „Opracowanie strategii diagnostyczno-terapeutycznej HPV-zależnych nowotworów w oparciu o uwarunkowania genetyczne w celu optymalizacji leczenia” TANGO2/340829/NCBR/2017 (Załącznik 8).
2. Byłam kierownikiem grantu wewnętrznego w latach 2016-2017 pt. „Oszacowanie przydatności oznaczania wirusa ludzkiego brodawczaka (HPV) u chorych na raka odbytu”.
3. Byłam kierownikiem grantu dofinansowanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Narodowe Centrum Nauki) pt. „Ocena przydatności oznaczania krążącego DNA i poszukiwania w nim mutacji somatycznych genów EGFR i KRAS w rakach płuc oraz głowy i szyi”; NN402450039, projekt własny, realizowany w latach 2010-2013 (Załącznik 8).
4. Byłam głównym wykonawcą grantu promotorskiego pt. „Rola neuropiliny -1 oraz semaforyn klasy trzeciej w procesie migracji komórek nowotworowych czerniaka B16”. Grant realizowany w latach 2004-2006, nr grantu 2 P05A 022 27, Kierownik grantu prof. Zdzisław Krawczyk.

Nagrody i wyróżnienia

1. Wyróżnienie i zajęcie VIII miejsca w konkursie Złoty Skalpel 2018 za projekt „Opracowanie strategii diagnostyczno-terapeutycznej HPV-zależnych nowotworów w oparciu o uwarunkowania genetyczne w celu optymalizacji leczenia” (projekt TANGO2).
2. Wyróżnienie na ASTRO w 2016 roku, prezentacja ustna Rutkowski T, Mazurek AM, Śnietura M, Wygoda A, Bojko U, Widłak P, Składowski K. Circulating Cell-Free Human Papillomavirus DNA as a Marker of Treatment Outcome in Patients With HPV-Positive Squamous Cell Head and Neck Cancer After Radio(chemo) Therapy. INT J RADIAT ONCOL, Volume 96, Issue 2, Supplement, Page S41, 2016. ASTRO. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.06.111>

.....
(podpis wnioskodawcy)

Literatura

- Ang KK, Trotti A, Brown BW, et al. Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:571–578.
- Andrade RS, Heron DE, Degirmenci B, Filho PA, Branstetter BF, Seethala RR, Ferris RL, Avril N. Posttreatment assessment of response using FDG-PET/CT for patients treated with definitive radiation therapy for head and neck cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Aug 1;65(5):1315–22.
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem.* 2004, 50:1668–70.
- Bai H, Mao L, Wang HS, Zhao J, Yang L, An TT, Wang X, Duan CJ, Wu NM, Guo ZQ, Liu YX, Liu HN, Wang YY, Wang J. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jun 1;27(16):2653–9.
- de Bree R, van der Putten L, Brouwer J, Castelijns JA, Hoekstra OS, Leemans CR. Detection of locoregional recurrent head and neck cancer after (chemo)radiotherapy using modern imaging. *Oral Oncol.* 2009 Apr–May;45(4–5):386–93.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013 Aug;10(8):472–84.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16368–73.
- Dunaeva M, Buddingh' BC, Toes RE, Luime JJ, Lubberts E, Pruijn GJ. Decreased serum cell-free DNA levels in rheumatoid arthritis. *Auto Immun Highlights.* 2015 Aug;6(1–2):23–30.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 20;100(4):261–9.
- Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol.* 2015 Mar;235(4):527–38. doi: 10.1002/path.4496.
- Guily JL, AC. Jacquard, JL. Pretet, J Haesebaert, A Beby-Defaux, C Clavel, G Agius, P Birembaut, C Okais, Y Leocmach, B Soubeyrand, P Pradat, D Riethmuller, C Mougin, F Denis. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France – the EDiTH VI study, *J. Clin. Virol.* 51 (2011) 100–104.
- Guo T, Qualliotine JR, Ha PK, Califano JA, Kim Y, Saunders JR, Blanco RG, D'Souza G, Zhang Z, Chung CH, Kiess A, Gourin CG, Koch W, Richmon JD, Agrawal N, Eisele DW, Fakhry C. Surgical salvage improves overall survival for patients with HPV-positive and HPV-negative recurrent locoregional and distant metastatic oropharyngeal cancer. *Cancer.* 2015 Jun 15;121(12):1977–84.
- Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem.* 2005 Jan;51(1):113–8.
- Imaizumi A, Yoshino N, Yamada I, et al. A potential pitfall of MR imaging for assessing mandibular invasion of squamous cell carcinoma in the oral cavity. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27:114–122.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659–65.
- Jin T, Lin H, Lin HX, Cai XY, Wang HZ, Hu WH, Guo LB, Zhao JZ. Treatment and prognosis of patients with recurrent laryngeal carcinoma: a retrospective study. *Head Neck Oncol.* 2013;5:10–10.
- Juillard F, Tan M, Li S, Kaye KM. Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Genome Persistence. *Front Microbiol.* 2016 Aug 12;7:1149. doi: 10.3389/fmicb.2016.01149. eCollection 2016. Review.
- Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrand K, Thiede S, Distel RJ, Jänne PA. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 15;15(8):2630–6.

- Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20;27(12):1992-8.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646-50.
- Leon SA, Revach M, Ehrlich GE, Adler R, Petersen V, Shapiro B. DNA in synovial fluid and the circulation of patients with arthritis. *Arthritis Rheum*. (1981) 24:1142-50.
- Liu TB, Zheng ZH, Pan J, Pan LL, Chen LH. Prognostic role of plasma Epstein-Barr virus DNA load for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Clin Invest Med*. 2017 Feb 19;40(1):E1-E12. Review. PubMed PMID: 28218577.
- Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. (2000) 46:319-23.
- Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Feb;142(3-4):241-3.
- McCollum AD, Burrell SC, Haddad RI, et al. Positron emission tomography with 18 F-fluorodeoxyglucose to predict pathologic response after induction chemotherapy and definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Head Neck* 2004; 26:890-896.
- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2012;35:747-55.
- Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj AS, Robert B, Del Rio M, Molina F, Lamy PJ, Lopez-Crapez E, Mathonnet M, Ychou M, Pezet D, Thierry AR. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl Oncol*. 2013 Jun 1;6(3):319-28.
- Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009 Jul; 92(1):4-14.
- Ragin CC, E Taioli. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis, *Int. J. Cancer* 121 (2007) 1813-1820.
- Silva JM, Bonilla F. Correspondence re: F. Coulet et al., Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.*, 60: 707-709, 2000. *Cancer Res*. 2001 Dec 1;61(23):8595-6.
- Song C, Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pak J Med Sci*. 2013 May;29(3):885-90. Review. PubMed PMID: 24353651; PubMed Central PMCID: PMC3809314.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3902-8.
- Tantiwongkosi B, Yu F, Kanard A, Miller FR. Role of (18)F-FDG PET/CT in pre and post treatment evaluation in head and neck carcinoma. *World J Radiol*. 2014 May 28;6(5):177-91.
- Yu KH, Lo YM, Tse GM, Chan KC, Chan AB, Chow KC, Ma TK, Vlantis AC, Leung SF, van Hasselt CA, Johnson PJ, Chan AT. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nonnasopharyngeal head and neck carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 1;10(5):1726-32.
- Zhang W, Chen Y, Chen L, Guo R, Zhou G, Tang L, Mao Y, Li W, Liu X, Du X, Sun Y, Ma J. The clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA assays in nasopharyngeal carcinoma: the dawn of a new era?: a systematic review and meta-analysis of 7836 cases. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e845.