

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Woźniak

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

- 1996 magister farmacji
Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Gdańsku (obecnie: Gdański Uniwersytet Medyczny - GUMed)
praca magisterska: Zastosowanie testu wymiany chromatyd siostrzanych chromosomów człowieka w ocenie mutagenności pochodnej pirazyno CH/NH-kwasów.
promotor: prof. dr hab. Janusz Limon
- 1998 magister biotechnologii
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna w Gdańsku
praca magisterska: Badania molekularne i cytogenetyczne w niedrobnokomórkowym raku płuc.
promotor: prof. dr hab. Janusz Limon
- 2001 doktor nauk medycznych (dziedzina: biologia medyczna, specjalność: genetyka medyczna)
Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Gdańsku
rozprawa doktorska: Utrata heterozygotyczności wybranych markerów z chromosomu 22q oraz mutacje genu *KITC* w komórkach nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego człowieka.
promotor: prof. dr hab. Janusz Limon
- 2006 specjalista diagnostyki laboratoryjnej, specjalność genetyka kliniczna

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 1997-1999 Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku
stanowisko: *starszy referent inżynieryjno-techniczny*
- 1999-2002 Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku
stanowisko: *asystent*
- 2002-2008 Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku
stanowisko: *adiunkt*
- 2009-2012 *Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology, KU Leuven – University of Leuven, Belgium*
stanowisko: *postdoctoral researcher*

od 2012 *Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology, KU Leuven, Belgium*
stanowisko: *menedżer naukowy (research manager)*

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

Moje osiągnięcie naukowe stanowi cykl siedmiu powiązanych tematycznie publikacji (sześć prac oryginalnych, jedna praca przeglądowa), opublikowanych w latach 2012-2017, dotyczących podłoża molekularnego i przedklinicznego testowania terapii celowanej w nowotworach podścieliska przewodu pokarmowego z zastosowaniem ludzkich ksenograftów ustanowionych w myszach.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania (*Impact Factor – IF*): **44,252**.

Łączna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (KBN/MNiSW): **265**.

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Podłoże molekularne i terapia celowana w nowotworach podścieliskowych przewodu pokarmowego człowieka.

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

4.1 **Wozniak A¹**, Rutkowski P, Piskorz A, Ciwoniuk M, Osuch C, Bylina E, Sygut J, Chosia M, Rys J, Urbanczyk K, Kruszewski W, Sowa P, Siedlecki J, Debiec-Rychter M, Limon J, on behalf of Polish GIST Registry. *Prognostic value of KIT/PDGFR mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience*. Ann Oncol. 2012;23(2):353-360. IF: 7,384; KBN/MNiSW: 40; liczba cytowań²: 52; udział w pracy: 75%

4.2 Floris G³, **Wozniak A³**, Sciot R, Li H, Friedman L, Van Looy T, Wellens J, Vermaelen P, Deroose C, Fletcher JA, Debiec-Rychter M, Schöffski P. *A potent combination of the novel PI3K inhibitor GDC-0941, with imatinib in gastrointestinal stromal tumor xenografts: long-lasting responses after treatment withdrawal*. Clin Cancer Res 2013;19(3):620-630. IF: 8,193; KBN/MNiSW: 45; liczba cytowań: 33; udział w pracy: 40%.

4.3 **Wozniak A¹**, Rutkowski P, Schöffski P, Ray-Coquard I, Hostein I, Schildhaus H-U, Le Cesne A, Bylina E, Limon J, Blay J-Y, Siedlecki JA, Wardelmann E, Sciot R, Coindre J-M, Debiec-Rychter M. *Tumor genotype is an independent prognostic factor in primary*

gastrointestinal stromal tumors of gastric origin: A European multicenter analysis based on ConticaGIST. Clin Cancer Res. 2014;20(23):6105-6116. IF: 8,722; KBN/MNiSW: 45; liczba cytowań: 40; udział w pracy: 75%.

4.4 Van Looy T^{3*}, **Wozniak A³**, Floris G, Sciot R, Li H, Wellens J, Van Leeuw U, Fletcher JA, Manley P, Debiec-Rychter M, Schöffski P (*equal contribution). *Phosphoinositide 3-kinase inhibitors combined with imatinib in patient-derived xenograft models of gastrointestinal stromal tumours: rationale and efficacy*. Clin Cancer Res. 2014;20(23):6071-6082. IF: 8,722; KBN/MNiSW: 45; liczba cytowań: 17; udział w pracy: 40%.

4.5 Van Looy T³, **Wozniak A³**, Floris G, Li H, Wellens J, Vanleeuw U, Sciot R, Debiec-Rychter M, Schöffski P (*equal contribution). *Therapeutic efficacy assessment of CK6, a monoclonal KIT antibody, in a panel of gastrointestinal stromal tumour xenograft models*. Transl Oncol 2015;8(2):112-118. IF: 3,077; KBN/MNiSW: 30; liczba cytowań: 4; udział w pracy: 40%.

4.6 Gebreyohannes YK, Schöffski P, van Looy T, Wellens J, Vreys L, Cornillie J, Vanleeuw U, Aftab D, Debiec-Rychter M, Sciot R, **Wozniak A¹**. *Cabozantinib is active against human gastrointestinal stromal tumor xenografts carrying different KIT mutations*. Mol Cancer Ther. 2016;15(12):2845-2852. IF: 5,764; KBN/MNiSW: 40; liczba cytowań: 3; udział w pracy: 40%.

4.7 **Wozniak A¹**, Gebreyohannes YK, Debiec-Rychter M, Schöffski P. *New targets and therapies for gastrointestinal stromal tumors [praca przeglądowa]*. Expert Rev Anticancer Ther. 2017;17(12):1117-1129. IF: 2,390; KBN/MNiSW: 20; liczba cytowań: 1; udział w pracy: 80%.

¹ - autor korespondencyjny

² – liczba cytowań na podstawie Scopus (stan na 20/03/2018)

³ - równy wkład w powstanie pracy

Oświadczenie, dotyczące mojego wkładu w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład cyklu wykonanych prac w ramach opublikowanych badań oraz procentowego w nich udziału znajdują się w **załączniku nr 4**. Oświadczenia współautorów publikacji, określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac znajdują się w **załączniku nr 8**.

W powyższych pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji siedmiu projektów badawczych:

1. Predictive significance of *KIT/PDGFR*A mutation in treatment-naïve gastrointestinal stromal tumours (GIST): ConticaGIST. *European collaborative initiative commenced within*

FP6 Connective Tissue Tumour Network of Excellence (CONTICANET). EU network of excellence (2006-2011); kierownik projektu.

2. Human Soft Tissue Sarcomas xenograft mouse models as an opportunity to improve the therapeutic options for patients. *Grant Fonds Wetenschappelijk Onderzoek (FWO), Belgia (2010-2014); wykonawca.*
3. Efficacy of GDC-0941 in gastrointestinal stromal tumors (GIST) xenograft models. *Projekt finansowany przez Genentech, USA (2010-2013); koordynator projektu/główny wykonawca.*
4. Efficacy studies *in vitro* and *in vivo* of the ImClone antibody CK6 in GIST. *Projekt finansowany przez ImClone, USA (2010-2013); koordynator projektu/główny wykonawca.*
5. Efficacy of PI3K inhibitors BEZ235, BYL729, BKM120 and BGJ398 in GIST *in vivo*. *Projekt finansowany przez Novartis, USA (2011-2012); koordynator projektu/główny wykonawca.*
6. *In vivo* efficacy of cabozantinib (XL184) using xenograft mouse models of mesenchymal tumors. *Projekt finansowany przez Exelixis, USA (2013-2015); koordynator projektu/główny wykonawca.*
7. Unrevealing the molecular basis of resistance in STS and exploring potential therapeutic implications. *Grant Kom op tegen Kanker (Stand up to Cancer), the Flemish Cancer Society, Belgia (2015-2019); główny wykonawca (co-promoter).*

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

Wstęp

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal stromal tumours* – GIST) człowieka są rzadkimi nowotworami pochodzenia mezenchymalnego, rozwijającymi się w różnych narządach układu trawiennego. W Europie częstość ich występowania szacuje się na 1-1.5 przypadków na 100,000 osób populacji rocznie [1]. GIST występują również często u kobiet i u mężczyzn, rozpoznawanych zwykle po 60. roku życia, chociaż ok. 1-2% GIST występuje u osób w wieku poniżej 20 lat (pediatryczne GIST) [1,2]. GIST mogą występować na całej długości przewodu pokarmowego, jednak najczęściej zlokalizowane są w żołądku (50%) i jelicie cienkim (25%) [1,2].

Większość GIST diagnozowana jest w stadium zlokalizowanej choroby, możliwym do chirurgicznego usunięcia, jednak nawet wtedy u ok. 40-50% pacjentów pojawia się wznova

lub przerzuty w dalszym przebiegu choroby [2]. Obecnie ryzyko wystąpienia nawrotu choroby ocenia się na podstawie cech guza, używa się do tego celu tzw. klasyfikacji AFIP (ang. *Armed Forces Institute of Pathology*), która bierze pod uwagę wielkość, indeks mitotyczny oraz lokalizację guza pierwotnego [3] lub zmodyfikowanych kryteriów NIH (ang. *National Institute of Health*), uwzględniających dodatkowo śródoperacyjne pęknięcie guza [4]. GIST uważane są za nowotwory odporne na radioterapię oraz chemioterapię lekami cytotoksycznymi, z odpowiedzią rzędu <5% [5].

W ok. 95% guzów GIST obserwuje się ekspresję receptorowej kinazy tyrozynowej (RKT) - białka KIT i w ok. 98% obecność białka DOG1 (ang. *Discovered on GIST 1*), których obecność stanowi podstawę diagnostyki różnicowej GIST [6,7]. W większość guzów (75-85%) wykrywa się również aktywującą mutację w onkogenie *KIT* lub w genie kodującym receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa (ang. *platelet derived growth factor receptor alpha – PDGFRA*) [8,9]. Mutacje w *KIT* występują najczęściej w eksonie 11 (60-75%) oraz w eksonie 9 (7-10%), natomiast zmiany w *PDGFRA* dotyczą głównie eksonu 18 (7-15%) [10]. W około 10-15% GIST dorosłych oraz w 85% guzów pediatrycznych nie wykrywa się mutacji *KIT/PDGFRA* i uważa się je za osobny podtyp tego nowotworu, również ze względu na odmienną biologię i przebieg kliniczny [11].

Mutacje w *KIT/PDGFRA* prowadzą do konstytutywnej, niezależnej od liganda, aktywacji kodowanych receptorów, która powoduje niekontrolowaną aktywację szlaków sygnalizacji komórkowej, co w następstwie prowadzi do zaburzenia regulacji proliferacji komórek i do rozwoju GIST. Aktywacja ta dotyczy głównie szlaku PI3K (kinaza fosfatydoinozytolu – ang. *phosphoinositide 3-kinase*)/AKT, RAS/RAF/MAPK (kinaza aktywowana mitogenami - ang. *mitogen-activated protein kinase*) oraz JAK (kinaza Janusa – ang. *Janus-activated kinases*)/STAT3 (białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję 3 – ang. *signal transducer and activator of transcription*) [12].

Zależność GIST od RKT umożliwia leczenie pacjentów z GIST przy pomocy inhibitorów kinaz tyrozynowych (ang. *tyrosine kinase inhibitors* -TKI) takich jak dostępny od kilkunastu lat imatynib, które specyficznie blokują nieprawidłowe białka KIT/PDGFRA. Odpowiedź na leczenie imatynibem obserwuje się u ok. 50% pacjentów, a stabilizację choroby u dodatkowych 25%, z dwuletnim okresem przeżycia całkowitego 70-80% [13]. Niestety, w trakcie terapii większość pacjentów ulega progresji, a leki drugiej (sunitynib) i trzeciej (regorafenib) linii wykazują jedynie ograniczoną skuteczność w przypadku opornych GIST [14,15].

Oporność GIST na terapię TKI może być pierwotna lub wtórna, która w obu przypadkach w dużej mierze zależy od charakterystyki molekularnej guza. Pierwotna oporność, definiowana jako progresja choroby w ciągu pierwszych sześciu miesięcy terapii, obserwowana jest u ok 10% pacjentów i spowodowana jest najczęściej obecnością substytucji *PDGFRA* p.D842V lub duplikacji w eksonie 9 genu *KIT* [16]. Wtórna oporność występuje po wielu miesiącach/ latach

odpowiedzi klinicznej na imatynib i zwykle związana jest z pojawieniem się wtórnych mutacji w genach *KIT/PDGFRA*, a zmiany te dotyczą najczęściej miejsca wiązania ATP (kodowanych przez eksony 13/14) lub pętli aktywacyjnej receptora (eksony 17/18) [17-19]. Rzadziej wtórna oporność związana jest z obecnością zmian w genach, kodujących elementy komórkowych szlaków sygnalizacyjnych (np. *PI3KCA*, *PTEN*) [20], lub z aktywacją alternatywnych RKT np. AXL lub MET [21,22]. Pacjenci, u których występuje oporność na wszystkie trzy zarejestrowane TKI nie mają dalszych alternatyw terapeutycznych.

Cele przedstawionego osiągnięcia naukowego

Głównymi celami badań było:

- określenie znaczenia prognostycznego typu mutacji *KIT/PDGFRA* w nieleczonych GIST, który mógłby być uwzględniony jako dodatkowy czynnik do oceny ryzyka nawrotu choroby [**publikacje 4.1 oraz 4.3**];
- zastosowanie heteroprzeszczepów, pochodzących od pacjentów, ustanowionych w myszach (ang. *patient-derived xenografts* – PDX), do przedklinicznego testowania leków *in vivo* [**publikacje 4.2, 4.4-4.6**];
- identyfikacja nowych celów terapeutycznych do leczenia GIST [opisane w **pracy przeglądowej 4.7**];
- przedkliniczna ocena aktywności specyficznych inhibitorów, ze szczególnych uwzględnieniem przeciwciała anty-KIT [**publikacja 4.5**], inhibitora hamującego jednocześnie kilka receptorów [**publikacja 4.6**] oraz inhibitorów hamujących aktywność PI3K [**publikacje 4.2 oraz 4.4**].

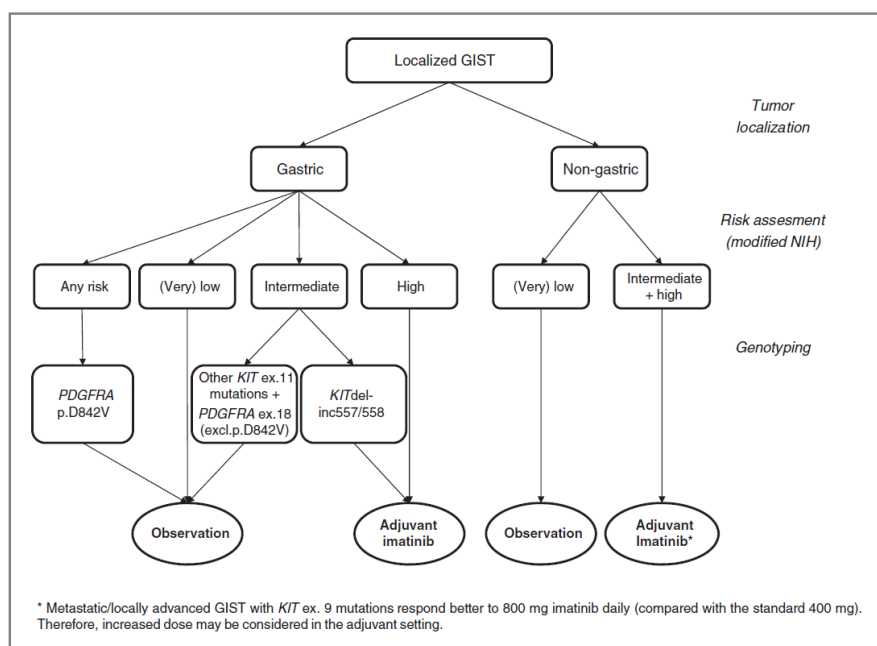
Wyniki i dyskusja

- **Prognostyczne znaczenie typu mutacji *KIT/PDGFRA* w pierwotnych GIST**

Do tej pory kilka retrospektywnych badań opisywało związek pomiędzy typem mutacji *KIT/PDGFRA* a przebiegiem klinicznym choroby u pacjentów z GIST i postulowało ich znaczenie prognostycznie w przypadku guzów pierwotnych. Szczególnie delecja *KIT* w eksonie 11, dotycząca kodonów Trp557 i/lub Lys558 (*'KIT_557/558_del'*) i duplikacja w eksonie 9 *KIT* mogą mieć związek z agresywnym przebiegiem choroby [23-25]. Z drugiej strony większość GIST z mutacją w *PDGFRA* charakteryzuje się niskim ryzykiem nawrotu [26]. Jednak jak do tej pory nie udało się uwzględnić czynnika molekularnego w klasyfikacji, określającej ryzyko progresji GIST, która jest istotna m.in. do kwalifikacji pacjentów do adjuwantowego leczenia imatynibem, które dostępne jest w Europie dla pacjentów o „wysokim”, natomiast w USA dla tych o „znacznym” ryzyku nawrotu choroby.

W ramach Polskiego Rejestru GIST [**publikacja 4.1**] podjęłam się oszacowania znaczenia różnych typów mutacji w grupie 427 pierwotnych GIST, dla których dostępne były dane molekularne i kliniczne. W tej grupie większość GIST z mutacją *KIT* w eksonie 9 i 11 zostały zakwalifikowane wg kryteriów AFIP [3] jako guzy o wysokim stopniu złośliwości, natomiast *PDGFRA*-mutanty zostały określone jako guzy o (bardzo) niskim ryzyku wznowy. Pacjenci z mutacją '*KIT_557/558_del*' mieli niższy odsetek 5-letniego przeżycia bez nawrotu (ang. *progression-free survival* – PFS) w porównaniu z tymi, w których guzach zaobserwowano inną mutację eksonu 11 lub gdy zmiana dotyczyła mutacja w *PDGFRA*. Te wyniki następnie potwierdziłam w badaniu przeprowadzonym w ramach Europejskiego programu sieci doskonałości CONTICANET, które pozwoliło na zgromadzeniu danych kliniczne i molekularne od >1000 pacjentów z GIST, diagnozowanych i leczonych w 13 instytucjach z czterech krajów a ryzyko wznowy zostało określone przy pomocy modyfikowanej klasyfikacji NIH [4] [**publikacja 4.3**]. Poza wcześniej stwierdzonymi zależnościami, w analizie wieloczynnikowej stwierdziłam, że poza-żołądkowa lokalizacja, wielkość guza >10cm, indeks mitotyczny >10 mitoz w 50 polach widzenia, duplikacja w eksonie 9 *KIT* oraz '*KIT_557/558_del*' korelowały z krótszym PFS. Co ciekawe, gorsze rokowania dla pacjentów z mutacją '*KIT_557/558_del*' w porównaniu z innymi mutacjami w eksonie 11 stwierdziłam jedynie w przypadku guzów wywodzących się z żołądka, podczas gdy w przypadku GIST o lokalizacji poza-żołądkowej typ mutacji nie miał znaczenia prognostycznego.

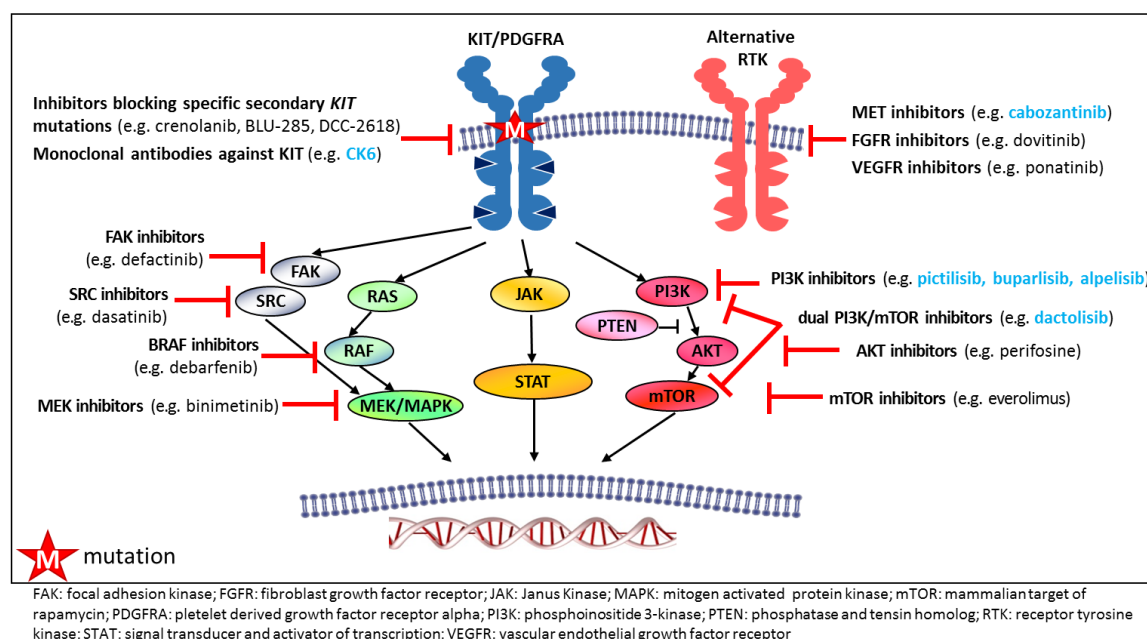
W obu badaniach [**publikacje 4.1** oraz **4.3**] wykazałam niezależne znaczenie prognostycznie specyficznych typów mutacji w *KIT/PDGFRA*, szczególnie '*KIT_557/558_del*' dla zlokalizowanych GIST, pochodzących z żołądka, nieleczonych TKI. Możliwość przewidywania przebiegu klinicznego choroby ma kluczowe znaczenie w prowadzeniu pacjentów z GIST, szczególnie jeśli chodzi o kwalifikowanie ich do adjuwantowego leczenia imatynibem. W związku z tymi obserwacjami zaproponowaliśmy praktyczny algorytm postępowania, który uwzględnia zarówno zmodyfikowane kryteria NIH jak i cechy molekularne guza (Rycina 1, pochodząca z **publikacji 4.3**). Obecnie prowadzimy dalsze analizy na grupie >1800 przypadków z danymi, zebranych w ramach rozszerzonego projektu ConticaGIST, w skład którego wchodzi 19 instytucji z sześciu krajów. W ramach tego projektu planujemy opracowanie i zwalidowanie nowej klasyfikacji, która ostatecznie włączy status mutacji *KIT/PDGFRA* jako dodatkowy czynnik prognostyczny do klasyfikacji ryzyka nawrotu dla zlokalizowanych GIST.



Rycina 1. Schemat zalecanego postępowania w przypadku kwalifikacji do adjuwantowego leczenia imatynibem pacjentów ze zlokalizowanym GIST, oparta na zmodyfikowanej klasyfikacji NIH i na genotypie guza [rycina pochodzi z **publikacji 4.3**].

- **Identyfikacja i walidacja nowych celów terapeutycznych, istotnych dla terapii pacjentów z GIST**

Mimo, że zastosowanie TKI zrewolucjonizowało terapię pacjentów w GIST, pojawienie się w oporności na leczenie stanowi wciąż istotny problem kliniczny. Pacjenci z opornością pierwotną od początku nie odpowiadają na TKI, podczas gdy oporność wtórna pojawia się w trakcie leczenia, nawet po wielu miesiącach/latach. Oporność wtórna spowodowana jest najczęściej pojawieniem się wtórnych mutacji w domenie kinazowej receptorów KIT/PDGFR α , zmianą w genach kodujących elementy szlaku sygnalizacji komórkowej (np. *PI3KCA*, *PTEN*), amplifikacji lub utraty ekspresji *KIT* oraz aktywacji alternatywnych RKT np. receptorów dla czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor* – FGFR 1-3), AXL lub MET (Rycina 2).



Rycina 2. Mechanizm działania RKT, związane z nimi szlaki sygnalizacji komórkowej oraz punkty uchwytu inhibitorów, które mogą znaleźć zastosowanie w przypadku GIST opornych na TKI. Inhibitory zaznaczone na niebiesko zostaną omówione dokładniej w dalszej części autoreferatu [zaadaptowane z publikacji 4.7].

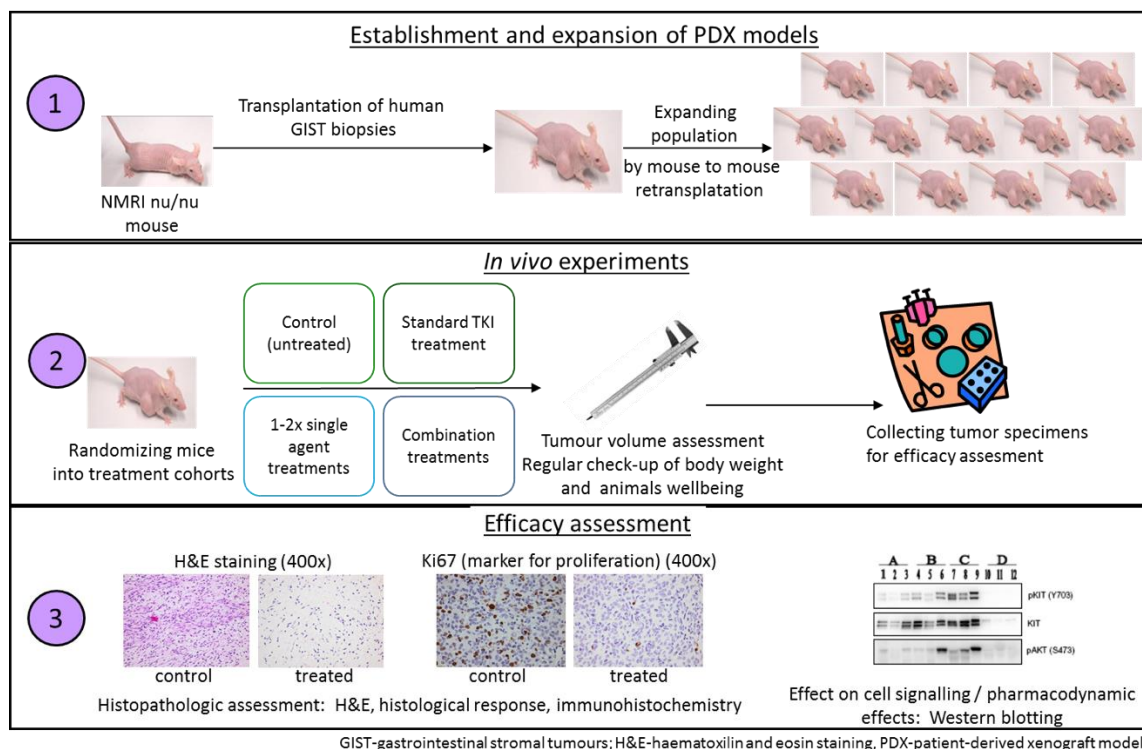
Obecnie wiele badań skupia się na zrozumieniu biologii leżącej u podstaw oporności GIST, identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz przedklinicznej i klinicznej oceny efektywności nowych związków. W mojej pracy przeglądowej zajęłam się opisaniem obecnego stanu wiedzy na ten temat, z uwzględnieniem nowych inhibitorów KIT/PDGFRα, w tym leków specyficznym skierowanych na zmutowane formy receptorów, TKI o szerokim spektrum, związków hamujących aktywność szlaku PI3K/AKT/mTOR, leków modulujących ekspresję i degradację KIT, inhibitorów cyklu komórkowego oraz zastosowaniu immunoterapii w GIST. Ponadto w związku z heterogennością oporności, która może dotyczyć wielu przerzutów pochodzących od jednego pacjenta, znaczenie kliniczne może mieć zastosowanie kombinacji inhibitorów, działających na różnym poziomie szlaku sygnalizacyjnego, co może pozwolić na lepszą kontrolę choroby i dłuższy PFS. Równoległe zahamowanie aktywności dwóch białek tej samej lub z różnych ścieżek transdukcji sygnału lub połączenie terapii celowanej z chemioterapią może zwiększyć odsetek pacjentów odpowiadających na leczenie i/lub opóźnić pojawienie się oporności. Ponadto, jednoczesne podanie związków, które działają na komórki nowotworowe oraz na mikrośrodowisko (np. inhibitory punktów kontroli układu immunologicznego, leki blokujące powstawanie naczyń krwionośnych), chociaż jak dotąd pojedyncze zastosowanie tych związków nie przyniosło zadowalających efektów [publikacja 4.7].

- *Zastosowanie modeli PDX do oceny aktywności nowych leków in vivo*

Aby ułatwić badania nad biologią opornych GIST i umożliwić opracowanie nowych terapii, niezbędny jest dostęp do odpowiednich modeli, jak najlepiej odzwierciedlających sytuację kliniczną. Jednym z rozwiązań może być opracowanie modeli PDX, o których wiadomo, że stosunkowo dobrze odzwierciedlają biologię nowotworu rozwijającego się u człowieka, a ich zastosowanie do badań przedklinicznych pozwala na przewidywanie skuteczności leku w badaniach klinicznych [27]. Grupie badawczej z *Laboratory of Experimental Oncology, KU Leuven*, Belgia w której obecnie pracuję, udało się jako pierwszej ustalić model PDX GIST [28] i do dziś jedynie w kilku ośrodkach na świecie istnieją podobne modele zarówno hetero- jak i ortotopowe [29,30]. W naszym ośrodku wykorzystywane są przeszczepy heterotopowe, czyli fragmenty guza uzyskanego od pacjenta implantowane bezpośrednio do myszy tzw. bezgranicznych. Powyższe ksenografty posłużyły zarówno do badań nad biologią GIST [31], jak i do testowania nowych leków [32-35]. Wyniki te stały się też podstawą do zainicjowania oceny ich aktywności w badaniach klinicznych.

Modele badawcze GIST opracowano na podstawie w tkanek pochodzących od pacjentów (po podpisaniu przez nich świadomej zgody na udział w projekcie), uzyskanych w czasie resekcji guza lub podczas biopsji diagnostycznej w *University Hospitals Leuven*. Fragment tkanki guza zostaje bezpośrednio wszczepiony podskórną, po dwóch stronach do bezgranicznej myszy *nu/nu* (z mutacją w genie *Foxn1*), która nie produkuje funkcjonalnych limfocytów T. W momencie zaobserwowania wzrostu guza, jego fragment pasażuje się do następnych myszy ($n=2$), sprawdzając przy tym czy heteroprzeszczep w kolejnych pasażach powiela cechy histopatologiczne i molekularne (np. mutacje *KIT/PDGFRA*) pierwotnego nowotworu, porównując go z równolegle zbadanym oryginalnym guzem pochodzącym od pacjenta. Do tej pory nasza grupa opracowała siedem modeli GIST, które charakteryzują się różnymi mutacjami w *KIT* oraz różną wrażliwością na standardowe TKI. W celu wykorzystania modelu PDX do testowania leków *in vivo*, odpowiedni model zostaje przetransplantowany do odpowiedniej liczby myszy (najczęściej 6-8 zwierząt w każdej z grup, co daje 12-16 guzów) i gdy heteroprzeszczepy osiągną średnio ok. 300mm³. Myszy są losowo przydzielone do grup eksperymentalnych: kontrola (bez aktywnej terapii), leczenie standardowe (imatinib 50 mg/kg 2x dziennie, sunitynib 40 mg/kg raz dziennie), leczenie eksperymentalne (dawka/podawanie zależy od konkretnego eksperymentu/leku badanego), leczenie skojarzone (dawki jak w przypadku pojedynczych leków). Podczas trwania doświadczenia (zwykle 2-4 tygodnie), wielkość guza mierzona jest trzy razy w tygodniu a myszy obserwowane są codziennie. Ostatniego dnia trwania eksperymentu zwierzęta są poddawane eutanazji poprzez przedawkowanie anestetyku, a guzy są zachowywane do dalszych analiz molekularnych i histopatologicznych m.in. określających aktywność mitotyczną i apoptotyczną (przy pomocy immunohistochemii), oraz analiz sygnalizacji związanej z KIT z zastosowaniem techniki *Western blot* (Rycina 3). Wszystkie procedury zostały zaakceptowane przez KU Leuven

Ethics Committee for Animal Research i są przeprowadzone zgodnie z protokołami oraz obowiązującymi belgijskimi i europejskimi regulacjami [publikacje 4.2, 4.4-4.6].



Rycina 3. Opracowanie mysiego modelu PDX oraz schemat doświadczenia *in vivo*, stosowanego do przedklinicznego określenia aktywności nowych leków.

- *Aktywność CK6, przeciwciała monoklonalnego anty-KIT in vivo*

Zależność GIST od sygnalizacji KIT jest atrakcyjnym celem dla cząsteczek, które mogą się łączyć/blokować zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand. Specyficzne przeciwciała mogłyby nie tylko do zablokować aktywność samego receptora ale również potencjalnie mogłyby nasilić cytotoksyczną odpowiedź immunologiczną gospodarza przeciw nowotworowi. Eris i wsp. opisali aktywność SR1, monoklonalnego przeciwciała anty-KIT, które hamowało proliferację komórek nowotworowych GIST zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, poprzez zmniejszoną ekspresję receptora i zwiększoną fagocytozę komórek nowotworowych przez makrofagi [36].

Kolejnym etapem badań było zbadanie aktywności CK6 (40mg/kg, 3 x w tygodniu przez 3 tygodnie, podawane dootrzewnowo; ImClone Systems), innego ludzkiego przeciwciała monoklonalnego anty-KIT, rozpoznającego zewnątrzkomórkową domenę receptora. W projekcie zastosowano sześć mysich modeli (cztery PDX oraz dwa modele wyprowadzone z linii komórkowych) a CK6 było testowane pojedynczo i w leczeniu skojarzonym z imatynibem lub sunitynibem [publikacja 4.5]. W ramach tego projektu zajmowałam się zaplanowaniem

części eksperymentalnej, przeprowadzeniem części eksperymentów *in vivo* oraz molekularną charakterystyką modeli, zastosowanych w tym badaniu i interpretacją danych. Przeprowadzone badania wykazały, że CK6 doprowadziło do zahamowania wzrostu nowotworu w jednym z sześciu modeli, w żadnym z nich nie stwierdziliśmy znaczącego wpływu na proliferację ani na apoptozę komórek nowotworowych, czy zahamowania aktywności KIT i powiązanych szlaków sygnalizacyjnych. Ponadto, kombinacja CK6 z TKI nie spowodowała zwiększonej efektywności, w porównaniu z terapią jedynie TKI – przeciwnie, poczynione obserwacje sugerują, że leczenie skojarzone powodowało zmniejszenie efektu przeciwnowotworowego, lecz przyczyna tego zjawiska wymaga dalszych badań.

- *Aktywność kabozantynibu, inhibitora hamującego aktywność wielu RKT*

Aktywacja alternatywnych kinaz m.in. FGFR1-3, MET (receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów) lub AXL jest jednym z postulowanych mechanizmów nabytej odporności GIST na leczenie TKI [21,22]. Jednoczesne hamowanie aktywności KIT i MET przez kombinację imatynib + kryzotynib (inhibitor MET/ALK) lub kabozantynib (inhibitor KIT/MET) prowadziło do zahamowania wzrostu GIST zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [22]. Ponadto, ponieważ część z inhibitorów ma również właściwość hamowania angiogenezy, także ta właściwość może mieć istotny wpływ na efektywną terapię GIST.

Kolejnym celem badawczym stanowiła ocena aktywności kabozantynibu (30 mg/kg dziennie przez 2 tygodnie, podawane doustnie; Exelixis), inhibitora wielu kinaz, w tym KIT, MET, AXL oraz receptora dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor receptor* – VEGFR) [publikacja 4.6]. W tym projekcie zajmowałam się zaplanowaniem i nadzorem nad wykonaniem projektu, przeprowadzeniem części doświadczeń *in vivo* oraz wykonaniem analiz molekularnych i interpretacją danych. Aktywność kabozantynibu oceniano w trzech modelach PDX, charakteryzujących się różnymi mutacjami w genie *KIT* i różną wrażliwością na TKI. Przeciwnowotworowy efekt na wzrost guza oraz na proliferację komórek był porównywalny (model TKI-wrażliwy) lub lepszy (modele TKI-oporne) od tego jaki zaobserwowano w guzach traktowanych imatynibem. Dodatkowo, we wszystkich modelach stwierdzono znaczne zmniejszenie liczby naczyń krwionośnych w guzach traktowanych nowym związkiem, co sugeruje, że przynajmniej część efektu przeciwnowotworowego można przypisać anty-angiogennej aktywności kabozantynibu. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do rozpoczęcia badania klinicznego drugiej fazy, mającego na celu ocenę aktywności kabozantynibu u chorych z GIST, opornych na imatynib i sunitynib (NCT02216578, EORTC 1317, "CaboGIST"). Od jego rozpoczęcia w marcu 2017, zrekrutowano już 31 z 50 z zaplanowanych do badania pacjentów.

- *Aktywność inhibitorów PI3K*

Szlak sygnalizacyjny PI3K/AKT/mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) reguluje wzrost komórek, ich przeżycie i metabolizm, dlatego może on być interesującym celem terapeutycznym. W GIST uważa się, że aktywność tej ścieżki jest niezbędna dla wzrostu guzów

opornych na imatynib [37,38] Dane *in vitro* potwierdzają hipotezę, że zahamowanie aktywności PI3K może mieć zasadniczy wpływ na zahamowanie wzrostu GIST [20,38].

W ramach dwóch kolejnych projektów badano cztery doustne inhibitory PI3K o różnych punktach uchwytu: inhibitory hamujące wszystkie podjednostki PI3K (pictylisib 75 mg/kg dziennie, Genetech; buparlysib 30mg/kg dziennie, Novartis), inhibitor hamujący jednocześnie PI3K i mTOR (dactolysib 10 and 40 mg/kg dziennie, Novartis), oraz specyficzny inhibitor podjednostki PI3KCA (alpelysib 25 and 50 mg/kg dziennie, Novartis) [**publikacje 4.2 oraz 4.4**]. W tych badaniach moim zadaniem było zaplanowanie i przeprowadzenie części doświadczeń *in vivo*, przeprowadzenie analiz molekularnych badanego materiału, analizą statystyczną i interpretacja uzyskanych danych eksperymentalnych. Generalnie wszystkie cztery inhibitory, stosowane pojedynczo wykazywały pewien stopień działania przeciwnowotworowego, poprzez stabilizację wzrostu guza, hamowanie proliferacji komórkowej, ale bez indukcji apoptozy. Jednak w skojarzeniu z imatynibem, inhibitory PI3K wykazały znacznie lepszą aktywność, biorąc pod uwagę efekt obserwowany na poziomie komórkowym oraz na poziomie hamowania szlaku, zależnego od KIT. Kombinacja prowadziła do znacznego zmniejszenia wielkości guza oraz zwiększonej aktywności pro-apoptotycznej, w porównaniu z terapią pojedynczym inhibitorem. Dodatkowo, guzy traktowane terapią skojarzoną wykazywały wydłużoną odpowiedź, nawet po zaprzestaniu podawania leczenia, czego nie obserwuje się w przypadku terapii imatynibem. Co ciekawe, efekt przeciwnowotworowy kombinacji zależał w znacznej mierze od genotypu GIST i był znacznie intensywniejszy w przypadku modeli z mutacją eksonu 11 *KIT* oraz w guzach, w których doszło do utraty *PTEN*, negatywnego regulatora szlaku PI3K/AKT (Rycina 3). Ta zależność może pozwolić w przyszłości na właściwą selekcję pacjentów, dla których leczenie inhibitorami PI3K będzie bardziej efektywne. Obecnie leczenie skojarzone (inhibitor PI3K + imatynib) jest prowadzone w dwóch badaniach fazy 1/2, które mają ocenić aktywność kombinacji imatynibu z buparlysibem (NCT01468688) oraz z alpelysibem (NCT01735968) jako leczenie trzeciego rzutu u chorych z opornymi guzami GIST.

Wnioski końcowe

Zaprezentowane osiągnięcie naukowe pozwoliło na poszerzenie wiedzy na temat podłoża molekularnego oraz celów terapeutycznych w GIST, co ma bezpośrednie przełożenie na zrozumienie patogenezy tych nowotworów, jak również ma zastosowanie praktyczne. W szczególności:

- Wykazałam, że typ mutacji *KIT/PDGFR*A ma znaczenie prognostyczne w przypadku zlokalizowanych GIST, nieleczonych TKI. Wyniki te pozwoliły na zidentyfikowanie podtypu molekularnego GIST o niskim ryzyku nawrotu, dla którego użycie imatynibu w leczeniu adjuwantowym może być kontrowersyjne [**publikacja 4.1 oraz 4.3**].

- Zaproponowałam praktyczny algorytm postępowania, który łączy zwalidowany system oceny ryzyka z genotypem GIST, co może ułatwić właściwą klasyfikację do leczenia adjuwantowego [**publikacja 4.3**]. Obecnie pracuję nad rozszerzoną klasyfikacją ryzyka, uwzględniającą typ mutacji jako niezależny czynnik prognostyczny.
- Udowodniłam, że mysie modele heteroprzeszczepu GIST są ważnym narzędziem do przedklinicznego badania nowych leków *in vivo* dla tego rzadkiego typu nowotworu [**publikacje 4.2, 4.4-4.6**]. Dzięki nim, we współpracy z firmami farmaceutycznymi i biotechnologicznymi, testowane są nowe strategie terapeutyczne [podsumowane w **pracy przeglądowej 4.7**]. Wyniki przeprowadzonych badań stanowią merytoryczną podstawę to wprowadzenia tych leków do badań klinicznych, co w dalszym efekcie może doprowadzić do poprawienia efektywności leczenia pacjentów z GIST.
- Korzystając z doświadczenia, zdobytego podczas pracy z modelami GIST, opracowano modele pochodzące z innych nowotworów tkanek miękkich (ang. *soft tissue sarcoma* – STS) i kilka z nich zostało już wykorzystanych do badań aktywności nowych związków. Modele te są dostępne w ramach współpracy naukowej dla instytucji naukowo-badawczych oraz dla firm farmaceutycznych i biotechnologicznych.
- Nie wykazałam przeciwnowotworowego działania CK6, przeciwciała monoklonalnego anty-KIT, zarówno pojedynczo jak i w leczeniu skojarzonym ze standardowymi TKI [**publikacja 4.6**].
- Przedstawiłam przeciwnowotworową aktywność kabozantynibu *in vivo* w PDX, która była warunkowana głównie z jego hamującym działaniem na proliferację komórek oraz efektem anty-angiogennym [**publikacja 4.6**]. Te wyniki stanowiły podstawę do zainicjowania badania klinicznego drugiej fazy, u chorych z GIST opornym na imatynib i sunitynib.
- Udowodniłam, że zastosowanie inhibitorów PI3K o różnym spektrum działania prowadzi do zahamowania guzów GIST o różnym stopniu nasilenia tego efektu. Leczenie skojarzone z imatynibem pozwala na osiągnięcie lepszych wyników, które jednak zależne są od genetycznego podłoża badanych/leczonych guzów [**publikacje 4.2 oraz 4.4**]. Te obserwacje stanowią podstawę merytoryczną dla dwóch prowadzonych obecnie badań klinicznych, w ramach których przeprowadzone są również badania dotyczące korelacji odpowiedzi pacjentów z molekularnym profilem guza GIST.

Bibliografia

1. Søreide K, *et al.* Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol.* 2016; 40:39-46.
2. von Mehren M & Joensuu H. Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol.* 2018;36:136-143.

3. Miettinen M & Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130:1466-78.
4. Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol.* 2008; 39:1411-9.
5. Edmonson JH, et al. Contrast of response to dacarbazine, mitomycin, doxorubicin, and cisplatin (DMAP) plus GM-CSF between patients with advanced malignant gastrointestinal stromal tumors and patients with other advanced leiomyosarcomas. *Cancer Invest.* 2002; 20:605-12.
6. Sarlomo-Rikala M, et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998; 11: 728-34.
7. West RB, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004;165:107-13.
8. Hirota S, et al. Gain-of function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998;279:577-80.
9. Heinrich MC, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299:708-10.
10. Joensuu H, et al. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J Clin Oncol* 2015;33:634-42.
11. Boikos SA, et al. Molecular Subtypes of KIT/PDGFRA Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA Oncol* 2016;2:922-8.
12. Duensing A, et al. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene.* 2004;23:3999-4006.
13. Verweij J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364:1127-34.
14. Demetri GD, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368:1329-38.
15. Demetri GD, et al. GRID study investigators. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381:295-302.
16. Heinrich MC, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 2003;21:4342-9
17. Antonescu CR, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005;11:4182-90.
18. Wardelmann E, et al. Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2006;12:1743-9.
19. Liegl B, et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008;216:64-74.
20. Quattrone A, et al. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2014;27:1510-20
21. Mahadevan D, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2007;26:3909-19
22. Cohen NA, et al. Pharmacological Inhibition of KIT Activates MET Signaling in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Res* 2015;75:2061-70
23. Singer S, et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20: 3898-905.
24. Wardelmann E, et al. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2003; 106:887-95.
25. Lasota J, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol.* 2000;157:1091-5.
26. Lasota J, et al. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004;84:874-83.

27. Izumchenko E, et al. Patient-derived xenografts as tools in pharmaceutical development. Clin Pharmacol Ther. 2016; 99:612-21.
28. Prenen H, et al. Establishment of a mouse gastrointestinal stromal tumour model and evaluation of response to imatinib by small animal positron emission tomography. Anticancer Res. 2006; 26:1247-52.
29. Revheim ME, et al. Establishment and characterization of a human gastrointestinal stromal tumour (GIST) xenograft in athymic nude mice. Anticancer Res. 2009; 29:4331-6.
30. Sicklick JK, et al. Generation of orthotopic patient-derived xenografts from gastrointestinal stromal tumor. J Transl Med. 2014; 12:41.
31. Boichuk S, et al. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res. 2014; 74:1200-13.
32. Floris G, et al. High efficacy of panobinostat towards human gastrointestinal stromal tumors in a xenograft mouse model. Clin Cancer Res. 2009; 15:4066-76.
33. Floris G, et al. The heat shock protein 90 inhibitor IPI-504 induces KIT degradation, tumor shrinkage, and cell proliferation arrest in xenograft models of gastrointestinal stromal tumors. Mol Cancer Ther. 2011; 10:1897-908.
34. Floris G, et al. The Novel HSP90 inhibitor, IPI-493, is highly effective in human gastrointestinal stromal tumor xenografts carrying heterogeneous KIT mutations. Clin Cancer Res. 2011;17:5604-14.
35. Smyth T, et al. The HSP90 inhibitor, AT13387, is effective against imatinib-sensitive and -resistant gastrointestinal stromal tumor models. Mol Cancer Ther. 2012;11:1799-808.
36. Edris B, et al. Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:3501-6
37. Patel S. Exploring novel therapeutic targets in GIST: focus on the PI3K/Akt/mTOR pathway. Curr Oncol Rep 2013;15:386-95
38. Bauer S, et al. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway. Oncogene. 2007; 26:7560-8.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (szczegółowa lista w załącznikach 4 i 7)

Jestem współautorką **82 publikacji** (61 pełnotekstowych prac oryginalnych, 12 opisów przypadków i 9 publikacji przeglądowych). Ich sumaryczny **IF wynosi 330,514** (na podstawie Journal Citation Reports, edycja zgodna z rokiem ukazania się publikacji). Sumaryczna punktacja **MNiSW/KBN wynosi 1921**. Według Web of Science (stan na 04.12.2017) liczba **cytowań wynosi 2207** (z pominięciem autocytowań: 2128), **indeks h 25**.

Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Działalność naukową rozpoczęłam jako studentka Wydziału Farmaceutycznego GUMed, podczas badań związanych z pracą magisterską, realizowaną w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed pod opieką prof. dr hab. Janusza Limona. Mój projekt związany był z oceną mutagenności i wpływu na kinetykę komórkową pochodnej pirazyno CH/NH-kwasów, stosując test wymiany chromatyd siostrzanych chromosomów człowieka. Opracowanie tej techniki pozwoliło następnie na przeprowadzenie kolejnego projektu magisterskiego, który nadzorowałam na dalszym etapie mojej pracy naukowej.

Po obronie pracy magisterskiej podjęłam pracę w tej samej Katedrze, początkowo jako starszy referent inżynieryjno-techniczny, a następnie jako asystent, równolegle prowadząc prace nad moim drugim projektem magisterskim na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i GUMed, również pod opieką prof. dr hab. Janusza Limona. Dotyczyła ona molekularnej charakterystyki niedrobnokomórkowego raka płuca, z zastosowaniem technik cytogenetycznych oraz analizy utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* – LOH) polimorficznych markerów z chromosomu 3p i 17q, w poszukiwaniu potencjalnego genu supresorowego, zaangażowanego w rozwój i progresję tego nowotworu. Moja praca została zaprezentowana podczas VI Międzynarodowej Konferencji Studenckiej w Gdańsku (maj 1998), gdzie zdobyłam II nagrodę w sesji ustnej.

Podczas tego etapu mojej pracy współpracowałam z prof. dr hab. Andrzejem Łachińskim z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed, nad molekularną charakterystyką łagodnych i złośliwych guzów tarczycy, stosując technikę LOH. Ponadto byłam zaangażowana w prowadzenie badań cytogenetyczno-molekularnych u pacjentów z konstytucyjnymi zmianami chromosomowymi, gdzie byłam odpowiedzialna za charakteryzację aberracji chromosomowych przy pomocy fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. *fluorescence in situ hybridisation* – FISH) do diagnostyki klinicznej.

Rozprawę doktorską zatytułowaną „Utrata heterozygotyczności wybranych markerów z chromosomu 22q oraz mutacje genu *KITC* w komórkach nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego człowieka”, przygotowaną pod opieką prof. dr hab. Janusza Limona, obroniłam z wyróżnieniem w grudniu 2001 roku, uzyskując stopień doktora nauk medycznych, specjalność genetyka medyczna. Przedmiotem mojej pracy doktorskiej była charakterystyka molekularna GIST, świeżo wyodrębnionego podtypu nowotworu pochodzenia mezenchymalnego. W ramach projektu doktorskiego zajmowałam się analiza LOH wybranych markerów polimorficznych z chromosomu 22q w celu zidentyfikowania potencjalnego genu supresorowego, zaangażowanego w rozwój GIST. Ponadto badałam spektrum mutacji genu *KIT*, koncentrując się na opisanu częstości mutacji w eksonie 9 i 13 oraz ich korelacji z obrazem klinicznym. Większość pracy eksperymentalnej wykonałam w *Department of Soft Tissue Pathology, AFIP*, Waszyngton, USA, kierowanego przez prof. Markku Miettinen, pod opieką dr Jerzego Lasoty. Podczas mojego pobytu w AFIP byłam również zaangażowana w inne projekty, mające na celu opisanie specyficznych zmian molekularnych w rzadkich podtypach STS (m.in. *perineural cell tumours*).

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorem **sześciu publikacji**, w jednej byłam pierwszym autorem, z sumarycznym **IF 17,088** i sumaryczną punktacją **MNiSW/KBN 75**. W tym czasie miałam jedno ustne wystąpienie i 19 prezentacji w formie plakatu w czasie konferencji w Polsce i za granicą – w siedmiu z nich byłam pierwszym autorem. W tym okresie byłam zaangażowana w sześć projektów badawczych, finansowanych z krajowych środków

na naukę, w których odpowiadałam za zastosowanie technik molekularnych do badania podłoża i czynników prognostycznych w nowotworach człowieka.

Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie doktoratu kontynuowałam pracę naukową jako adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki, zajmując się dalej badaniami nad GIST. Dzięki uzyskanemu doświadczeniu oraz współpracy krajowej i zagranicznej, Katedra stała się ośrodkiem referencyjnym, wykonującym oznaczenia mutacji *KIT/PDGFRA* w polskiej populacji. Wyniki naszych badań stały się integralną częścią Polskiego Rejestru GIST, zarządzanego przez prof. dr hab. Piotra Rutkowskiego z Kliniki Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej - Curie w Warszawie. Rejestr stał się podstawą wielu wspólnych projektów, opisujących znaczenie klinicznych czynników prognostycznych dla pacjentów z GIST, walidujących nowe sposoby klasyfikacji GIST a także oceniających czynniki predykcyjne odpowiedzi na adjuwantowe leczenie imatynibem lub na zastosowanie sunitynibu u chorych z rozsiałym GIST. Dzięki zgromadzonym danym molekularnym Katedra brała również udział w projektach określających znaczenie rzadkich mutacji (np. homozygotycznych mutacji w eksonie 11 *KIT* lub zmian w eksonach 13 i 17, dotyczących guzów pierwotnych). Współpraca naukowa z Centrum Onkologii w Warszawie do dziś stanowi ważny element mojej pracy badawczej nad biologią i terapią GIST i innymi nowotworami pochodzenia mezenchymalnego.

W tym czasie byłam również zaangażowana w projekty dotyczące molekularnej oceny konstytucyjnych zmian chromosomowych oraz analizy aberracji w przypadku ostrej białaczki, glejaka wielopostaciowego, czy rzadkich podtypów guzów litych.

W 2004 rozpoczęłam staż podoktorski w *Department of Human Genetics (CME), KU Leuven, Belgia* jako stypendystka *Belgian Office For Scientific, Technical And Cultural Affairs Postdoctoral Fellowship*, pod opieką prof. Marii Dębiec-Rychter, gdzie kontynuowałam moje badania nad zmianami molekularnymi w GIST i innych STS. We współpracy z prof. Jorisem Vermeesch, *Laboratory for Cytogenetics and Genome Research, CME*, opracowałam protokół, wykorzystujący porównawczą hybrydyzację genomową przy użyciu mikromacierzy (ang. *array-based comparative genomic hybridization*), do analizy nie zrównoważonych zmian genomowych w guzach litych. Zastosowałam tę technikę do ich identyfikacji w pierwotnych guzach GIST oraz ich korelacji z rodzajem mutacji, a także do analizy GIST wstępujących u pacjentów z neurofibromatozą typu 1 (NF1) (współpraca: prof. Eric Legius, *Laboratory for Neurofibromatosis Research, CME*). Ponadto, dzięki kontynuowanej współpracy z prof. Rutkowskim opisałam nową mutację germinálną w eksonie 11 *KIT* u dwóch braci, u których występowały zaawansowane GIST, co w dalszym etapie pozwoliło objąć rodzinę odpowiednią opieką genetyczną. Brałam również udział w kilku projektach, prowadzonych przez prof. Jean-Michel Coindre, *Institute Bergonie, Bordeaux, Francja*, w

ramach French Sarcoma Group. Prace te miały na celu określenie związku między stopniem ekspresji a liczbą kopii *KIT*, analizy niestabilności chromosomowej jako czynnika związanego ze stopniem agresywności GIST. Brałam też czynny udział w opisywaniu nowych zmian genetycznych w rzadkich podtypach nowotworów tkanek miękkich (np. egzostoza pod paznokciową, maziówczak złośliwy, mięsak podścieliskowy endometrium o niskim stopniu złośliwości).

Następnie rozpoczęłam pracę w *Laboratory of Experimental Oncology (LEO), Department of Oncology*, pod kierownictwem prof. Patricka Schöffskiego, początkowo w ramach stażu podoktorskiego a obecnie jako menedżer naukowy (*research manager*), gdzie kontynuuję prace nad STS/GIST, we współpracy z *CME, Department of Pathology, University Hospitals of Leuven* (prof. Raf Sciot), *Department of General Medical Oncology (AMO)* (prof. Patrick Schöffski) oraz z ośrodkami spoza Belgii.

W 2006 zostałam przedstawicielką KU Leuven (*Liaison Scientist*) w FP6 Connective Tissue Tumour Network of Excellence (CONTICANET), *EU network of excellence*, w którym byłam odpowiedzialna za koordynację aktywności dotyczących charakterystyki molekularnej STS. Celem tej części aktywności było zaproponowanie klasyfikacji molekularnej mięsaków, identyfikacja ośrodków referencyjnych rutynowo wykonujących molekularne testy diagnostyczne oraz opracowanie minimalnych rekomendacji/wymagań dotyczących diagnostyki STS z zastosowaniem technik molekularnych. Powstanie sieci ośrodków leczniczo-badawczych zajmujących się STS umożliwiło przeprowadzenie wielu wspólnych projektów, które były możliwe jedynie dzięki zgromadzeniu odpowiedniej liczby właściwie zdiagnozowanych i opisanych przypadków rzadkich STS. Brałam aktywny udział w projektach dotyczących m.in.: roli miRNA w GIST, utraty *PTEN* w GIST opornych na imatynib, amplifikacji *MYC* we wtórnym naczyniomięsaku, aktywacji PDGFRA i receptora dla czynnika wzrostu nabłonka (ang. *epidermal growth factor receptor* – EGFR) jako potencjalnych celów terapeutycznych w mięsaku błony mięśniowej naczyń, niestabilności chromosomowej jako czynnika prognostycznego w maziówczaku złośliwym. Zorganizowana w ramach CONTICANET sieć naukowa umożliwia kontynuowanie współpracy pomiędzy Europejskimi centrami referencyjnymi oraz z ośrodkami spoza Europy, czego wynikiem jest np. ConticaGIST, aplikacja w ramach EU Horizon2020 TRANSCAN-2 na temat badań translacyjnych w rzadkich nowotworach, i in.

Obecnie jednym z najważniejszych kierunków moich zainteresowań badawczych jest zaangażowanie w ustanowienie panelu modeli PDX z mięsaków („XenoSarc”). Platforma ta powstała w 2004, kiedy ustalono pierwsze modele GIST a w 2010 została rozszerzona o inne STS, ze szczególnym uwzględnieniem modeli charakteryzujących się specyficznymi zmianami molekularnymi (np. translokacje chromosomowe, amplifikacje i mutacje punktowe genów). Do tej pory udało się nam opracować 34 modele PDX, z dobrze zachowaną charakterystyką histologiczną i molekularną guza a niektóre z nich były już wykorzystane do oceny aktywności

leków *in vivo*. Poza projektami opisanymi powyżej (punkt 4c autoreferatu), zastosowaliśmy modele GIST do badania inhibitorów białka szoku termicznego 90 (ang. *heat shock protein 90* – HSP90) i deacetylazy histonowej. Nasze modele wykorzystane zostały również do oceny aktywności avaprytinib (BLU-285), inhibitora specyficznie nakierowanego na zmutowaną postać receptora KIT/PDGFR, który wykazał zależny od dawki przeciwnowotworowy efekt w modelach GIST. Modele STS z kolei zostały wykorzystane do analizy aktywności PhAc-ALGP-doksorubicyny, proleku, który wymaga aktywacji metabolicznej do uzyskania w pełni aktywnej formy doksorubicyny. Aktywacja ta zachodzi dzięki aktywności peptydaz obecnych w komórkach nowotworowych lub w komórkach podścieliska.

Moje zainteresowania naukowe są również związane z badaniami translacyjnymi, które nakierowane są na poszukiwanie molekularnych markerów predykcyjnych odpowiedzi na leczenie celowane, które jest testowane w ramach badań klinicznych. Jest to możliwe dzięki ścisłej współpracy z AMO oraz ze sponsorami badań klinicznych np. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*. W ramach badania EORTC 62052 wykazano aktywność erybuliny (Eisai) w STS, jednak efekt terapeutyczny u pacjentów był zróżnicowany. We współpracy prof. Erikiem Wiemerem, *Department of Medical Oncology, Erasmus University Rotterdam* (Holandia), zajmowałam się profilem ekspresji miRNA w zależności od odpowiedzi na leczenie erybuliną. Obecnie prowadzę dalsze badania nad profilem mutacji somatycznych oraz zmian genomowych, przy zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji, wraz z zespołem prof. Diethera Lambrechts'a, *Laboratory for Translational Genetics, VIB-KU Leuven Center for Cancer Biology*. W następnym etapie planujemy zwalidowanie uzyskanych wyników przy pomocy próbek od pacjentów leczonych w badaniu trzeciej fazy, które zostaną nam udostępnione przez Eisai. Ponadto jestem zaangażowana w analizę molekularną guzów, zgromadzonych w ramach badania drugiej fazy EORTC 90101, w której testowano kryzotynib (inhibitor ALK/MET) w sześciu rzadkich typach nowotworów, w tym w czterech mięsakiach, raku nerki i w chłoniaku. Materiał z tych guzów będzie badany przy pomocy panelu technik histopatologicznych i molekularnych, w celu dokładnego ich scharakteryzowania i określenia potencjalnych markerów, związanych z opowieścią na kryzotynib.

Oprócz przedstawionych powyżej kierunków badań, skupiających się na STS, kontynuuję współpracę na temat znaczenia różnych ścieżek sygnalizacyjnych w patogenezie i progresji nowotworów u dzieci z prof. dr hab. Ewą Iżycką-Świeszewską z Zakładu Patologii i Neuropatologii, GUMed. Niedawno również rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. Michałem Markuszewskim z Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMed, z którym planujemy ocenę roli terapii TKI na profil metaboliczny GIST.

Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam **76 prac** (57 prac oryginalnych, 10 opisów przypadków i 9 prac przeglądowych), w 13 z nich byłam pierwszym autorem – siedem z nich stanowi cykl w ramach zaprezentowanego osiągnięcia naukowego. Mój sumaryczny

IF wynosi 313,426, natomiast sumaryczna punktacja **MNiSW/KBN wynosi 1846**. W tym okresie zaprezentowałam **siedem doniesień ustnych** oraz **138 plakatów** na polskich i międzynarodowych konferencjach, w tym 22 jako pierwszy autor. Jestem również współautorką **30 rozdziałów** w monografiach (w tym 15 w języku angielskim).

W tym czasie byłam zaangażowana w 16 projektów, finansowanych przez krajowe i międzynarodowe organizacje, jako kierownik grantu, (główny) wykonawca i/lub koordynator projektu. Dodatkowo byłam/jestem koordynatorem 16 projektów prowadzonych we współpracy z firmami farmaceutycznymi, w których wykorzystujemy platformę „XenoSarc” do badań przedklinicznych. Biorę również udział w trzech badaniach klinicznych, w których jestem odpowiedzialna za gromadzenie materiału biologicznego oraz organizację i prowadzenie badań translacyjnych.

6. Pozostałe osiągnięcia

Osiągnięcia dydaktyczne (szczegółowa lista w załączniku 7)

W latach 1997-2008, w czasie zatrudnienia w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed, prowadziłam zajęcia dydaktyczne w formie wykładów, seminariów i ćwiczeń dla studentów Wydziałów Lekarskiego, Nauk o Zdrowiu i Farmaceutycznego GUMed. Dodatkowo brałam czynny udział w opracowaniu programu nauczania przedmiotu Human Genetics dla anglojęzycznych studentów Wydziału Lekarskiego (*English Division*) i zajmowałam się stroną organizacyjną tych zajęć. Prócz tego byłam zaangażowana w opiekę nad pięciorgiem studentów w czasie ich prac nad projektami magisterskimi. Organizowałam i aktywnie uczestniczyłam w wewnętrznych zebraniach naukowych, brałam udział w spotkaniach towarzystw naukowych (PTOnkol, PTG,...), szkoliłam kolegów spoza Katedry w technikach genetyki molekularnej.

W latach 2009-2014, w Belgii, pracując w LEO prowadziłam seminaria „*Hot Topics in Oncology*”, a od 2013 jestem odpowiedzialna za 5-tygodniowe staże w LEO dla studentów studiów magisterskich kierunku *Biomedical Sciences* (w sumie do tej pory przeprowadzono 15 takich staży). Jednocześnie od 2014 zajmuję się organizacją oraz prowadzeniem *Translational Research Journal Club* dla doktorantów *Doctoral School Biomedical Sciences – Cancer Programme, KU Leuven*. Byłam promotorem ośmiu prac licencjackich, promotorem pomocniczym czterech prac magisterskich oraz siedmiu doktoratów (w tym dwa w trakcie).

Po uzyskaniu stopnia doktora wygłaszałam na zaproszenie wykłady dotyczące biologii molekularnej GIST/STS oraz zastosowania modeli PDX do testowania leków m.in w trakcie *GISTour Venezuela & Mexico “Understanding GIST, improving lives”*; w ramach inicjatywy MOBI4Health Uniwersytetu Gdanskiego i KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący) na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed, w trakcie spotkań

Polskiego Rejestru GIST oraz w ramach regularnych konferencji edukacyjnych „Nowości w leczeniu mięsaków”.

Osiągnięcia organizacyjne

Odbываяc staż podoktorski a obecnie będąc menedżerem naukowym w *Laboratory of Experimental Oncology KU Leuven*, jestem odpowiedzialna za grupę techników, doktorantów i magistrantów (w sumie 8-10 osób), a moim zadaniem jest połączenie praktycznej aktywności w laboratorium z zadaniami organizacji pracy grupy. W trakcie mojej działalności udało mi się uzyskać kilka grantów oraz projektów w ramach współpracy z przemysłem (w sumie ponad 2 mln €). Przy pomocy jednostek administracyjnych KU Leuven, jestem odpowiedzialna za koordynację projektów naukowych, w tym kwestie naukowe, etyczne, administracyjne, finansowe oraz osobowe. Poza tym jestem zaangażowana w trwające i nowe/planowane aktywności w ramach współpracy z innymi ośrodkami naukowymi.

Na co dzień zajmuję się stroną organizacyjną platformy „XenoSarc”, doskonałego narzędzia które stanowi podstawę wielu projektów wykonywanych we współpracy z instytucjami naukowo-badawczymi oraz z przemysłem farmaceutycznym. W ramach tego projektu jestem odpowiedzialna za prezentowanie „XenoSarc” w trakcie spotkań lub telekonferencji z partnerami z firm farmaceutycznych (m.in. Novartis, ImClone, Genentech, Blueprint Medicines, CoBioRes, Exelixis, Plexxikon, Eisai, Pfizer, PharmaMar, Astex, Astellas, Infinity, CoBioRes, Blueprint Medicines, Elly Lilly, Boehringer Ingelheim,...) oraz ze współpracownikami z innych ośrodków akademickich (m.in. dr Anette Duensing, *University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, USA*; prof. Heikki Joensuu, *University of Helsinki, Helsinki, Finlandia*; prof. Brian Rubin, *Cancer Center Cleveland Ohio, Cleveland, USA*,...). Ponadto do moich zadań należy przygotowanie propozycji projektu badawczego wraz z budżetem, terminarzem prac oraz planowanych osiągnięć. W czasie trwania projektu zajmuję się bezpośrednim nadzorem nad grupą osób, wykonujących doświadczenia, biorąc w nich czynny udział oraz jestem odpowiedzialna za sprawozdania z poszczególnych etapów wykonania projektu, dostarczenie raportu końcowego i/lub publikacji naukowej.

Dodatkowo zajmuję się stroną logistyczną prospektywnego banku próbek krwi (*LECTOR blood bank*), w ramach którego zbieramy i przechowujemy osocze, surowicę, germinale DNA oraz RNA z leukocytów krwi od pacjentów z STS. Obecnie również pobierana jest krew w celu izolowania krążącego DNA nowotworowego (ang. *cell-free tumour DNA – cfDNA*), aby używać go do charakteryzowania guza oraz monitorowania choroby/leczenia pacjenta. Bank LECTOR połączona jest z bazą danych na temat pacjentów z STS diagnozowanych i leczonych w Leuven, w której znajdują się szczegółowe dane na temat histopatologii, cech molekularnych oraz przebiegu klinicznego choroby a dzięki współpracy z *Department of Pathology* mamy również dostęp do mrożonego i utrwalonego materiału z guza od tych pacjentów. Dzięki dostępowi to

tego materiału (fragment guza i/lub krew od tych pacjentów), wraz z pełną charakterystyką pato-kliniczną, prowadzę (lub planuję):

- badania nad zastosowaniem cfDNA do monitorowania choroby u pacjentów z GIST, leczonych TKI (w ramach grantu przyznanego przez *Stichting tegen Kanker*, Belgia);
- analizą profilu miRNA jako czynnika predykcyjnego u pacjentów z mięsakiem gładkokomórkowym (projekt finansowany przez Roche Pharma);
- współpracę z prof. Matt van de Rijn i dr Joanną Przybył, *Stanford University School of Medicine*, USA na temat wykorzystania cfDNA jako markera prognostycznego w przypadku pacjentów z mięsakiem gładkokomórkowym;
- zajmuję się analizą surowicy pod kątem oznaczenia białek zaangażowanych w sygnalizację komórkową, proces zapalny oraz angiogenezę oraz ich potencjału do oceny odpowiedzi pacjentów na leczenie kryzotynibem (we współpracy z EORTC).

Niedawno *Laboratory of Experimental Oncology, KU Leuven*, w którym obecnie pracuję, została uznana jako ośrodek referencyjny, odpowiedzialny za przechowywanie materiału biologicznego od pacjentów leczonych w ośrodkach europejskich w ramach badań klinicznych (m.in. EORTC 90101 "CREATE"; EORTC 1317 CABOGIST; EORTC 1506 ANITA). W ramach tych badań koordynuję transfer oraz przechowywanie materiału a ponadto jestem aktywnie zaangażowana w analizowanie tych próbek w ramach badań translacyjnych.

Organizowałam posiedzenia naukowe w ramach CONTICANET (spotkania WP5 w Leuven i w Sopocie oraz doroczna sesja sprawozdawcza konsorcjum) oraz spotkanie w Leuven ekspertów naukowych z USA i Europy, zajmujących się GIST, w ramach inicjatywny *Life Raft Group*, amerykańskiej organizacji pacjentów z GIST. Regularnie biorę udział w spotkaniach EORTC *Soft Tissue and Bone Sarcoma Group*, wewnętrznych seminariach organizowanych przed *Department of Oncology, KU Leuven* oraz *Leuven Cancer Institute*, spotkaniach dydaktycznych dla klinicystów i rezydentów z *Department of General Medical Oncology, University Hospitals Leuven*, gdzie prezentuję osiągnięcia naukowe swoje i grupy, zdaję sprawozdanie ze wspólnych projektów oraz dyskutuję nowe projekty w ramach współpracy naukowej. Jestem odpowiedzialna za kontakt z organizacjami pacjentów (*Life Raft Group* and *Bart Verbeek Research Fund for Sarcoma*, Belgia), które wspierają finansowo nasze badania naukowe.

W latach 2001-2008 byłam członkiem Polskiego Towarzystwa Genetyki, obecnie jestem członkiem *American Association for Cancer Research* (AACR, od 2009), EORTC (od 2009), *American Society of Clinical Oncology* (ASCO, od 2012) oraz *Connective Tissue Oncology Society* (CTOS, od 2016). Jestem członkiem rady naukowej *Polish Annals of Medicine* (od 2014) i *Oncology in Clinical Practice* (od 2017). Recenzowałam projekty naukowe dla Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, *Liddy Shriver Sarcoma Initiative* oraz EORTC jako wybieralny członek *Translational Research Advisory Committee TRAC* (w latach 2009-2012). Byłam również recenzentem publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych i krajowych m.in. *Polish Journal of Pathology*, *Annals of Oncology*, *British Journal of Pharmacology*, *BMC*

Genomics, European Journal of Cancer, PLOS ONE, Polish Annals of Medicine. Ukończyłam kursy dotyczące statystyki, analiz danych molekularnych i bioinformatycznych, mam certyfikat kategorii B FELASA, pozwalający samodzielnie przeprowadzać eksperymenty na zwierzętach. Brałam udział w szkoleniach na temat zarządzania projektami naukowymi, przygotowywaniem grantów oraz dotyczących badań klinicznych (m.in. na temat dobrej praktyki klinicznej, niezależnego monitoringu badań klinicznych, metod statystycznych itd).

Jestem diagnostą laboratoryjnym (od 2003) a w roku 2006 uzyskałam specjalizację z diagnostyki laboratoryjnej, specjalność: genetyka kliniczna. Należę do Gdańskiej Okręgowej Izby Aptekarskiej i Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. W latach 1997-2008 pracowałam w Aptece Św. Heleny w Gdyni gdzie najpierw odbyłam staż apteczny w niepełnym wymiarze godzin, a następnie pracowałam na umowę-zlecenie oraz w Aptece Dyżurnej w Gdyni, pełniąc dyżury nocne, weekendowe i świąteczne. W latach 1993-1999 jako wolontariusz byłam członkiem Grupy Ratownictwa Specjalnego i Medycznego Polskiego Czerwonego Krzyża pełniąc rolę w medycznym zabezpieczeniu imprez masowych, biorąc udział w pozorowaniu wypadków masowych i szkoleniu zintegrowanego systemu ratownictwa (z udziałem Pogotowia Ratunkowego, Policji i Straży Pożarnej), w przygotowywaniu filmów szkoleniowych, oraz w organizowaniu kursów pierwszej pomocy dla Ochotniczej Straży Pożarnej, uczniów i studentów.