

## Autoreferat

Zmiany genetyczne, epigenetyczne i czynniki powiązane z rozwojem  
nowotworów głowy i szyi

Dr n. med. Katarzyna Kiwerska

Instytut Genetyki Człowieka

Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 2022 rok

## 1. IMIĘ I NAZWISKO

Dr n. med. Katarzyna Kiwerska (nazwisko panieńskie Szukała)

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

Magister inżynier biotechnologii

Akademia Rolnicza w Poznaniu, 2000 rok

Tytuł pracy magisterskiej: „Analiza spontanicznych mikrojąder u osób ze stwierdzonymi aberracjami chromosomowymi metodami klasycznej i molekularnej cytogenetyki”.

Praca magisterska wykonana została w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

Promotor: dr Mariola Zawada

Doktor nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, 2010 rok

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza utraty heterozygotyczności w regionach występowania przeciwnowotworowych genów supresorowych w raku krtani”

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter

## 3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.

2000 r. – 2003 r.	Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk Stanowisko: biolog
2003 r. – 2010 r.	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk Stanowisko: biolog
2010 r. – 2019 r.	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk Stanowisko: adiunkt
2016 r. – obecnie	Zakład Patologii Nowotworów Wielkopolskie Centrum Onkologii Stanowisko: kierownik Pracowni Biologii Molekularnej
2019 r. – obecnie	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk Stanowisko: asystent

W latach 2007/2008 i 2010 miałam 16 miesięczną przerwę w pracy z powodu urodzenia dzieci.

## 4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.). OMÓWIENIE TO WINNO DOTYCZYĆ MERYTORYCZNEGO UJĘCIA PRZEDMIOTOWYCH OSIĄGNIĘĆ, JAK I W SPOSÓB PRECYZYJNY OKREŚLAĆ INDYWIDUALNY WKŁAD W ICH POWSTANIE, W PRZYPADKU, GDY DANE OSIĄGNIĘCIE JEST DZIEŁEM WSPÓŁAUTORSKIM, Z UWZGLĘDNIENIEM MOŻLIWOŚCI WSKAZYWANIA DOROBKU Z OKRESU CAŁEJ KARIERY ZAWODOWEJ.

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach w latach 2017-2022. Łączna wartość współczynnika Impact Factor (IF) tych prac wynosi 18,768 oraz 480 punktów ministerialnych (Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW/Ministerstwa Edukacji i Nauki, MEiN). Wszystkie publikacje dotyczą zmian genetycznych, epigenetycznych i czynników powiązanych z rozwojem nowotworów głowy i szyi. W czterech pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego jestem pierwszym i korespondującym autorem. W jednej publikacji jestem drugim autorem.

**P1. Kiwerska K\***, Szaumkessel M, Paczkowska J, Bodnar M, Byzia E, Kowal E, Kostrzewska-Poczekaj M, Janiszewska J, Bednarek K, Jarmuż-Szymczak M, Kalinowicz E, Wierzbicka M, Grenman R, Szyfter K, Marszałek A, Giefing M. *Combined deletion and DNA methylation result in silencing of FAM107A gene in laryngeal tumors*. Sci Rep. 2017 Jul 14;7(1):5386. DOI: 10.1038/s41598-017-05857-1.

IF<sub>2017</sub> – 4.122

MNiSz<sub>2017</sub> – 40

**P2. Kiwerska K\***, Jozefiak A, Markowska J, Kedzia W, Jackowska J, Wierzbicka M. *Oral-genital human papillomavirus infection in Polish couples: frequent detection of HPV 42*. BMC Infect Dis. 2019 Feb 6;19(1):122. DOI: 10.1186/s12879-018-3645-0.

IF<sub>2019</sub> – 2.688

MNiSzW<sub>2019</sub> - 100

**P3. Brauze D, Kiwerska K**, Bednarek K, Grenman R, Janiszewska J, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. *Expression of Serpin Peptidase Inhibitor B2 (SERPINB2) is regulated by Aryl hydrocarbon receptor (AhR)*. Chem Biol Interact. 2019 Aug 25;309:108700. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.06.013

IF<sub>2019</sub> – 3.723

MNiSzW<sub>2019</sub> - 100

**P4. Kiwerska K\***, Szyfter K. *DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy-a double-edged sword*. J Appl Genet. 2019 Nov;60(3-4):329-334. DOI: 10.1007/s13353-019-00516-9

IF<sub>2019</sub> - 2.027

MNiSzW<sub>2019</sub> – 100

**P5. Kiwerska K\***, Kowal-Wisniewska E, Ustaszewski A, Bartkowiak E, Jarmuz-Szymczak M, Wierzbicka M, Giefing M. *Global DNA methylation profiling reveals differentially methylated CpGs between salivary gland pleomorphic adenomas with distinct clinical course*. Int J Mol Sci. 2022 May 25;23(11):5962. DOI: 10.3390/ijms23115962.

IF<sub>2022</sub> – 6.208

MEiN<sub>2022</sub> – 140

\* Autor korespondujący

Szczegółowy opis mojego wkładu w powstanie każdej z wyżej wymienionych prac jest zawarty w załączniku nr 4. Ponadto opis udziału współautorów publikacji oraz mój jest zawarty w oświadczeniach zebranych w załączniku nr 6.

## Wprowadzenie

Od momentu podjęcia pracy naukowej w obecnym Zakładzie Genetyki Nowotworów IGCz PAN moje zainteresowania badawcze koncentrują się wokół tematyki związanej z szeroko pojętym podłożem genetycznym oraz etiologią chorób nowotworowych zlokalizowanych w obrębie głowy i szyi (HNC - ang. *Head and Neck Cancer*). Do miejsc anatomicznych, w których rozwijają się te nowotwory zaliczane są przede wszystkim: jama ustna, język, migdałki, podniebienie, gardło, krtań, jama nosowa, zatoki oboczne nosa, gruczoły ślinowe [1]. Histologicznie większość (ponad 90%) nowotworów rozwijających się w tych regionach to guzy płaskonabłonkowe (HNSCC – ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*), choć wykrywa się również chłoniaki i mięsaki [1,2]. Według danych epidemiologicznych do najczęściej wykrywanych nowotworów głowy i szyi na świecie należą te zlokalizowane w obrębie ust i jamy ustnej. W 2020 roku na świecie stwierdzono prawie 378 tys. nowych przypadków w tej lokalizacji anatomicznej, co stanowiło 2% wszystkich nowo stwierdzonych nowotworów. W tym samym roku z powodu tej choroby zmarło prawie 178 tys. osób (1.8% wszystkich zgonów) [3]. W populacji polskiej do najczęściej wykrywanych nowotworów głowy i szyi należą nowotwory krtani – w 2019 roku wykryto 1688 nowych przypadków u mężczyzn oraz 265 u kobiet [4]. Inne, często diagnozowane guzy w obrębie głowy i szyi to guzy języka, migdałka oraz gardła [4]. Uwagę zwraca fakt, że w Polsce na przestrzeni ostatnich lat spada odsetek mężczyzn chorujących na raka krtani, przy względnie stałym poziomie zachorowalności kobiet, natomiast obserwuje się stale rosnący trend zapadalności na nowotwory złośliwe w obrębie jamy ustnej i gardła u obu płci [4,5]. Światowe, jak i lokalne trendy są ściśle powiązane z czynnikami etiologicznymi leżącymi u podstaw powstawania tych nowotworów. W przypadku nowotworów krtani głównymi czynnikami sprawczymi są kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym a ich niekorzystne działanie jest potęgowane nadmiernym spożywaniem wysokoprocentowych alkoholi [2,6]. Podobnie jest w przypadku znacznej części nowotworów zlokalizowanych w jamie ustnej i gardle. Inne czynniki wysokiego ryzyka w naszym obszarze geograficznym są przede wszystkim związane z powszechnym zanieczyszczeniem środowiska. Istnieje natomiast pewna grupa nowotworów, zlokalizowanych w ustnej części gardła i jamie ustnej w których do rozwoju nowotworu dochodzi w efekcie infekcji ludzkim wirusem brodawczaka HPV (ang. *Human Papillomavirus*) [7].

W dymie tytoniowym zawartych jest ponad 4000 toksycznych substancji chemicznych [8]. Około 60 z nich ma udokumentowane działanie mutagenne a najbardziej toksyczne są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH - ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), ale także aminy aromatyczne, N-nitrozoaminy oraz reaktywne formy tlenu [2]. W efekcie działania czynników mutagennych w komórkach dochodzi do uszkodzeń i zmian w sekwencji DNA, powstają m.in. jednoniciowe przerwy DNA i addukty kancerogen:DNA. W organizmie kancerogeny ulegają aktywacji metabolicznej a następnie są usuwane z komórek i z organizmu [2,8]. Aktywacja metaboliczna może mieć skutki uboczne - aktywowany, ale nie usunięty na czas kancerogen reaguje z DNA [8]. W badaniach, w których brałam udział badaliśmy rolę receptora węglowodorów arylowych AhR (ang. *Aryl Hydrocarbon Receptor*) - aktywowanego ligandem czynnika transkrypcyjnego - w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w proces aktywacji i detoksykacji kancerogenów. Wykazaliśmy, iż po indukcji ligandem ( $\beta$ -naftoflawonem) występują znaczne różnice w ekspresji genów zaangażowanych w proces metabolizmu ksenobiotyków pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi raka krtani (LSCC – ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*) [9]. Co więcej, w kolejnych badaniach wykazaliśmy, iż AhR uczestniczy również w indukcji genów zaangażowanych w inne procesy w komórce, np. związanych z regulacją apoptozy lub zaangażowanych w proliferację a także pośredniczy w wyciszaniu genów związanych z adhezją komórek [10]. Tym samym wskazaliśmy, iż receptor AhR może być zaangażowany nie tylko w inicjację, ale również w progresję procesu nowotworowego. Publikacja dotycząca roli receptora AhR w regulacji ekspresji jednego z tych genów (*SERPIN2*) w raku krtani została włączona do cyklu habilitacyjnego (P3).

Zwykle, systemy naprawcze w komórkach są w stanie przywrócić fizjologiczny stan. Jeśli jednak kumulacja uszkodzeń nici DNA jest zbyt duża lub zmiany sekwencji występują w genach

odpowiadających za naprawę DNA wtedy mechanizmy naprawcze mogą działać mniej wydajnie lub wcale. Znaczenie w tym procesie ma również indywidualna podatność danego organizmu na działanie kancerogenów. Nagromadzone uszkodzenia w genomie mogą spowodować niekontrolowany wzrost komórek a tym samym zapoczątkować kancerogenezę. Praca przeglądowa, w której opisuję konsekwencje różnej wydajności naprawy DNA w odniesieniu do inicjacji i progresji nowotworów, a także do skuteczności terapii została włączona do cyklu habilitacyjnego (P4). Z kolei w pracach eksperymentalnych, w które byłam zaangażowana wykazaliśmy, iż wariant rs1801320 w genie naprawy *RAD51* w populacji polskiej jest związany z ryzykiem rozwoju raka krtani u pijących i palących pacjentów [11].

Nowotwory głowy i szyi, które rozwijają się na podłożu kancerogenezy chemicznej są niezwykle heterogenne genetycznie, cechuje je mnogość zmian genetycznych, epigenetycznych i aberracji chromosomowych. Akumulacja zmian następuje w czasie, wraz z rozwojem guza, co zobrazował w 1996 roku Joseph Califano w swoim modelu progresji HNSCC. Wskazał on główne zmiany (najczęściej utraty materiału genetycznego) w przejściu od hiperplazji nabłonka do raka inwazyjnego [12]. Zaznaczył, iż akumulacja a niekoniecznie kolejność pojawiających się zmian wyznacza progresję guza. Rozpoczynając bezpośrednio po studiach swoją pracę w Zespole Mutagenyzy brałam czynny udział w prowadzeniu hodowli guzów krtani a także w późniejszym czasie ustabilizowanych linii komórkowych LSCC pozyskanych w ramach wieloletniej współpracy z prof. Reidarem Grenmanem (Klinika Otorynologologii-Chirurgii Głowy i Szyi, Uniwersytet w Turku i Szpital Uniwersytecki w Turku, Finlandia). Dzięki mojemu zaangażowaniu w ustalanie kariotypów poszczególnych linii komórkowych wyprowadzonych z guzów różniących się stopniem zaawansowania klinicznego mogłam przekonać się jak złożone genetycznie są to guzy. Utraty, które Califano przypisał wczesnym etapom rozwoju HNSCC, dotyczyły miejsc lokalizacji znanych genów supresorowych: 9p21 (*p16* (obecnie *CDKN2A*)) czy 17p13 (*TP53*). Wprowadzenie do laboratoriów wysokoprzepustowych technik umożliwiających całogenomowe profilowanie zmian genetycznych, znacząco przyspieszyło postęp w identyfikacji zmian związanych z HNSCC. Uzyskane wyniki potwierdziły, że oba wspomniane geny supresorowe znajdowały się wśród najczęściej zmutowanych genów [13]. Co ciekawe, kancerogeneza HNSCC jest przede wszystkim związana z uszkodzeniem genów supresorowych, w odróżnieniu od innych nowotworów, w których zwykle aktywacja onkogenów przyspiesza ten proces [6]. Z kolei do najczęściej zmutowanych onkogenów należy gen *PIK3CA*, wchodzący w skład ścieżki sygnałowej PI3K-AKT-mTOR [6,13]. Konsekwencją mutacji, amplifikacji lub utraty funkcji w genach wchodzących w skład różnych ścieżek sygnałowych w patogenezie HNSCC jest deregulacja ważnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja czy apoptoza a dalszym skutkiem inwazja komórek nowotworowych, angiogeneza i tworzenie przerzutów. Jednym z takich genów jest receptor nabłonkowego czynnika wzrostu *EGFR* (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*), który ulega nadekspresji w wielu nowotworach, w tym HNSCC. Zarówno nadekspresja białka EGFR, jak i zwiększona liczba kopii tego genu przekłada się na niekorzystne prognozy dla pacjentów z HNSCC [14]. Białko kodowane przez ten gen jako pierwsze stało się celem leczenia ukierunkowanego molekularnie w HNSCC (*Cetuxymab* - przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko EGFR).

W Zakładzie Genetyki Nowotworów od kilkunastu lat działamy w nurcie badań nakierowanych na identyfikację nowych zmian związanych z patogenezą HNSCC z wykorzystaniem technik całogenomowych. Jeszcze w latach dwutysięcznych w ramach trwającej do dziś współpracy obecnego kierownika Zakładu prof. Macieja Giefinga z prof. Reinerem Siebertem (Instytut Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Kilonii) i dzięki finansowemu wsparciu Wielkopolskiego Centrum Badań Przyrodniczych i Medycznych wykonano dwie całogenomowe analizy liczby kopii array CGH (Agilent Human Genome CGH 44K oraz 244A) w 13 liniach komórkowych LSCC. Mniej więcej w tym samym czasie w ramach grantu badawczego uzyskanego przez dr Małgorzatę Jarmuż, w którym byłam wykonawcą wykonano całogenomowe profilowanie ekspresji w 10 liniach komórkowych LSCC oraz w trzech nienowotworowych kontrolach (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Mając na uwadze heterogenność guzów HNSCC należy podkreślić, że do badań tych celowo wybrane

zostały tylko linie komórkowe wyprowadzone z nowotworów krtani, tak aby uzyskać profil zmian charakterystycznych dla tego miejsca anatomicznego. Dzięki temu podejściu w kolejnych latach zidentyfikowaliśmy szereg genów o potencjalnym znaczeniu supresorowym lub onkogennym w przebiegu raka krtani. Opis tych badań oraz uzyskane wyniki przedstawione są w punkcie 5. Autoreferatu. Jedną z prac, opisującą udział genu *FAM107A* w płaskonabłonkowym raku krtani została włączona do cyklu habilitacyjnego (P1). W tym miejscu należy podkreślić, iż od wielu lat jestem odpowiedzialna za bankowanie materiału (tkanki, krew) pochodzącego od pacjentów operowanych z powodu nowotworu w regionie głowy i szyi oraz przechowywanie danych klinicznych i histopatologicznych. Dzięki temu, wyniki macierzone pochodzące z linii komórkowych LSCC weryfikowane są również w materiale pierwotnym, co istotnie podnosi ich znaczenie w kontekście ewentualnego przełożenia na zastosowania kliniczne. Znaczenie uzyskanych wyników zostało docenione przez Wydział Nauk Medycznych PAN, który w 2019r. nagrodił mnie oraz moich współpracowników nagrodą zespołową za cykl 5 prac dotyczących utraty genów supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani.

Wydaje się, iż wzrost świadomości społeczeństwa odnośnie ryzyka związanego z paleniem papierosów doprowadził w ostatnich latach do spadku liczby palaczy wśród mężczyzn, czyli tej części społeczeństwa, która znacząco częściej sięgała po tytoń. Nadal jednak to sześć razy więcej mężczyzn niż kobiet rozwija corocznie w Polsce HNSCC. Jest to spowodowane różnymi czynnikami. Przykładowo, w przypadku nowotworów krtani pierwsze objawy tej choroby są niespecyficzne - to chrypka, podrażnienie, ból przy przełykaniu. Z uwagi na lokalizację krtani a tym samym brak możliwości samokontroli nowotwory te wykrywane są przeważnie w wysokim stadium zaawansowania, co zdecydowanie zmniejsza szanse na ich skuteczne leczenie. Po drugie w momencie wykrycia HNSCC połowa chorych ma już przerzuty do węzłów chłonnych, co dalej wpływa niekorzystnie na ich rokowania [15,16]. W 2019 roku z powodu raka krtani zmarło w Polsce 1267 mężczyzn i 191 kobiet. Leczeniem z wyboru u pacjentów z HNSCC jest resekcja chirurgiczna wraz z uzupełniającą radioterapią (RT) lub radiochemioterapią (RChT) - w zależności od lokalizacji guza i stopnia jego zaawansowania [6,17]. Leczenie celowane oparte o przeciwciała monoklonalne lub inhibitory kinaz stosowane z powodzeniem w leczeniu takich nowotworów jak rak jelita grubego, czerniak, guzy podścieliska przewodu pokarmowego nie ma na chwilę tak szerokiego zastosowania w nowotworach głowy i szyi. Aktualnie w Polsce stosuje się wspomniany już *Cetuxymab* (p/EGFR) oraz *Pembrolizumab* i *Niwolumab* - przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi PD-1 (ang. *Programmed Death 1*), gdy choroba jest zaawansowana (wystąpił jej nawrót lub pojawiły się przerzuty) lub wystąpiła oporność na chemioterapię. Stąd pomimo rozwoju diagnostyki i metod leczenia, nadal istnieje potrzeba identyfikacji nieprawidłowości leżących u podłoża rozwoju raków głowy i szyi, mechanizmów tych zmian i czynników na nie wpływających a także nowych biomarkerów, które mogą być użyte do diagnostyki na wczesnym etapie. W ostatnim czasie uczestniczyłam w realizacji projektu NCBiR (nr rej - POIR.04.01.04-00-0003/17-00) dotyczącego „płynnej biopsji” w rakach HNSCC – mało inwazyjnej techniki, której diagnostyczna użyteczność jest udowodniona [18]. Wyniki przez nas uzyskane (manuskrypt w przygotowaniu) potwierdzają jej przydatność w: (I) diagnozowaniu choroby oraz w (II) monitorowaniu choroby w kierunku wznowy.

Przedmiotem moich zainteresowań badawczych są również te nowotwory HNSCC, które w znaczącej części przypadków mają inne niż ekspozycja na kancerogeny podłoża etiologiczne, to jest raki okolicy ustnej części gardła (OPSCC - ang. *Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*) i migdałków, wywoływane przez wirusy HPV przenoszone głównie drogą płciową [19]. HPV to grupa małych, dwuniciowych wirusów DNA należących do rodziny *Papillomaviridae*. Dotąd zidentyfikowano ponad 200 różnych typów HPV, spośród których część ma udokumentowaną rolę onkogeną (HR, ang. *High Risk*) a część odpowiada za wywoływanie łagodnych brodawek skórnych (LR – ang. *Low Risk*) [20]. Pierwotnie, infekcja wirusem HPV została zidentyfikowana jako czynnik etiologiczny w raku szyjki macicy, natomiast w późniejszych latach udokumentowano jego rolę w rozwoju nowotworów gardła środkowego i migdałków [21, 22]. Dane epidemiologiczne wskazują, iż ok. 30% raków ustnej części

gardła powstaje w wyniku infekcji tym wirusem [7]. Najczęstsze typy wirusa obserwowane w rakach OPSCC to HPV 16 i 18 [17]. Badania realizowane w trakcie pracy magisterskiej przez studentkę Katarzynę Sobiech pod moim kierownictwem wykazały obecność HPV 16 w 10/55 badanych próbek guzów jamy ustnej (18% - lokalizacja migdałek podniebienny), natomiast nie stwierdzono tego typu wirusa w żadnej z 65 analizowanych próbek pochodzących z guzów krtani, co potwierdziło iż czynnik ten ma marginalne znaczenie w nowotworach krtani [23]. W odróżnieniu od tych nowotworów HNSCC, które są wywołane kancerogenami chemicznymi, w nowotworach HPV zależnych nie obserwuje się nagromadzenia zmian genetycznych. Do utraty kontroli nad proliferacją komórek dochodzi wskutek oddziaływania onkogennych białek wirusowych E6 i E7 z białkami cyklu komórkowego: TP53 i RB1, w wyniku czego ich przeciwnowotworowa funkcja zostaje zniesiona [5]. W następstwie zaburzenia funkcji RB1 dochodzi do wzmożonej ekspresji białka P16, co jest wykorzystywane w diagnostyce OPSCC jako potwierdzenie wirusowego podłoża tych nowotworów [6]. Należy wspomnieć, że różnice pomiędzy guzami HNSCC HPV (-) a HPV (+) obejmują również leczenie i rokowania dla pacjentów: chorzy z nowotworem HPV-zależnym lepiej odpowiadają na leczenie radioterapią oraz mają dłuższy czas przeżycia [5-6,23]. Mając na uwadze, iż zakażenie HPV jest obecnie uważane za najbardziej powszechną chorobę przenoszoną drogą płciową w kolejnej pracy włączonej do cyklu habilitacyjnego (P2) sprawdzono rozkład genotypów wirusa HPV u polskich par w kontekście ryzyka rozwoju raka w obrębie głowy i szyi.

W ostatnich latach nastąpił wzmożony wzrost liczby nowotworów diagnozowanych w obrębie gruczołów ślinowych. Są to obserwacje głównie kliniczne (nieraportowane w statystykach światowych), z uwagi na fakt, że większość z nich to guzy łagodne, niezłośliwiejące. Ślinianki to gruczoły wydzielnicze odpowiedzialne za produkcję i wydzielanie śliny. Występują w postaci trzech par dużych gruczołów ślinowych (przyusznych, podżuchwowych i podjęzykowych) oraz kilkuset małych gruczołów ślinowych rozproszonych po całej jamie ustnej. Przyczyny powstawania tych guzów pozostają nieznane, choć postuluje się iż czynnikami sprawczymi mogą być czynniki środowiskowe, promieniowanie, pole magnetyczne, wirusy czy używanie telefonów komórkowych [24]. Obserwowane nowotwory łagodne lokalizują się przede wszystkim w dużych gruczołach ślinowych - głównie w przyusznych. Z kolei w małych gruczołach ślinowych wykrywane są głównie nowotwory złośliwe [24,25]. Wśród najczęściej wykrywanych guzów łagodnych znajdują się gruczolaki wielopostaciowe (PA – ang. *Pleomorphic Adenoma*). Współpracujący zespół klinicystów z poznańskiej Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej pod kierownictwem prof. Małgorzaty Wierzbickiej wykazał, że część z tych guzów ma odmienny przebieg kliniczny, charakteryzujący się m.in. krótkim czasem objawów, szybszym wzrostem w krótkim czasie i odmiennym obrazem w badaniach radiologicznych [25]. Zagadnienie jest interesujące, również z uwagi na fakt, że podłoże genetyczne tych guzów jest słabo poznane. W 2018 roku uzyskałam grant badawczy Miniatura-2 (nr 2018/02/X/NZ5/00365), w ramach którego możliwe było wykonanie całogenomowej analizy ekspresji oraz metylacji ośmiu guzów PA (w tym wolno rosnących oraz szybko rosnących). Wyniki dotyczące biomarkerów metylacyjnych różnicujących guzy ślinianek o odmiennym przebiegu klinicznym zostały opisane w publikacji włączonej do cyklu habilitacyjnego (P5). W 2022r. zestaw danych genomicznych został wzbogacony o analizę eksomów, stanowiąc punkt wyjścia do dalszych badań, w które jestem zaangażowana jako główny badacz.

### **Cel naukowy cyklu prac**

Głównym celem podjętych przeze mnie badań była identyfikacja zmian genetycznych i epigenetycznych oraz czynników, które mają wpływ na rozwój nowotworu w obrębie głowy i szyi.

Cel ten został osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

- ustalenie znaczenia genu *FAM107A* w płaskonabłonkowym raku krtani,
- analizę rozkładu genotypów wirusa HPV u polskich par w kontekście ryzyka rozwoju nowotworów ustnej części gardła,
- ustalenie wpływu receptora *Ah* na ekspresję genu *SERPINB2* w nowotworach krtani,

- identyfikację markerów metylacyjnych różnicujących gruczolaki wielopostaciowe ślinianek o odmiennym przebiegu klinicznym.

### Omówienie prac wchodzących w skład cyklu

**P1. Kiwerska K, Szaumkessel M, Paczkowska J, Bodnar M, Byzia E, Kowal E, Kostrzewska-Poczekaj M, Janiszewska J, Bednarek K, Jarmuż-Szymczak M, Kalinowicz E, Wierzbicka M, Grenman R, Szyfter K, Marszałek A, Giefing M.** *Combined deletion and DNA methylation result in silencing of FAM107A gene in laryngeal tumors.* Sci Rep. 2017 Jul 14;7(1):5386. DOI: 10.1038/s41598-017-05857-1.

Jednym z nurtów badawczych, który podejmuję w swoich badaniach jest poszukiwanie genów powiązanych z rozwojem płaskonabłonkowych raków krtani LSCC. Punktem wyjścia do eksperymentów wykonanych w niniejszej publikacji były dane z macierzy ekspresyjnej Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0. Z wykorzystaniem danych macierzowych zidentyfikowałam dwa tagi (oligonukleotydy na macierzy) korespondujące do sekwencji genu *FAM107A* (3p14.3), których ekspresja była istotnie obniżona zarówno w liniach komórkowych wyprowadzonych z LSCC, jak i w guzach pierwotnych krtani w porównaniu do nienowotworowych kontroli. Dla tagu 209074\_s\_at zaobserwowano ponad 48-krotny ( $p=0.004$ ) i ponad 13-krotny ( $p=0.036$ ) spadek ekspresji odpowiednio w liniach komórkowych i guzach pierwotnych LSCC w porównaniu do zdrowych kontroli. Natomiast dla tagu 207547\_s\_at zaobserwowano 10-krotny ( $p=0.004$ ) i ponad 8-krotny ( $p=0.036$ ) spadek ekspresji porównując te same zestawy próbek. Delecje homozygotyczne dla regionu obejmującego gen *FAM107A* zostały wykluczone we wcześniejszych badaniach Zespołu [26]. Natomiast dzięki wykorzystaniu danych pochodzących z macierzy array CGH (Agilent Human Genome CGH 244A oraz 44K) zaobserwowano delecje krótkiego ramienia chromosomu 3 skutkujące utratą jednej kopii tego genu. Wyniki ekspresji uzyskane z analiz macierzowych zostały następnie zweryfikowane z wykorzystaniem reakcji duplex RT-PCR, w obecności genu referencyjnego *GAPDH*. Potwierdzono brak ekspresji genu *FAM107A* w 15/15 (100%) liniach LSCC oraz w 21/21 (100%) pierwotnych guzach krtani, przy zachowanej ekspresji genu *GAPDH*. Natomiast we wszystkich próbkach kontrolnych (9/9; 100%) potwierdzono obecność ekspresji genu *FAM107A*, przy zachowanej ekspresji genu *GAPDH*. Z wykorzystaniem barwienia immunohistochemicznego potwierdzono również brak ekspresji białka *FAM107A* w 15/15 analizowanych guzów krtani (100%) guzach, podczas gdy jego ekspresję jądrowo-cytoplazmatyczną stwierdzono w 5/5 (100%) badanych kontroli nienowotworowych.

Uzyskane wyniki zachęciły mnie do poszukiwania mechanizmu innego niż delecje, odpowiadającego za inaktywację genu *FAM107A*. W tym celu zsekwencjonowane zostały eksony kodujące oraz miejsca splicingowe tego genu w 15 liniach komórkowych. Jednak żadne istotne warianty inaktywujące nie zostały wykryte. Dlatego w kolejnym kroku przeprowadzona została analiza metylacji DNA w regionie promotorowym genu *FAM107A* z wykorzystaniem pirosekwencjonowania po konwersji wodorosiarczynem sodu. Przeanalizowano 15 linii komórkowych LSCC, 21 guzów pierwotnych LSCC oraz 8 nienowotworowych kontroli. Analiza wyników potwierdziła znaczące różnice w poziomach metylacji DNA pomiędzy próbkami nowotworowymi (linie LSCC i guzy pierwotne) a kontrolami. Stwierdzono hipermetylację w genie *FAM107A* w 9/15 linii LSCC (60%;  $p<0.0001$ ) oraz w 15/21 guzów pierwotnych krtani (71%;  $p<0.0001$ ). W kolejnym etapie wykonano demetylację linii komórkowej UT-SCC-29, która wykazywała najwyższy poziom metylacji spośród analizowanych próbek. W tym celu zastosowano decytabinę (DAC – ang. *Decitabine*) jako odczynnik hipometylujący a następnie zweryfikowano zarówno metylację DNA, jak i ekspresję genu *FAM107A*. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń po zastosowaniu DAC w dwóch stężeniach (0.1  $\mu\text{M}$  i 0.3  $\mu\text{M}$ ) stwierdzono obniżenie poziomu metylacji odpowiednio o 56% i 49%. Potwierdzono również, iż w wyniku demetylacji została przywrócona ekspresja genu *FAM107A* bez względu na zastosowane stężenie DAC.



Uzyskane wyniki wskazują, iż gen *FAM107A* jest deregulowany w płaskonabłonkowych rakach krtani a inaktywacja tego genu najczęściej następuje w wyniku kombinacji różnych mechanizmów, głównie delecji i metylacji DNA. Należy podkreślić, iż badania te są pierwszymi w piśmiennictwie, w których wskazano na udział genu *FAM107A* w przebiegu nowotworów krtani.

**P2. Kiwerska K, Jozefiak A, Markowska J, Kedzia W, Jackowska J, Wierzbicka M. Oral-genital human papillomavirus infection in Polish couples: frequent detection of HPV 42. BMC Infect Dis. 2019 Feb 6;19(1):122. DOI: 10.1186/s12879-018-3645-0.**

Kolejny aspekt moich badań dotyczy powiązania występowania nowotworów głowy i szyi HNSCC z infekcją ludzkim wirusem brodawczaka HPV. Wirus HPV jest znanym od wielu lat czynnikiem odpowiadającym za rozwój złośliwych nowotworów szyjki macicy u kobiet [22]. Jego transmisja następuje przede wszystkim drogą płciową, a w związku z pewnymi zachowaniami seksualnymi (m.in. duża liczba partnerów seksualnych w trakcie życia, częste kontakty oralne) ma również znaczenie w rozwoju płaskonabłonkowych nowotworów ustnej części gardła OPSCC [19,22]. Pomimo spadku liczby zachorowań na nowotwory szyjki macicy w Polsce (kampanie społeczne, programy przesiewowe) równolegle obserwuje się wzrost zachorowań na OPSCC, które są wywołane infekcją HPV. Genotypowanie HPV jest dobrą metodą przesiewową w badaniu wymazów pobranych z wybranych regionów anatomicznych.

W przedstawionych badaniach prześledzono rozkład genotypów wirusa HPV wśród 197 polskich par, u których kobieta miała zdiagnozowany stan patologiczny szyjki macicy w postaci raka (n=71) lub dysplazji (CIN I-II - ang. *Cervical Intraepithelial Neoplasia*; n=126) a stany te powiązane były z infekcją HPV (197/197; 100%). Prowadzone badania miały na celu ustalenie dominujących typów HPV u polskich par w okolicy genitalnej i ustnej części gardła, które przenoszone drogą płciową mogą wpływać na ryzyko rozwoju nowotworu w obrębie gardła środkowego.

Zgromadzono materiał do badań w postaci wymazów z kanału szyjki macicy, jej części pochwowej, ze strefy transformacji u kobiet z CIN I-II lub ze sklepienia pochwy u kobiet po zabiegu usunięcia macicy. Od każdego z partnerów pobrano wymaz spod napletka. Od wszystkich osób pobrano również wymazy z ustnej części gardła. Przeprowadzono reakcje genotypowania techniką PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem zestawu umożliwiającego jednoczesną detekcję 28 typów HPV, w tym 19 typów wysokiego ryzyka HR (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) oraz 9 typów niskiego ryzyka LR (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70). Jak już wspomniano u wszystkich badanych kobiet (197/197) wykryto infekcję wirusem HPV w wymazie ginekologicznym. U 114/197 (57.9%) mężczyzn wykryto infekcję HPV w wymazie z napletka. W wymazach pobranych od par z gardła środkowego stwierdzono obecność HPV u 39/197 (19.8%) kobiet i u 56/197 (28.4%) mężczyzn. Do najczęściej wykrywanych typów HPV należały zarówno typy HR, jak i LR. W wymazach pobranych z dróg płciowych najczęściej wykrywano HPV 16/31/42/39/54 u kobiet oraz HPV 66/42/16/31/53 u mężczyzn. Z kolei w wymazach pobranych z gardła dominowały HPV 6/39/42/35/16 u kobiet oraz HPV 39/6/42/40/33 u mężczyzn. Obecność HPV wysokiego ryzyka we wszystkich typach wymazów może świadczyć o ryzyku wystąpienia nowotworu (jeśli dotąd nie wystąpił) w obu lokalizacjach anatomicznych. Stąd potrzeba regularnych kontroli u lekarzy specjalistów. Szczególnie dotyczy to osób ze stwierdzonym HPV w wymazie z gardła, gdyż w świetle badań Rosenthal i wsp. [27] u osoby zdrowej, wolnej od choroby nowotworowej w obrębie gardła środkowego HPV nie występuje w popłuczynach pobranych z jamy ustnej.

U 114/197 (57.9%) par oboje partnerzy mieli wykrytą infekcję wirusem w drogach płciowych, przy czym u 33/114 (28.9%) par była to infekcja przynajmniej jednym takim samym typem wirusa. Zgodne typy wirusa wykrywane najczęściej w poszczególnych parach to HPV 31, 16, 18, 66 i 42. U pozostałych 81 par infekcja wywołana była odmiennymi typami wirusa HPV. Z kolei u 11 par (5.6%) wirusa wykryto w wymazach z gardła, przy czym u 9/11 par infekcja dotyczyła tego samego typu wirusa (6 lub 33 lub 39 lub 42 lub 66).

U kobiet najczęstszym typem wykrywanym w wymazach ginekologicznych był HPV16. Występował on istotnie częściej u kobiet, które miały nowotwór szyjki macicy niż u tych, u których

wykryto dysplazję niskiego stopnia ( $p=0.002$ ) a także istotnie częściej gdy infekcja dotyczyła tylko tego jednego typu wirusa ( $p=0.035$ ). Kolejne najczęstsze cztery typy wśród tej grupy to dwa typy wysokiego ryzyka (HPV 31 i 39) oraz dwa niskiego ryzyka (HPV 42 i 54). Typ 42, jako jedyny z tej grupy przeważał u pacjentek, które miały zdiagnozowanego raka szyjki macicy (15/20). Pozostałe trzy typy przeważały u pacjentek ze zdiagnozowaną dysplazją szyjki macicy. Dodatkowo, u 9/15 spośród kobiet z HPV42, typ ten był identyfikowany jako jedyny występujący. Odmiennie, u kobiet z CIN (5/20) infekcji HPV42 towarzyszyła koinfekcja innym typem wirusa HPV. Należy podkreślić, iż HPV42 został wykryty w obu typach pobranych wymazów u kobiet i u mężczyzn jako jeden z najczęstszych genotypów. Jego częstość w poszczególnych wymazach wahała się od 10.2 do 19.6%.

Podsumowując, z przeprowadzonych badań wynika, iż infekcja różnymi typami wirusa HPV (w tym wysokiego ryzyka) w polskich parach jest powszechna. Szczególnie identyfikacja HR HPV w wymazie z gardła powinna być silną przesłanką do regularnych kontroli laryngologicznych w związku z ryzykiem wystąpienia nowotworu w tej okolicy. Zainteresowanie budzi wysoka częstość typu HPV42 uznawanego za typ niskiego ryzyka w obu rodzajach wymazów u obu płci. Doniesienia literaturowe wskazują na pewne cechy infekcji tym typem, które są charakterystyczne dla raków płaskonabłonkowych, np. "rozlane" barwienie (ang. *diffuse staining*) białka P16 czy też obecność motywu wiązania pRB w sekwencji wirusowej E7 typowych dla HPV wysokiego ryzyka [28]. Uzyskane wyniki oraz dane literaturowe stanowią przesłankę do rozważenia czy w populacji polskiej typ HPV 42 nie powinien zostać uznany za typ wysokiego ryzyka, co wymagałoby dalszej weryfikacji z wykorzystaniem większej grupy chorych badanych w regularnych odstępach czasowych. Najnowsze badania potwierdzają, iż reklasyfikacja stopnia onkogenności HPV42 jest zasadna [29].

**P3.** Brauze D, Kiwerska K, Bednarek K, Grenman R, Janiszewska J, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. *Expression of Serpin Peptidase Inhibitor B2 (SERPINB2) is regulated by Aryl hydrocarbon receptor (AhR)*. Chem Biol Interact. 2019 Aug 25;309:108700. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.06.013

W trakcie mojej pracy naukowej zaangażowałam się również w badania dotyczące roli receptora węglowodorów aromatycznych AhR w procesie rozwoju nowotworów głowy i szyi. Wiele spośród guzów HNSCC rozwija się w wyniku wieloletniej ekspozycji na kancerogeny obecne w dymie tytoniowym, m.in. na wysoce szkodliwe policykliczne węglowodory aromatyczne PAH, które wiążąc się z DNA powodują szereg jego uszkodzeń. Niektóre z tych związków, np. benzo[a]piren występują w postaci prokancerogenu i wymagają aktywacji do postaci czynnego kancerogenu. W procesie tym bierze udział receptor Ah, który po związaniu takiego związku (liganda) sam ulega aktywacji i bierze udział w regulacji ekspresji wielu genów, w tym kodujących enzymy I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków (np. cytochromy P450). Po związaniu liganda receptor przechodzi z cytozolu do jądra komórkowego, gdzie tworzy heterodimer z białkiem ARNT (ang. *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Utworzony kompleks AhR/ARNT wiąże się z sekwencjami XRE (ang. *Xenobiotic Responsive Elements*) - krótkimi sekwencjami DNA w regionach promotorowych regulowanych genów. Zwiększona ekspresja tych genów prowadzi do zmian w metabolizmie, co często pociąga za sobą zwiększoną toksyczność oraz wzmożone ryzyko kancerogenezy [30]. W ostatnich latach wykazano, iż AhR odgrywa również rolę w regulacji genów biorących udział w innych procesach prowadzących do nowotworzenia, takich jak apoptoza, proliferacja, wzrost i różnicowanie komórek. Jednym z takich genów jest *SERPINB2* (ang. *Serpin Family B Member 2*), będący inhibitorem aktywatora plazminogenu urokinazy. W naszych wcześniejszych pracach ustaliliśmy, że gen ten jest silnie indukowany przez ligand AhR (BNF - $\beta$ -naftoflawon) w linii HepaRG [10]. Celem kolejnych badań, było ustalenie roli receptora AhR w regulacji ekspresji *SERPINB2* w modelu raka krtani. Do badań wybrano linię komórkową UT-SCC-34, w której indukcja ekspresji genów zależnych od receptora AhR po stymulacji BNF była najwyższa [9]. W pierwszym etapie wyciszono ekspresję receptora poprzez transfekcję linii UT-SCC-34 wektorem kodującym shRNA skierowanym przeciwko *AhR*. Uzyskano wyciszenie *AhR* na poziomie 72%. W wyniku tego eksperymentu obniżeniu uległa również indukowana ekspresja *SERPINB2* (o 92%), jak i innych

genów regulowanych przez *AhR*, tj. *CYP1A1* (84%) i *CYP1B1* (76%). W ten sposób potwierdzono, iż obniżenie ekspresji *AhR* przekłada się na spadek ekspresji genu *SERPINB2*.

Przeprowadzono również analizę *in silico* sekwencji promotorowej genu *SERPINB2* w celu znalezienia sekwencji XRE. W przeciwieństwie do genów *CYP1A1* i *CYP1B1*, gdzie takich elementów można znaleźć po kilkanaście, w promotorze *SERPINB2* znaleziono tylko jedną sekwencję XRE-podobną (zawierającą fragment rdzeniowy XRE, tj. sekwencję GCGTG) zlokalizowaną w odległości 2848-2852 pz od miejsca startu transkrypcji (TSS – ang. *Transcription Start Site*) tego genu. W związku z tym przeszukano sekwencję oddaloną od genu, tj. domniemaną sekwencję enhancerową (20 - 15,5 kpz), gdzie w regionie aktywnej chromatyny (H3K27ac) zidentyfikowano zgrupowanie klasycznych sekwencji XRE. Ten region enhancerowy, zawierający niekodujące RNA (eRNA) został wcześniej zidentyfikowany jako istotny element regulacji ekspresji *SERPINB2* [31]. W przeprowadzonych następnie badaniach wykazano, iż ligandy *AhR* są zdolne do indukcji ekspresji enhancerowego RNA (774 eRNA) i że zdarzenie to poprzedza indukcję *SERPINB2*. Wykazano również, iż wyciszenie *AhR* znosi ekspresję 774e RNA. Jednakże badania z użyciem immunoprecypitacji chromatyny nie wykazały bezpośredniego wiązania *AhR* z żadną znaną sekwencją XRE. W związku z tym, testowano hipotezę o uczestnictwie dodatkowego, nowo syntetyzowanego białka pośredniczącego w zależnej od receptora *Ah* indukcji ekspresji zarówno 774 eRNA jak i *SERPINB2*. Wykazano, iż zadziałanie inhibitorem translacji białek CHX (ang. *Cycloheximide*) przed podaniem BNF blokuje indukcję *SERPINB2*. Tym samym potwierdzono, że nowo syntetyzowane białka są niezbędne w *AhR*-zależnej indukcji tego genu.

Podsumowując, wykazano iż *AhR* bierze udział w regulacji ekspresji *SERPINB2* a jego indukcja wydaje się polegać na syntezie nieznanego jeszcze białka. Dodatkowo w teście immunoprecypitacji chromatyny wykazano, iż do tego procesu nie jest konieczne bezpośrednie wiązanie *AhR* z sekwencjami poprzedzającymi *SERPINB2*.

**P4. Kiwerska K, Szyfter K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy-a double-edged sword. J Appl Genet. 2019 Nov;60(3-4):329-334. DOI: 10.1007/s13353-019-00516-9**

Do cyklu włączona została również praca przeglądowa, w której omawiam znaczenie procesu naprawy DNA (DDR - ang. *DNA Damage Response*) w inicjacji i progresji nowotworu, jak również w odniesieniu do powodzenia leczenia pacjentów z nowotworami, w tym głowy i szyi. Tematyka naprawy DNA w znacznym stopniu nakłada się na zagadnienie wysokiej zachorowalności na raka krtani i jednocześnie wiąże się z niską efektywnością radio- i chemioterapii tej choroby. Skuteczna naprawa DNA pozwala na utrzymanie stabilności genomu, nieustannie narażonego na działanie szkodliwych czynników zewnętrznych oraz procesów metabolicznych zachodzących w komórkach. W zależności od rodzaju uszkodzenia zostają uruchomione odpowiednie systemy naprawcze, to jest: naprawa przez wycinanie zasad (BER – ang. *Base Excision Repair*), nukleotydów (NER – ang. *Nucleotide Excision Repair*), naprawa niesparowanych zasad (MMR – ang. *Mismatch Repair*) czy naprawa rekombinacyjna (NHEJ – ang. *Non-Homologous End Joining* i HR – ang. *Homologous Recombination*). Niski potencjał naprawczy sprzyja wejściu komórek w szlak nowotworzenia, ze względu na słabą skuteczność usuwania uszkodzeń wywołanych czynnikami rakotwórczymi (np. kancerogenami zawartymi w dymie tytoniowym, m.in. policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi). Ustalenie to dotyczy w pierwszej mierze szlaku naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (NER), bowiem kancerogeny obecne w dymie tytoniowym generują powstawanie objętościowych adduktów kancerogen:DNA usuwanych w wyniku mechanizmu NER. Niska sprawność NER skutkuje generowaniem w tkankach osoby ekspozowanej skutecznej dawki kancerogenu na podwyższonym poziomie. Zjawisko to opisano we wczesnych pracach zespołu [32]. Uszkodzenia DNA nie usunięte odpowiednio szybko utralają się w materiale genetycznym w postaci mutacji genowych i aberracji chromosomowych. Wydajność naprawy DNA jest kwestią indywidualną i wiąże się z polimorfizmem genów regulujących ten proces. Na pierwszy rzut oka wydaje się, iż prognozy dla pacjentów z obniżonym potencjałem naprawczym są

z gruntu niekorzystne. Rzeczywiście, jeśli dojdzie do rozwoju procesu nowotworowego to dalsze losy chorego (odpowiedź na leczenie, ryzyko nawrotu, czas przeżycia) są również uzależnione od początkowej, indywidualnej sprawności naprawy DNA. Oczekuje się, że napromieniowanie komórek nowotworowych będzie skutkować uszkodzeniem DNA i dalej śmiercią komórek. Jednak sprawna naprawa DNA przeciwdziała tym oczekiwaniom i zmniejsza efekt terapeutyczny. Dodatkowym niekorzystnym efektem napromieniowania komórek nowotworowych może być rozwinięcie chemoodporności. Natomiast napromieniowane komórki prawidłowe mogą wejść na szlak onkogenny i rozwinąć tzw. wtórne ogniska nowotworowe.

Przedstawienie we własnej pracy poglądowej podwójnej roli naprawy DNA w chorobie nowotworowej i jej leczeniu spotkało się z bardzo dobrym przyjęciem - publikacja ta w trakcie trzech lat od momentu ukazania się uzyskała aż 53 cytowania i jest moją najlepiej cytowaną pierwszoautorską pracą.

**P5. Kiwerska K, Kowal-Wisniewska E, Ustaszewski A, Bartkowiak E, Jarmuz-Szymczak M, Wierzbicka M, Giefing M. *Global DNA methylation profiling reveals differentially methylated CpGs between salivary gland pleomorphic adenomas with distinct clinical course.* Int J Mol Sci. 2022 May 25;23(11):5962. DOI: 10.3390/ijms23115962.**

Ostatnia praca włączona do cyklu obejmuje zagadnienia związane z gruczolakami wielopostaciowymi ślinianek - łagodnymi nowotworami gruczołów ślinowych, których częstość w ostatnich latach wzrosła zdecydowanie. Ich etiologia pozostaje nieustalona a podłoże genetyczne dotąd jest słabo poznane. Guzy te rozwijają się najczęściej w toku wieloletniej obserwacji, ich wzrost jest powolny, niebolesny a torebka guza pozostaje zachowana. Istnieje jednak pewna populacja pacjentów, u których przebieg kliniczny jest zdecydowanie odmienny - wzrost jest dużo szybszy a czas od pierwszych objawów dużo krótszy. Przyczyna występowania takich różnic jest nieznana. Kryteria klasyfikacji pacjentów z guzami PA opisała po raz pierwszy prof. Małgorzata Wierzbicka wraz z zespołem z poznańskiej Kliniki Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej [25].

Dzięki uzyskanemu przeze mnie finansowaniu z Narodowego Centrum Nauki (grant Miniatura-2, nr 2018/02/X/NZ5/00365) możliwe było wykonanie m.in. całogenomowego profilowania metylacyjnego, z wykorzystaniem macierzy Illumina Human Methylation EPIC 850k BeadChip w grupie ośmiu pacjentów z gruczolakiem wielopostaciowym ślinianki. Spośród nich cztery przypadki zaklasyfikowano jako tzw. guzy szybko rosnące (FGT - ang. *Fast Growing Tumors*) a cztery jako guzy wolno rosnące (SGT - ang. *Slow Growing Tumors*). Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja potencjalnych biomarkerów metylacyjnych różnicujących guzy FGT od SGT. Wspomniana macierz metylacyjna zawiera ponad 850 tysięcy tagów reprezentujących dinukleotydy CpG rozproszone w genomie. Aby wybrać CpG najsilniej różnicujące badane grupy zastosowano następujące kryteria: I) odrzucono CpG zlokalizowane w chromosomach X i Y; II) wybrano tylko te CpG, dla których różnica średnich metylacji pomiędzy FGT a SGT wynosiła przynajmniej 40%; III) odchylenie standardowe dla metylacji każdego CpG w badanych grupach nie mogło przekroczyć 20%. W ten sposób wskazano 85 dinukleotydów CpG różnicujących grupę FGT od SGT. Aby ostatecznie zawęzić badaną grupę CpG wybrano tylko te, które sąsiadowały z co najmniej jednym CpG wykazującym podobny trend w metylacji a pominiętym poprzez zastosowane kryteria I-III. W ten sposób wskazano pięć regionów różnicujących badane grupy - gdzie poziom metylacji DNA był istotnie wyższy w FGT w porównaniu do SGT. Do regionów tych zaprojektowano testy do pirosekwencjonowania DNA aby zweryfikować wyniki macierzy w powiększonej grupie 75 pacjentów z PA (n=36 FGT oraz n=39 SGT). Łącznie we wszystkich 5 testach analizowano 13 dinukleotydów CpG. W toku przeprowadzonych badań potwierdzono, iż średni poziom metylacji dla każdego z analizowanych CpG był istotnie wyższy w guzach zaklasyfikowanych jako szybko rosnące w porównaniu do guzów sklasyfikowanych jako wolno rosnące. Analizując wyniki dla poszczególnych testów (zawierających od 1 do 5 CpG) potwierdzono, iż również one różnicują badane grupy pod kątem metylacji DNA.

W kolejnym kroku sprawdzono czy uzyskane wyniki mogą być wykorzystane jako potencjalne narzędzie diagnostyczne do rozróżnienia guzów ślinianek o odmiennym przebiegu. W tym celu dla

poszczególnych dinukleotydów CpG wyznaczono krzywe ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*), określające związek pomiędzy czułością a specyficznością, będące narzędziem do oceny poprawności klasyfikatora. Pole pod krzywą ROC, oznaczane jako AUC (ang. *Area Under Curve*; przedział 0-1) przekłada się na trafność badanego modelu - im wyższa wartość AUC dla danego markera tym większą ma on wartość diagnostyczną. W przeprowadzonych badaniach dla poszczególnych dinukleotydów CpG czułość wahała się w zakresie 0.69-0.81, specyficzność w zakresie 0.59-0.72 a AUC w zakresie 0.63-0.76. Z uwagi na fakt, że wyniki te nie były optymalne w znaczeniu ich diagnostycznej użyteczności wykonano analizę stopniowej regresji logistycznej w celu ustalenia zestawu tych CpG które będą wchodziły w skład optymalnego modelu predykcyjnego [33]. Dzięki tej analizie wskazano model złożony z pięciu CpG (I: cg06748470; II: cg00600454; III: chr14: 77,371,501–77,371,502; IV: chr16: 77,469,589–77,469,590; V: cg19930657), dla którego czułość wyniosła 0.78 a specyficzność 0.9. Biorąc pod uwagę fakt porównywania dwóch grup o takim samym rozpoznaniu histopatologicznym uzyskana wartość AUC na poziomie 0.845 stanowi przesłankę za potencjalnym wykorzystaniem tego modelu jako elementu uzupełniającego do rozróżniania klinicznego przebiegu diagnozowanych gruczolaków wielopostaciowych ślinianek. Takie podejście do badania guzów PA nie zostało dotąd opisane w literaturze.

### **Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań**

1. Wykazano po raz pierwszy, iż gen *FAM107A* jest deregulowany w płaskonabłonkowym raku krtani.
  - Wykazano brak ekspresji genu *FAM107A* i jego produktu białkowego w liniach komórkowych LSCC i/lub pierwotnych guzach krtani w porównaniu do próbek nienowotworowych
  - Wykazano, iż delecje oraz metylacja DNA to najczęstszy mechanizm prowadzący do inaktywacji tego genu
  - Wykazano, iż demetylacja przy użyciu decytabiny powoduje zniesienie metylacji oraz przywrócenie ekspresji genu *FAM107A*
2. Wykazano, że infekcja różnymi typami wirusa HPV (w tym wysokiego ryzyka) w polskich parach jest powszechna.
  - Wykazano, iż szczególnie infekcja wirusem HPV42 (znanym dotąd jako typ niskiego ryzyka) jest rozpowszechniona wśród polskich par, w których kobieta miała wcześniej zdiagnozowany stan patologiczny szyjki macicy związany z infekcją HPV.
  - Wykazano wysoką częstość HPV42 u obu płci w wymazach pobranych z obu lokalizacji.
  - Wskazano na konieczność regularnych kontroli laryngologicznych przez osoby u których zidentyfikowano infekcję HPV w wymazie z gardła z uwagi na fakt ryzyka rozwinięcia nowotworu w tej lokalizacji anatomicznej.
3. Wykazano, iż receptor AhR bierze udział w regulacji ekspresji genu *SERPINB2*. Indukcja tego genu nie jest jednak bezpośrednia ale wydaje się być związana z syntezą nieznanego jeszcze białka.
4. Opisano podwójną rolę naprawy DNA w chorobie nowotworowej i jej leczeniu. Wskazano, iż dobór procesu terapeutycznego powinien zostać powiązany z efektywnością działania systemów naprawy DNA.
5. Wykazano, że różnice w metylacji DNA w wybranych dinukleotydach CpG mogą być wykorzystane do odróżnienia szybko rosnących od wolno rosnących gruczolaków wielopostaciowych. Wskazany model złożony z pięciu dinukleotydów CpG może być potencjalnie wykorzystany jako element uzupełniający w diagnostyce gruczolaków wielopostaciowych ślinianek o różnym przebiegu klinicznym.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

### Opis kierunków badawczych realizowanych w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora.

#### ***Aberracje chromosomowe związane z rozwojem płaskonabłonkowych raków głowy i szyi***

W trakcie realizacji pracy magisterskiej w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN moje zainteresowania skierowały się na techniki cytogenetyki klasycznej i molekularnej oraz ich zastosowanie w diagnostyce różnych chorób. Po obronie pracy magisterskiej zostałam zatrudniona w Zespole Mutagenetyki, gdzie mogłam wykorzystać nabyte umiejętności w badaniach płaskonabłonkowych raków krtani. Od początku zaangażowana byłam w prowadzenie hodowli komórkowych guzów krtani, pozyskanych w ramach stałej współpracy naukowej z prof. W. Szyfterem i prof. M. Wierzbicką z Kliniki Laryngologii ówczesnej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Do moich zadań należało również prowadzenie hodowli linii komórkowych wyprowadzonych z nowotworów głowy i szyi, które otrzymaliśmy w ramach współpracy z prof. Reidarem Grenmanem z Kliniki Otorynolaryngologii-Chirurgii Głowy i Szyi, Uniwersytetu i Szpitala w Turku (Finlandia). Brałam również udział w badaniach prowadzących do ustalenia kariotypów otrzymanych linii komórkowych. Linie te do dzisiaj są wykorzystywane jako model badawczy w pracach Zakładu Genetyki Nowotworów IGCz PAN. Badania te oraz kolejne, prowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych technik: CGH, tj. porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *Comparative Genomic Hybridization*) oraz FISH, tj. fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*) miały na celu identyfikację aberracji chromosomowych, charakterystycznych dla rozwoju i progresji raków krtani. W toku prowadzonych prac zidentyfikowano liczne aberracje liczbowe i strukturalne oraz chromosomy markerowe w badanym materiale. Porównując wzór zmian w guzach pierwotnych i odpowiadających im przerzutach wykluczono region 13q14 (w którym zlokalizowany jest gen *RB1*) jako ulegający utratom w trakcie progresji guza. Wyniki te zostały przedstawione na sympozjum *Proceedings of the 2nd International Symposium* w Marburgu (Niemcy) i opublikowane w pracy: Szyfter K, Kujawski M, Jarmuż M, Grenman R, **Szukała K**, Golusiński W, Szyfter W – *Analysis of chromosomes in metastasing tumour cells of larynx by molecular and conventional cytogenetics. Metastases in Head and Neck Cancer. Tectum Verlag Marburg 2001 ISBN 3-8288-8254-4, str. 73-78.*

W innej części badań analizowano status chromosomu Y w nowotworach krtani. Wykazano, iż chromosom ten ulega częstej utracie zarówno w guzach pierwotnych (14/22; 63%) jak i ich przerzutach (15/22; 68%) a także w guzach pierwotnych (8/8; 100%) i odpowiadających im drugich pierwotnych nowotworach krtani (8/8; 100%). Badania te wykazały, że utrata chromosomu Y jest charakterystyczną zmianą obserwowaną w guzach głowy i szyi. Wyniki te zostały opublikowane w pracy: Kujawski M, Jarmuż M, Rydzanicz M, **Szukała K**, Wierzbicka M, Grenman R, Golusiński W, Szyfter K – *Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. Cancer Letters, 2004, 208 (1): 95-111.*

Prowadzone badania potwierdzały, że nowotwory głowy i szyi, w tym nowotwory krtani to choroba niezwykle złożona genetycznie, która cechuje się akumulacją zmian genetycznych wraz z progresją nowotworu [12]. Zmiany te możliwe były do zaobserwowania już na wczesnym etapie kancerogenezy, gdyż w efekcie ekspozycji na kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym uszkodzeniom genetycznym ulegał również histopatologicznie prawidłowy nabłonek [34]. Te dane stały się przesłanką do kolejnych badań, których efektem była moja rozprawa doktorska pt. „Analiza utraty heterozygotyczności w regionach występowania przeciwnowotworowych genów supresorowych w raku krtani”. Cele pracy wynikały z potrzeb i oczekiwań klinicystów w zakresie identyfikacji zmian predysponujących pacjentów do zachorowania na nowotwory, jak i oceny, które z tych zmian pozwalają na wiarygodne prognozowanie przebiegu choroby.

## **Analiza utraty heterozygotyczności w regionach występowania genów supresorowych w raku krtani**

Badania prowadzono w grupie 65 chorych ze zdiagnozowanym rakiem krtani od których oprócz guza pobrano również prawidłową histologicznie tkankę otaczającą oraz dalszy fragment prawidłowej błony śluzowej. W pierwszym etapie w badanym materiale analizowano utratę heterozygotyczności (LOH - ang. *Loss Of Heterozygosity*) w dwóch regionach chromosomu 13: 13q14 (jeden marker mikrosatelitarny) i 13q34 (dwa markery mikrosatelitarne). LOH obserwowano najczęściej w tkance guza a jej częstość w zależności od badanego markera wynosiła 49-64%. W tkance marginesu LOH stwierdzono w 12-31% przypadków a w zdrowej tkance odległej w 6-22% badanych przypadków. Uzyskane wyniki wskazały, iż ramię 13q ulega częstym utratom w przebiegu raka krtani, natomiast pojawienie się LOH w tkance histologicznie niezmiętej może być czynnikiem predykcyjnym wystąpienia wznowy miejscowej lub drugiego pierwotnego nowotworu w tej lokalizacji anatomicznej. Na realizację tego projektu uzyskałam dofinansowanie z Komitetu Badań Naukowych w ramach grantu młodego badacza. Badania te zostały wykonane w trakcie trzymiesięcznego stażu naukowego w Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów, kierowanym przez dr Juergena Briegera, w Klinice Otorinolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Mainz w Niemczech i zostały opublikowane w pracy: **Szukała K, Brieger J, Bruch K, Biczysko W, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K** - *Loss of heterozygosity on chromosome arm 13q in larynx cancer patients: analysis of tumor, margin and clinically unchanged mucosa. Medical Science Monitor, 2004, 10 (6): CR233-2408.* Analiza LOH została przeze mnie wykonana z wykorzystaniem nowoczesnego w tamtym czasie sekwenatora kapilarnego ABI PRISM 310, miałam również możliwość nauczyć się sekwencjonowania Sangera przy użyciu tego aparatu.

Następnie badania poszerzono o grupę kolejnych markerów mikrosatelitarnych, znajdujących się w regionach chromosomowych: 3p, 7q, 8p, 9p, 18q. W regionach tych zlokalizowane są geny supresorowe, ulegające inaktywacji na wczesnych etapach rozwoju raków krtani, takie jak: *CDKN2A* (alias *p16*; 9p21), *TP53* (17p13.1) czy *FHIT* (3p14.2). Badania prowadzono w uprzednio zgromadzonym materiale pozyskanym od 65 pacjentów oraz u części pacjentów z tej grupy w wymazach pobranych z okolicy guza pierwotnego w trakcie kontroli cztery lata po operacji (ang. *follow up*). Celem takiego podejścia było określenie czy prowadzone badania mogą zostać wykorzystane przez klinicystów w predylekcji wznowy. Wykazano, iż najczęściej traconym markerem mikrosatelitarnym w tkance nowotworowej jest D3S1234 zlokalizowany w regionie 3p14.2 (29%), natomiast w prawidłowych histologicznie marginesie i oddalonej błonie śluzowej częstości te były niższe, odpowiednio: 5% (D3S1304; 3p26.1) oraz 6% (D9S171; 9p21). W grupie wymazów pobranych w trakcie *follow up* najczęściej wykrywano LOH w markerach D3S1300 (3p14.2), D7S486 (7q31.2) oraz D18S46 (18q21.1). Nie powiązano jednak obecności LOH w tych markerach z ryzykiem wystąpienia wznowy. Wskazano natomiast, iż utrata prawdopodobnie nastąpiła już po zabiegu usunięcia guza jako rezultat ciągłej ekspozycji pacjentów na kancerogeny (kontynuacja palenia papierosów i spożywania alkoholu po zabiegu laryngektomii). Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w pracy: **Szukała K, Sowińska A, Wierzbicka M, Biczysko W, Szyfter W, Szyfter K.** *Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse local relapse in patients after laryngectomy? Mutation Res, 2006, 600: 67-76.* Ponadto techniczny aspekt analizy LOH został opisany jako rozdział w książce: **Szukała K, Kujawski M, Szyfter K** – *Analiza utraty heterozygotyczności (LOH) w badaniach nowotworów, str. 359-364. W "Przykłady analiz DNA" pod red. R. Słomskiego. Wydanie II poszerzone I uzupełnione. Wydawnictwo AR im. A.Cieszkowskiego, ISBN 83-7160 346-0, Poznań, 2004.*

W nurcie dotyczącym utraty heterozygotyczności w nowotworach głowy i szyi znalazły się również badania opublikowane w pracy: **Giefing M, Rydzanicz M, Szukała K, Woźniak A, Wierzbicka M, Szyfter K, Kujawski M.** - *Second primary tumors (SPT) of head and neck. Distinguishing of "true" SPT from micrometastasis by LOH analysis of selected chromosome regions. Neoplasma, 2005, 52 (5): 374-380.* W badaniach tych wykorzystano analizę LOH do oceny klonalności nowotworów pierwotnych i drugich nowotworów pierwotnych (SPT – ang. *Second Primary Tumor*) pochodzących od tego samego pacjenta. Wykazano, iż w przypadku kolejnego guza, klinicznie kwalifikowanego jako SPT 26% (6/23) było klonalnie niezwiązanych (tzw. „prawdziwe” SPT), natomiast 13% (3/23) miało zmiany klonalne, co

klasyfikowało je jako mikroprzerzuty lub drugie ognisko tego samego pola (SFT – ang. *Second Field Tumor*). W pozostałych 61% (14/23) dane były niewystarczające/niejednoznaczne, aby wyciągnąć na ich podstawie wnioski dotyczące klonalności. Badania te potwierdziły po raz kolejny jak bardzo złożony jest proces kancerogenezy w nowotworach głowy i szyi.

### **Geny supresji nowotworowej w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi**

W trakcie realizowanych badań zwrócono uwagę na szerszą rolę i udział genów supresorowych w rozwoju nowotworów głowy i szyi. W pracy przeglądowej: *Szyfter K, Kujawski M, Szukała K. Rola przeciwnowotworowych genów supresorowych w nowotworach głowy i szyi. Współczesna Onkologia, 2003, 7 (4): 240-246* opisaliśmy m.in. jak funkcjonują geny supresorowe w świetle “hipotezy dwóch zdarzeń Knudsona”, jakie są mechanizmy prowadzące do wyłączenia ich aktywności oraz jaka jest rola poszczególnych genów w inicjacji i progresji nowotworów głowy i szyi. Z kolei uszkodzenia przeciwnowotworowego genu *TP53* oraz typy mutacji tego genu w powiązaniu z paleniem/nie paleniem tytoniu zostały przedstawione w publikacji *Szyfter K, Kiwerska K, Rydzanicz M, Kruszyna Ł, Zamelduch T, Jagodziński P. Mutacje supresorowego genu przeciwnowotworowego TP53 w nowotworach tytonio-zależnych. Przegląd Lekarski, 2009, 66 (10): 603-607*. W kolejnych badaniach w ramach realizowanego przeze mnie zadania badawczego w obrębie grantu zamawianego (nr PBZ-KBN-091/PO5/2003/19) przeprowadzono analizę mutacji (wariantów sekwencji) w genie *CDKN2A* w grupie 390 pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano 40 różnych wariantów sekwencji, m.in. dwie transwersje w kodonie 108: c.322G>C (p.Asp108His) oraz c.322G>T (p.Asp108Tyr) oraz tranzycję w kodonie 110 wprowadzającą kodon STOP: c.110G>A (p.Trp110X). Biorąc pod uwagę lokalizację tych zmian (region powtórzeń ankyrynowych) stwierdzono, iż mutacje te mogą być krytycznymi hot-spotami podczas rozwoju raka krtani. Wyniki badań opublikowano w pracy: *Kiwerska K, Rydzanicz M, Kram A, Pastok M, Antkowiak A, Domagała W, Szyfter K. Mutational analysis of CDKN2A gene in a group of 390 larynx cancer patients. Molec.Biol.Rep., 2010, 37 (1): 325-332*. Badania te wykonano przed uzyskaniem stopnia doktora, natomiast publikacja ukazała się już po obronie pracy doktorskiej.

Podjęto również badania mające na celu zidentyfikowanie znanych i/lub domniemyanych genów supresorowych, których inaktywacja jest efektem delekcji homozygotycznej. Przeprowadzono całogenomową hybrydyzację porównawczą, tzw. array CGH w trzech liniach komórkowych przy użyciu macierzy Agilent Human Genome CGH 44B. Zidentyfikowano 31 regionów kandydujących, z których pięć weryfikowano następnie poprzez PCR w powiększonej grupie 12 linii komórkowych LSCC. Powtarzającą się delekcję homozygotyczną wykryto w genie *CDKN2A*. Zmiana ta została potwierdzona w 7/12 badanych liniach komórkowych. Uzyskany wynik podkreślił znaczenie genu *CDKN2A* jako ważnego genu supresorowego w przebiegu raka krtani a także wskazał na inny niż LOH, mutacje czy metylacja DNA mechanizm jego inaktywacji. Wyniki opublikowano w pracy *Giefing M, Martin-Subero JJ, Kiwerska K, Jarmuż M, Grenman R, Siebert R, Szyfter K. Characterization of homologous deletions in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Genet. Cytogenet. 2008, 184 (1): 38-43. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2008.03.004*.

### **Opis kierunków badawczych realizowanych w okresie po uzyskaniu stopnia doktora.**

#### **Identyfikacja potencjalnych genów supresji nowotworowej oraz mechanizmów ich inaktywacji w płaskonabłonkowych rakach głowy i szyi**

Po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam w kontynuacji badań dotyczących identyfikacji potencjalnych genów supresorowych a także mechanizmów ich inaktywacji. W ramach uzyskanych projektów i współpracy z prof. Reinerem Siebertem (Instytut Genetyki Człowieka w Kilonii) realizowanych w Zakładzie wykonano dwie całogenomowe analizy: 1) analizę liczby kopii z wykorzystaniem techniki array CGH (Agilent Human Genome CGH 244A Microarray) w 10 liniach



komórkowych LSCC oraz 2) profilowanie ekspresji przy użyciu macierzy Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array w 10 liniach komórkowych LSCC i trzech kontrolach pochodzących z materiału nienowotworowego krtani lub jej okolic. Przy użyciu techniki array CGH zidentyfikowano 113 regionów zawierających geny kodujące białka, w których obserwowano istotne zmniejszenie liczby kopii, co wskazywało na potencjalną homozygotyczną delecję. Metodą multipleks PCR potwierdzono 22 nowe homozygotyczne delecje w 15 genach z tej grupy. Trzy z tych genów: *PCDH17/PCH68*, *PRR20* i *PTPRD* zostały homozygotycznie utracone w dwóch liniach komórkowych. Dodatkowo wyniki macierzy ekspresyjnej wskazały, iż cztery geny z tej grupy: *ATG7*, *ZMYND11*, *PCDH17/PCH68* i *PTPRD* wykazywały statystycznie istotne obniżenie ekspresji w liniach komórkowych LSCC w porównaniu z prawidłowymi kontrolami. Wyniki te zweryfikowano następnie przy użyciu techniki PCR w czasie rzeczywistym w powiększonej grupie 21 linii komórkowych LSCC a także na poziomie białka za pomocą Western blot. Ostatecznie potwierdzono, iż geny *PCDH17/PCH68* i *PTPRD* mogą być nowymi, potencjalnie supresorowymi genami w płaskonabłonkowych rakach krtani. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: *Giefing M, Zemke N, Brauze D, Kostrzewska-Poczekaj M, Luczak M, Szaumkessel M, Pelinska K, Kiwerska K, Tönnies H, Grenman R, Figlerowicz M, Siebert R, Szyfter K, Jarmuz M. High resolution ArrayCGH and expression profiling identifies PTPRD and PCDH17/PCH68 as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer. 2011 Mar;50(3): 154-66. DOI: 10.1002/gcc.20840.*

W kolejnych badaniach skupiono się na poszukiwaniu innych niż delecje mechanizmów prowadzących do wyciszenia ekspresji wybranych genów. W badaniach dotyczących genu *PTPRD* sprawdzono, czy mutacje punktowe lub hipermetylacja promotora genu mogą powodować jego deregulację. Sekwencjonując regiony kodujące genu *PTPRD* nie znaleziono jednak mutacji punktowych, które mogłyby powodować jego inaktywację. Zidentyfikowano natomiast powtarzającą się metylację DNA w 9/14 liniach komórkowych LSCC (64%) oraz w 37/79 (47%) pierwotnych guzów krtani, statystycznie wyższą w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej górnych dróg oddechowych (odpowiednio,  $p=0.001$  i  $p=0.0002$ ). Podsumowując, wykazano, iż metylacja DNA jest dominującym mechanizmem inaktywacji genu *PTPRD*. Wyniki tych badań opublikowano w pracy *Szaumkessel M, Wojciechowska S, Janiszewska J, Zemke N, Byzia E, Kiwerska K, Kostrzewska-Poczekaj M, Ustaszewski A, Jarmuz-Szymczak M, Grenman R, Wierzbicka M, Bartochowska A, Szyfter K, Giefing M. Recurrent epigenetic silencing of the PTPRD tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma. Tumour Biol. 2017 Mar; 39 (3): 1010428317691427. DOI: 10.1177/1010428317691427.* Podobnie, dla genu *PCDH17* wykazano, iż metylacja DNA w sposób powtarzalny prowadzi do wyciszenia ekspresji tego genu (32/81 przypadków (40%)). Różnice w poziomie metylacji DNA w guzach w odniesieniu do tkanek prawidłowych były statystycznie istotne ( $p<0.001$ ). Dodatkowo wykazano, iż zastosowanie decytabiny (środka demetylującego) przywraca ekspresję genu *PCDH17* w liniach komórkowych LSCC. Uzyskane wyniki opublikowano w pracy *Byzia E, Soloch N, Bodnar M, Szaumkessel M, Kiwerska K, Kostrzewska-Poczekaj M, Jarmuz-Szymczak M, Szyberberg L, Wierzbicka M, Bartochowska A, Kalinowicz E, Grenman R, Szyfter K, Marszalek A, Giefing M. Recurrent transcriptional loss of the PCDH17 tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma is partially mediated by aberrant promoter DNA methylation. Mol Carcinog. 2018 Mar 22. DOI: 10.1002/mc.22808.*

Wykorzystanie wyników uzyskanych z zastosowaniem wysokoprzepustowych analiz macierzowych doprowadziło do identyfikacji również innych genów, potencjalnie supresorowych, takich jak: *GNG7*, *FAM107A*, *CEACAM6*, *DIAPH2* i *MAF*. Praca dotycząca genu *FAM107A* została włączona do cyklu habilitacyjnego (P1).

W badaniach nad *GNG7* wykazano utratę białka kodowanego przez ten gen u 68/188 (36%) pacjentów z nowotworem krtani/dna jamy ustnej z wykorzystaniem barwienia immunohistochemicznego. Dodatkowo stwierdzono, iż utrata ekspresji korelowała z wielkością guza (pT3/T4;  $p=0.012$ ) oraz z brakiem przerzutów do węzłów chłonnych ( $p=0.02$ ). Wykazano także silną korelację pomiędzy utratą białka *GNG7* a keratynizacją guzów ( $p=0.008$ ). Z wykorzystaniem pirosekwencjonowania DNA stwierdzono hipermetylację w regionie promotora *GNG7* w 8/13 (62%)

linii komórkowych LSCC oraz w 42/98 (48%) pierwotnych raków krtani. Zmianę tą statystycznie częściej obserwowano u młodych pacjentów ( $p < 0.001$ ). Dodatkowo korelowała ona z utratą ekspresji genu *GNG7* ( $p < 0.001$ ). Wyniki tych badań opublikowano w pracy: *Hartmann S., Szaumkessel M., Salaverria I., Simon R., Sauter G., Kiwerska K., Gawęcki W., Bodnar M., Marszałek A., Richter J., Brauze D., Zemke N., Jarmuz M., Hansmann M.-L., Siebert R., Szyfter K. and Giefing M. Loss of protein expression and recurrent DNA hypermethylation of the GNG7 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. J. Appl. Genetics, 2012, 52 (2):167-174. DOI: 10.1007/s13353-011-0079-4*

W kolejnych badaniach w oparciu o dane uzyskane przy użyciu macierzy ekspresyjnej Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 stwierdzono obniżoną ekspresję genu *CEACAM6* w 16 analizowanych próbkach linii komórkowych i guzów pierwotnych, co zostało następnie potwierdzone przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym w powiększonej grupie linii komórkowych ( $n=25$ ). Następnie wykluczono mutacje oraz zmianę liczby kopii jako czynniki sprawcze obniżonej ekspresji genu. Natomiast w wyniku przeprowadzonego pirosekwencjonowania po konwersji DNA wodorosiarczynem sodu stwierdzono hipermetylację DNA w promotorze *CEACAM6* w 9/25 (36%) linii komórkowych. Zastosowanie 5-aza-2-deoksycytydyny znoszącej metylację spowodowało przywrócenie ekspresji genu w obu liniach komórkowych (UT-SCC-11 i UT-SCC-29) poddanych tej procedurze. Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy: *Bednarek K, Kostrzewska-Poczekaj M, Szaumkessel M, Kiwerska K, Paczkowska J, Byzia E, Ustaszewski A, Janiszewska J, Bartochowska A, Grenman R, Wierzbicka M, Szyfter K, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. Downregulation of CEACAM6 gene expression in laryngeal squamous cell carcinoma is an effect of DNA hypermethylation and correlates with disease progression. Am J Cancer Res. 2018 Jul 1;8(7):1249-1261. eCollection 2018.*

Dane uzyskane w tych eksperymentach wskazują, że zarówno w przypadku genu *GNG7*, jak i genu *CEACAM6* metylacja DNA w regionie promotorowym jest dominującym mechanizmem wyciszającym gen. Dodatkowo wykazano, iż obniżenie ekspresji genu *CEACAM6* jest znaczące w liniach komórkowych pochodzących z guzów o wysokim stopniu zaawansowania.

W kolejnych badaniach skupiono się na dwóch genach: *DIAPH2* i *DIAPH3*, których funkcje pozwalają na powiązanie ich utraty z mechanizmem przerzutowania. W warunkach fizjologicznych białka kodowane przez te geny – forminy – biorą udział w procesach komórkowych, takich jak cytokineza czy adhezja komórkowa. W celu poznania uszkodzeń w obu genach poddano je sekwencjonowaniu w pięciu liniach komórkowych pochodzących z przerzutów do węzłów chłonnych. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano hemizygotyczną delecję (c.3116\_3240del125) w genie *DIAPH2* w domenie funkcjonalnej FH2, kluczowej do prawidłowego działania białka kodowanego przez ten gen. Dodatkowe sekwencjonowanie 95 próbek LSCC wraz z analizą wyników z bazy cBioPortal pozwoliło na wskazanie kolejnych zmian w genie *DIAPH2*, które istotnie częściej występowały w guzach przerzutujących do węzłów chłonnych ( $N+$ ;  $p=0.036$ ) [35,36]. Następnie sprawdzono jaka jest konsekwencja inaktywacji *DIAPH2* dla komórek. W tym celu z wykorzystaniem techniki CRISPR/Cas9 uzyskano linię komórkową HEK-293T z heterozygotyczną mutacją *DIAPH2*<sup>+/-</sup> (g.1146delA i g.1156\_1163delACATGATG). Następnie równolegle przeprowadzono testy na proliferację i migrację komórek w linii prawidłowej (*DIAPH2*<sup>+/+</sup>) oraz edytowanej (*DIAPH2*<sup>+/-</sup>). Wykazano, iż linia z mutacją charakteryzuje się wolniejszą proliferacją ( $p < 0.001$ ). Zaobserwowano natomiast, że linia *DIAPH2*<sup>+/-</sup> cechuje się istotnie szybszą migracją w stosunku do linii dzikiej ( $p=0.014$ ). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż mutacje w genie *DIAPH2* mogą przyczyniać się do nabycia potencjału do przerzutowania komórek LSCC. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w pracy: *Kostrzewska-Poczekaj M, Byzia E, Soloch N, Jarmuz-Szymczak M, Janiszewska J, Kowal E, Paczkowska J, Kiwerska K, Wierzbicka M, Bartochowska A, Ustaszewski A, Greczka G, Grenman R, Szyfter K, Giefing M. DIAPH2 alterations increase cellular motility and may contribute to the metastatic potential of laryngeal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. 2019 Oct 16; 40(10):1251-1259. DOI: 10.1093/carcin/bgz035.*

Kolejnym genem, którym zainteresowaliśmy się w trakcie badań nad supresorami nowotworów jest czynnik transkrypcyjny *MAF*. Został on zidentyfikowany we wcześniejszych badaniach Zakładu jako gen regulowany poprzez miR-1290 [37]. W kolejnych badaniach potwierdzono bezpośrednie oddziaływanie tego miR-1290 z 3'UTR genu *MAF* za pomocą systemu podwójnych reporterów lucyferazy. Z wykorzystaniem barwienia immunohistochemicznego wykazano utratę jądrowej ekspresji białka *MAF* w 58% analizowanych próbek LSCC, w tym całkowity brak ekspresji w 10% próbek w porównaniu do zachowanej w 100% cytoplazmatyczno-jądrowej ekspresji w próbkach prawidłowej błony śluzowej. Zaobserwowano przy tym akumulację białka w cytoplazmie przy braku ekspresji jądrowej, co podkreśla zaburzenia aktywności *MAF* jako czynnika transkrypcyjnego. Wykluczono mutacje typu „loss of function” (utrata funkcji), metylację DNA w regionie promotorowym genu *MAF* a także zmianę liczby kopii jako mechanizmy odpowiadające za utratę *MAF* w LSCC. Z wykorzystaniem analiz FIMO (ang. *Find Individual Motif Occurrences*) oraz GO (ang. *Gene Ontology*) zidentyfikowano natomiast geny zaangażowane w regulację apoptozy, zawierające w swej sekwencji promotorowej motyw wiązania dla genu *MAF*, spośród których wytypowano gen *PRODH* do dalszych analiz funkcjonalnych. W kolejnych badaniach wykazano, że wzmocnienie nadekspresji miR-1290 w komórkach LSCC za pomocą wektora ekspresyjnego skutkuje obniżeniem ekspresji *MAF*, co w konsekwencji przekłada się na spadek ekspresji *PRODH*. W ten sposób można wnioskować, iż gen *MAF* działa w LSCC jako supresor poprzez regulację apoptozy. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy *Janiszewska J, Bodnar M, Paczkowska J, Ustaszewski A, Smialek MJ, Szyllberg L, Marszałek A, Kiwerska K, Grenman R, Szyfter K, Wierzbicka M, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. Loss of the MAF Transcription Factor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Biomolecules. 2021 Jul 15;11(7):1035. DOI: 10.3390/biom11071035.*

Podsumowując, w wyniku realizowanych prac wskazano siedem potencjalnych genów supresorowych deregulowanych w nowotworach HNSCC (głównie w LSCC) oraz zidentyfikowano główne mechanizmy ich inaktywacji, przede wszystkim metylację DNA. Powiązanie tych genów z nowotworami głowy i szyi stanowiło *novum* w literaturze. Za cykl 5 oryginalnych prac powstałych w ramach realizowania badań dotyczących utraty genów supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani zostałam nagrodzona wraz z Zespołem nagrodą Wydziału Nauk Medycznych PAN (2019r.).

### **Badanie metylacji DNA w guzach HNSCC**

W badaniach przedstawionych powyżej wskazaliśmy metylację DNA jako najczęstszy mechanizm powodujący deregulację zidentyfikowanych przez nas genów o potencjalnym znaczeniu supresorowym w HNSCC. Równolegle brałam udział w badaniach dotyczących oceny statusu metylacji DNA w genach, które wcześniej zostały powiązane z nowotworami głowy i szyi.

Pierwszy projekt, w który byłam zaangażowana dotyczył badań metylacji DNA w genach z rodziny anemii Fanconiego (FA; choroba uwarunkowana genetycznie) oraz genach naprawy DNA – *BRCA1/BRCA2*, których mutacje zwiększają predyspozycję do wystąpienia nowotworów, w tym nowotworów głowy i szyi [38]. Z wykorzystaniem techniki pirosekwencjonowania DNA po konwersji wodorosiarczynem sodu przeanalizowano regiony promotorowe 13 genów z rodziny FA i genów z nimi powiązanych w próbkach 13 linii komórkowych LSCC i 64 guzów krtani. W trzech genach wykryto następujące zmiany: hipometylację w genie *FANCA* w 11/13 linii komórkowych ( $p < 0.0003$ ) i w 64/64 próbek raka krtani ( $p < 0.001$ ) w porównaniu do prawidłowych kontroli; hipometylację w genie *BRCA1* w 4/13 linii komórkowych ( $p = 0.04$ ) oraz w 3/58 guzów krtani ( $p = 0.22$ ); hipermetylację w *BRCA2* we wszystkich 13 liniach komórkowych ( $p < 0.0001$ ) oraz w 4/63 pierwotnych LSCC ( $p < 0.01$ ). Na podstawie tych wyników wysnuto wniosek, iż powtarzające się zmiany metylacji DNA w tych trzech genach mogą przyczyniać się do rozwoju raka krtani. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy *Szaumkessel M, Richter J, Giefing M, Jarmuz M, Kiwerska K, Tönnies H, Grenman R, Heidemann S, Szyfter K, Siebert R. Pyrosequencing-based DNA methylation profiling of Fanconi anemia/BRCA*

*pathway genes in laryngeal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2011 Aug;39(2):505-14. DOI: 10.3892/ijo.2011.1039.*

W innych badaniach oceniano cechy morfologiczne guza i status metylacji DNA w genach *CDKN2A*, *CDH1*, *ATM*, *FHIT* i *RAR-β* w guzach (w części centralnej i peryferyjnej guza) oraz marginesach chirurgicznych usuniętych z jamy ustnej i gardła w celu oceny ich znaczenia rokowniczego dla pacjentów. Analiza z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego potwierdziła wysoką heterogenność strukturalną komórek rakowych oraz fakt, że w marginesach chirurgicznych ocenionych jako wolne od nowotworu w badaniu HE (barwienie hematoksylina/eozyna) można znaleźć pojedyncze komórki lub zgrupowania komórek rakowych otoczonych tkanką łączną. Stwierdzono polimorfizm jąder komórkowych, który korelował z wielkością nowotworu (cecha T;  $p < 0.0001$ ), stopniem zajęcia węzłów chłonnych (cecha N;  $p < 0.046$ ) oraz obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (pN;  $p < 0.004$ ). Stwierdzono również korelację pomiędzy liczbą komórek z nieprawidłowymi mitozami a cechą T ( $p < 0,004$ ) i pN ( $p < 0,009$ ). Przeprowadzone badanie metylacji DNA w wymienionych genach techniką MSP (ang. *methylation specific PCR*) wykazało, iż najczęściej metylowane były geny *CDH1* i *CDKN2A*, podobnie najczęściej metylację w marginesie chirurgicznym stwierdzono w tych dwóch genach. Uzyskane wyniki nie korelowały jednak z danymi klinicznymi guzów. Stwierdzono ponadto, iż metylacja w genie *CDKN2A* korelowała z dłuższym czasem przeżycia pacjentów. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy: Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J., Seget M., **Kiwerska K.**, Błaszczuk A., Baer-Dubowska W., Biczysko W., Szyfter K., Szyfter W. *Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. Tumor Biology, 2014, 35 (8): 7441-9. DOI: 10.1007/s13277-014-1958-1.*

Kolejne badania, w których brałam udział dotyczyły ustalenia profilu metylacji DNA genów należących do antagonistów ścieżki sygnałowej Wnt w nowotworach jamy ustnej. Badania te realizowane były w ramach wieloletniej współpracy naukowej z dr hab. Jarosławem Paluszczakiem (Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu). Szlak sygnałowy Wnt/ $\beta$ -katenina bierze udział w regulacji proliferacji komórek, migracji i apoptozy a nieprawidłowe działanie poszczególnych jego składowych (defekty genetyczne, zmiany epigenetyczne) są często obserwowane w progresji nowotworów [39]. Przeanalizowano metylację DNA w następujących genach tego szlaku: *DACH1*, *DKK1*, *LKB1*, *PPP2R2B*, *RUNX3*, *SFRP2* oraz *WIF1* w 16 liniach komórkowych wyprowadzonych z raków jamy ustnej za pomocą metylo-specyficznego PCR. Stwierdzono częstą metylację DNA w genach *WIF1* (93.7 %) i *SFRP2* (81.2 %) oraz umiarkowanie częstą metylację w genach *DKK1* (37.5 %) and *DACH1* (31.2 %). Gen *SFRP2* wykazywał częściową metylację w prawidłowych komórkach okolicy tchawicy, w związku z czym został wyłączony z dalszych badań. Stwierdzono towarzyszące metylacji obniżenie lub całkowitą utratę ekspresji genów *DKK1* i *WIF1*. W kolejnym kroku zweryfikowano metylację DNA badanych genów w grupie 43 pierwotnych guzów jamy ustnej. W genie *WIF1* metylację DNA wykryto w 63.9 % guzów a *DACH1* w 35.9 % guzów. Metylację w genie *DKK1* obserwowano tylko w 7.1% guzów. Metylacja DNA w genie *WIF1* korelowała z krótszym czasem przeżycia ( $p=0.036$ ) a metylacja w genie *DKK1* korelowała z histologicznym stopniem zaawansowania guzów G ( $p=0.002$ ). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy metylacją genów a stopniem zaawansowania T, zajęciem węzłów chłonnych N, lokalizacją guza czy wystąpieniem wznowy. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, **Kiwerska K**, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, Mielcarek-Kuchta D, Wierzbicka M, Baer-Dubowska W. *The negative regulators of Wnt pathway – DACH1, DKK1, and WIF 1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. Tumour Biol. 2015 Apr;36(4):2855-61. DOI: 10.1007/s13277-014-2913-x.*

W kolejnych badaniach w grupie nowotworów HNSCC (36 linii komórkowych wyprowadzonych z HNSCC, 42 guzy jamy ustnej i gardła środkowego oraz 30 pierwotnych guzów krtani) przeanalizowano metylację DNA w genach będących negatywnymi regulatorami ścieżek sygnałowych Wnt (*CXCC4*, *DACT2*, *HDPR1* i *FBXW11*) oraz Shh (*HHIP*, *PTCH1*, *SUFU*, *ZIC1* i *ZIC4*) i skorelowano uzyskane wyniki z danymi histologicznymi guzów i klinicznymi pacjentów. W liniach komórkowych najczęściej

wykrywano metylację DNA w genie *ZIC1* (88.9%), nie stwierdzono natomiast metylacji DNA w genach *FBXW11*, *PTCH1*, oraz *SUFU*. Dodatkowo wykryto korelację pomiędzy metylacją DNA w genach *CXXC4* oraz *HHIP* a obniżoną ekspresją tych genów. W kolejnych etapach oceniono metylację DNA w genach *CXXC4*, *DACT2*, *HHIP*, *ZIC1* oraz *ZIC4* w próbkach guzów HNSCC. Stwierdzono częstą metylację w genach *ZIC1*, *ZIC4*, *HHIP*, i *DACT2* oraz umiarkowaną w genie *CXXC4*. Wykazano, iż metylacja jest częstsza w rakach krtani niż jamy ustnej/gardła. Obecność metylacji DNA nie korelowała z histologicznym stopniem zaawansowania G oraz wielkością guza T. Obecność metylacji w genie *ZIC4* korelowała z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych N ( $p=0.041$ ). Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: Paluszczak J, Wiśniewska D, Kostrzewska-Poczekaj M, **Kiwerska K**, Grénman R, Mielcarek-Kuchta D, Jarmuż-Szymczak M. *Prognostic significance of the methylation of Wnt pathway antagonists-CXXC4, DACT2, and the inhibitors of sonic hedgehog signaling-ZIC1, ZIC4, and HHIP in head and neck squamous cell carcinomas*. Clin Oral Investig. 2017 Jun;21(5):1777-1788. DOI: 10.1007/s00784-016-1946-5.

Ostatnie z tej serii badania dotyczące dotyczące negatywnych regulatorów ścieżki Wnt dotyczyły oceny częstości metylacji w genie *DAB2* w pierwotnych rakach jamy ustnej ( $n=49$ ). Mimo stwierdzonej częstej (70%) metylacji DNA tego genu w tych guzach nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy jego metylacją a stopniem zaawansowania TNM czy przeżyciem. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: Paluszczak J, **Kiwerska K**, Mielcarek-Kuchta D. *Frequent methylation of DAB2, a Wnt pathway antagonist, in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas*. Pathol Res Pract. 2018 Feb; 214(2):314-317. DOI: 10.1016/j.prp.2017.12.010.

Podsumowując przeprowadzone badania można wyciągnąć wniosek, iż metylacja DNA w genach *WIF1* i *ZIC4* może być uznana za marker prognostyczny w rakach jamy ustnej i ustnej części gardła. Z kolei metylacja DNA w genie *DAB2* może stanowić marker detekcji procesu nowotworowego w obrębie jamy ustnej.

### **Identyfikacja potencjalnych onkogenów w płaskonabłonkowych nowotworach krtani**

Poza genami supresorowymi badania realizowane w trakcie mojej pracy naukowej dotyczyły również identyfikacji nowych, potencjalnych onkogenów. Z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), porównawczej hybrydyzacji genomowej macierzy (array CGH) oraz mikromacierzy ekspresyjnej genów przeanalizowano region 11q13, który ulega amplifikacji/przyrostowi w rakach krtani [40]. Przeanalizowano 17 linii komórkowych LSCC oraz 34 próbki pochodzące z pierwotnych raków krtani. Wykryte aberracje pozwoliły na ustalenie sposobu powstawania nadmiaru/amplifikacji w tym regionie: (I) tworzenie jednorodnie barwiącego się regionu (HRS - ang. *Homogenously Stained Region*); (II) obecność punktów pęknięć w pobliżu 11q13, które prowadzą do wzrostu liczby kopii tego regionu; (III) obecność dodatkowych kopii całego chromosomu 11. W regionie zmienionym zidentyfikowano 12 genów, z których pięć: *CCND1*, *ORAOV1*, *FADD*, *PPFIA1*, *CTTN* miało wyższą ekspresję w materiale nowotworowym w porównaniu do prawidłowych kontroli. Poza genem *CCND1*, który ma ustaloną rolę w patogenezie HNSCC pozostałe geny wskazano jako nowe, potencjalne onkogeny powiązane z procesem rozwoju LSCC. Wyniki opublikowano w pracy: Jarmuż-Szymczak M., Pelinska K., Bembnista E., Giefing M., Brauze D., Szaumkessel M., Marszałek A., Janiszewska J., **Kiwerska K.**, Bartochowska A., Grenman R., Szyfter W., Szyfter K. *Heterogeneity of region 11q13 in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines analyzed by microarray platforms and fluorescence in situ hybridization*. Molec. Biol. Reports, 2013, 40 (7): 4161-71. DOI: 10.1007/s11033-013-2496-4.

Badania macierzowe pozwoliły w kolejnych latach na wytypowanie następnych, potencjalnych onkogenów, których rola w przebiegu nowotworów krtani pozostawała nieustalona. W publikacji Bednarek K, **Kiwerska K**, Szaumkessel M, Bodnar M, Kostrzewska-Poczekaj M, Marszałek A, Janiszewska J, Bartochowska A, Jackowska J, Wierzbicka M, Grenman R, Szyfter K, Giefing M, Jarmuż-Szymczak M. *Recurrent CDK1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma*. Tumour Biol. 2016 Feb 24. DOI: 10.1007/s13277-016-4991-4 skupiono się na genie *CDK1*, który należy do rodziny kinaz

serynowo-treoninowych o udowodnionych właściwościach onkogennych, odgrywającym kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego [41]. Nadekspresję genu *CDK1* wykazano analizując profile linii komórkowych LSCC (n=10) i guzów pierwotnych krtani (n=5) z wykorzystaniem danych z macierzy ekspresyjnej. Następnie wyniki te weryfikowano za pomocą PCR w czasie rzeczywistym w grupie 25 linii komórkowych LSCC, gdzie w 9/25 linii potwierdzono wyższą ekspresję niż w próbkach kontrolnych ( $p < 0.05$ ). Zmiany w ekspresji potwierdzono również na poziomie białkowym za pomocą Western blot. Z kolei w badaniu immunohistochemicznym stwierdzono ekspresję białka *CDK1* zarówno w tkance nowotworowej jak i w kontrolach, które stanowiły marginesy chirurgiczne. Z uwagi na fakt istnienia zjawiska kancerogenezy płaszczynowej w rakach krtani wysnuto wniosek, iż zmiana w ekspresji *CDK1* zachodzi na bardzo wczesnych etapach kancerogenezy a marginesy chirurgiczne w tej grupie badanej zawierają komórki, które mogą przekształcić się w komórki nowotworowe. W kolejnym kroku poszukiwano mechanizmu odpowiadającego za zwiększoną ekspresję *CDK1* w rakach krtani, nie stwierdzono jednak znaczącej zmiany liczby kopii genu oraz zmian w sekwencji DNA, poziomie metylacji DNA czy ekspresji miRNA, które mogłyby zostać powiązane z tym procesem. Nie zaobserwowano również zmian w żywotności i proliferacji komórek po wyciszeniu *CDK1*. Stwierdzono natomiast, iż w efekcie wyciszenia *CDK1* 137 genów ulega deregulacji. Z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i PCR w czasie rzeczywistym stwierdzono, iż geny *CDK6*, *CALD1* i *FYN* są potencjalnie zależne od *CDK1*. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy: *Bednarek K, Kostrzewska-Poczekaj M, Ustaszewski A, Janiszewska J, Kiwerska K, Paczkowska J, Grenman R, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. Laryngeal squamous cell carcinoma cell lines show high tolerance for siRNA-mediated CDK1 knockdown. Am J Cancer Res. 2021 May 15;11(5):2081-2094. eCollection 2021.*

Podsumowując tą część badań - zidentyfikowano gen *CDK1* jako silnie amplifikowany w rakach krtani, jednocześnie wskazując, iż badane linie LSCC cechują się znaczną tolerancją na wyciszenie tego genu za pośrednictwem siRNA. Nie można wykluczyć, że geny *CDK6*, *CALD1* i *FYN* kompensują niedobór *CDK1* i utrzymują niezmienną szybkość proliferacji i żywotność komórek raka LSCC.

Innym genem, którego rolę analizowano w przebiegu LSCC był *CRKL*. Gen ten został zidentyfikowany jako silnie amplifikowany i ulegający nadekspresji we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Zakładzie również w oparciu o mikromacierze DNA i RNA [42]. Celem kolejnych badań było sprawdzenie w jakim stopniu dodatkowe kopie genu wpływają na ekspresję białka *CRKL*. Za pomocą barwienia immunohistochemicznego wykazano zmianę ekspresji białka *CRKL* z fizjologicznej - cytoplazmatycznej w kierunku nieprawidłowej - jądrowej w liniach komórkowych LSCC ze zwiększoną liczbą kopii genu. Ponadto wyciszono gen *CRKL* za pomocą siRNA i weryfikowano wpływ tego zdarzenia na żywotność i proliferację komórek. Wykazano, iż po zadziałaniu siRNA zmniejszeniu ulega zarówno proliferacja ( $p < 0.01$ ) jak i migracja ( $p < 0.05$ ) komórek LSCC. Uzyskane wyniki wskazują, że gen *CRKL* mógłby być potencjalnym celem terapeutycznym w grupie chorych z LSCC u których występują dodatkowe kopie tego genu. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracy: *Kostrzewska-Poczekaj M, Bednarek K, Jarmuz-Szymczak M, Bodnar M, Filas V, Marszałek A, Bartochowska A, Grenman R, Kiwerska K, Szyfter K, Giefing M. Copy number gains of the putative CRKL oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma result in strong nuclear expression of the protein and influence cell proliferation and migration. Sci Rep. 2020 Jan 8;10(1):24. DOI: 10.1038/s41598-019-56870-5.*

### **Rola receptora Ah w nowotworach krtani**

Badania dotyczące znaczenia receptora Ah w nowotworach LSCC, w które byłam zaangażowana realizowane były w ramach grantu badawczego, pt. "Wpływ wyciszenia ekspresji zależnych od receptora Ah genów metabolizujących ksenobiotyki na toksyczne i mutagenne właściwości B(a)P, badany w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów krtani" (MNiSzW, nr N N405 273437, kierownik dr hab. Damian Brauze, gdzie byłam wykonawcą). Pierwsze badania dotyczące tego zagadnienia, miały na celu zbadanie wpływu podania  $\beta$ -naftoflwonu (BNF - liganda AhR) na sam receptor oraz na ekspresję genów przez niego regulowanych, tj. *AhRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *NQO1*, *GSTA1*, *ALDH3A1* i *UGT1A*. Geny te kodują enzymy metabolizujące ksenobiotyki. Ich

funkcją jest aktywacja (enzymy I fazy) a następnie detoksykacja (enzymy II fazy) tych substancji. Badania ekspresji genów prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym w 13 liniach komórkowych LSCC wyprowadzonych od pacjentów palących papierosy oraz w linii raka wątrobokomórkowego HepaRG (kontrola pozytywna). Obserwowano znaczne różnice w ekspresji genów regulowanych przez AhR pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi po indukcji BNF. W linii komórkowej UT-SCC-50 traktowanie BNF nie przyniosło zmian w ekspresji genów kontrolowanych przez AhR, stąd wysnuto wniosek, iż ścieżka ta nie działa prawidłowo w tej linii komórkowej. Nie obserwowano korelacji pomiędzy poziomem ekspresji *AhR* a indukcją ekspresji genów I fazy z rodziny *CYP1* po podaniu BNF, stąd szukano innego mechanizmu, który mógłby odpowiadać za zróżnicowaną indukcję ekspresji genów zależnych od Ah. W tym celu przeprowadzono i przeanalizowano metylację sekwencji LINE-1 retrotranspozonu. Wykryto ujemną korelację pomiędzy metylacją DNA a indukowaną przez BNF ekspresją *CYP1A1* w badanych liniach LSCC i uznano, że ten mechanizm ma dominujący wpływ na indukcję w/w genów. Wykazano również brak lub bardzo niski poziom ekspresji genów II fazy (*GSTA1* i *UGT1A1*), co wskazywało na nieefektywny mechanizm detoksykacji w badanych liniach komórkowych. Dalsze analizy pozwoliły stwierdzić, iż przyczyną tego może być odróżnicowanie komórek podczas kancerogenezy. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: Brauze D., Fijalkiewicz K., Szaumkessel M., **Kiwerska K.**, Bednarek K., Rydzanicz M., Richter J., Grenman R., Jarmuz-Szymczak M. *Diversified expression of aryl hydrocarbon receptor dependent genes in human laryngeal squamous cell carcinoma treated with  $\beta$ -naphthoflavone*. *Toxicology Letters*, 2014, 231 (1): 99-107. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.09.005.

Następnie wykonano macierzowe profilowanie ekspresyjne w zróżnicowanej i niezróżnicowanej linii komórkowej HepaRG, aby ocenić globalny wpływ BNF na ekspresję genów regulowanych przez receptor Ah. Aby udowodnić, że zmiany w ekspresji genów wywołane przez BNF są rzeczywiście zależne od *AhR*, receptor wyciszono poprzez stabilną transfekcję komórek HepaRG z shRNA. W kolejnym kroku za pomocą PCR w czasie rzeczywistym zweryfikowano ekspresję zmienionych genów. Wykazano, iż profile ekspresji genów zależnych od AhR są odmienne pomiędzy zróżnicowanymi i niezróżnicowanymi komórkami HepaRG a geny zaangażowane w metabolizm ksenobiotyków stanowią niewielką część genów regulowanych przez receptor. Wskazano, iż AhR uczestniczy również w indukcji genów związanych z regulacją apoptozy lub zaangażowanych w proliferację a także pośredniczy w wyciszaniu genów związanych z adhezją komórek. Do najsilniej indukowanych genów, niezwiązanych z metabolizmem kancerogenów należały: *SERPINB2*, *STC2*, *ARL4C* oraz *TIPARP*. Uzyskane wyniki podkreśliły znaczenie receptora Ah nie tylko w inicjacji ale także w progresji nowotworów i zostały opublikowane w pracy: Brauze D., Zawierucha P., **Kiwerska K.**, Bednarek K., Oleszak M., Rydzanicz M., Jarmuz-Szymczak M. *Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with  $\beta$ -naphthoflavone*. *Mol Cell Biochem*. 2017 Jan;425(1-2):59-75. DOI: 10.1007/s11010-016-2862-3.

Badania dotyczące genów regulowanych przez receptor Ah były następnie kontynuowane i dotyczyły genu *SERPINB2* a powstała w ich wyniku publikacja została włączona do cyklu habilitacyjnego (P3).

### **Polimorfizmy genów w HNSCC**

Warianty sekwencji (polimorfizmy) obecne w genach naprawy mogą zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu wskutek nieefektywnego działania tego mechanizmu. W ramach współpracy z prof. Januszem Błasiakiem (Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki) wykonano genotypowanie wariantów sekwencji genów naprawy w próbkach DNA wyizolowanych z krwi obwodowej od 253 pacjentów z rakiem krtani oraz 253 próbkach kontrolnych krwi pobranych od osób bez stwierdzonego nowotworu. Zastosowano technikę PCR-RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Badano następujące warianty SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*): rs25487 w genie *XRCC1*, rs1800067 w genie *ERCC4*, rs718282 oraz rs3218536 w genie *XRCC2*, rs1801320 w genie *RAD51*. Badane geny należały do następujących

systemów naprawy: naprawa przez wycinanie zasady BER - gen *XRCC1*, naprawa przez wycięcie nukleotydu NER - gen *ERCC4*, naprawa przez homologiczną rekombinację HRR - geny *XRCC2* i *RAD51*. W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż jedynie wariant genu *RAD51* jest związany z ryzykiem rozwoju raka krtani u pijących i palących pacjentów polskich. Wyniki uzyskane w trakcie tych badań zostały opublikowane w dwóch pracach: Krupa R, Kasznicki J, Gajęcka M, Rydzanicz M, **Kiwerska K**, Kaczmarczyk D, Olszewski J, Szyfter K, Blasiak J, Morawiec-Sztandera A. *Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC4 are not associated with smoking- and drinking-dependent larynx cancer in a Polish population. Exp Oncol. 2011 Mar;33(1):55-6* oraz Romanowicz-Makowska H., Smolarz B., Gajęcka M., **Kiwerska K.**, Rydzanicz M., Kaczmarczyk D., Olszewski J., Szyfter K., Blasiak J., Morawiec-Sztandera A. *Polymorphism of the DNA repair genes RAD 51 and XRCC2 in the DNA Repair Gene XRCC1 and smoking- and drinking-related laryngeal cancer in a Polish population. Archives of Medical Sci., 2012, 8 (6): 1065-1075. DOI: 10.5114/aoms.2012.32417.*

W nurt badań dotyczących podatności na rozwój HNSCC wpisują się również doświadczenia opisane w pracy Skalski M, Ustaszewski A, Jaskiewicz K, **Kiwerska K**, Wierzbicka M, Klimza H, Grenman R, Giefing M. *Single nucleotide polymorphism rs11614913 associated with CC genotype in miR-196a2 is overrepresented in laryngeal squamous cell carcinoma, but not salivary gland tumors in Polish population. J Appl Genet. 2018 Apr 29. doi: 10.1007/s13353-018-0445-6.* W przeprowadzonych badaniach skupiono się nad polimorfizmem rs11614913 zlokalizowanym w miR-196a2. Obecność genotypu CC powiązano z wystąpieniem nadekspresji tego onkogenego microRNA. Z wykorzystaniem sekwencjonowania Sangera przeprowadzono genotypowanie tej zmiany w grupie 40 pacjentów z LSCC oraz 60 pacjentów ze zdiagnozowanym guzem w obrębie ślinianki (SGT - ang. *Salivary Gland Tumor*). Dysponowano także danymi z grupy kontrolnej bazy POLGENOM (n=126). Badanie potwierdziło, iż genotyp CC występuje istotnie częściej u pacjentów z rakiem krtani (p<0.05). Dodatkowo wykonano genotypowanie w 16 liniach komórkowych LSCC, dla których dysponowano profilami ekspresji miRNA. Potwierdzono, iż obecność genotypu CC wiąże się z istotnie wyższą ekspresją miR-196a2 w porównaniu do genotypu TT (p<0.05). Z kolei w grupie chorych z SGT nie znaleziono różnic w rozkładzie genotypów w porównaniu do grupy kontrolnej POLGENOM. Podsumowując, z przeprowadzonych badań wynika, że polimorfizm rs11614913 może być czynnikiem predysponującym do rozwoju LSCC w populacji polskiej.

Wszystkie badania prowadzone w powyżej opisanych tematach były realizowane we współpracy z prof. Reidarem Grenmanem (Klinika Otorinolaryngologii-Chirurgii Głowy i Szyi, Uniwersytetu i Szpitala w Turku, Finlandia), który przekazał linie komórkowe wyprowadzone z nowotworów HNSCC i/lub z prof. Małgorzatą Wierzbicką (Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu), dzięki której dysponowaliśmy materiałem do badań pozyskany od operowanych pacjentów wraz z danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Dzięki tym współpracom stworzyliśmy w Zakładzie bank materiału genetycznego obejmujący linie komórkowe, guzy, krew, osocze pochodzące od pacjentów z nowotworami HNSCC wraz z danymi klinicznymi oraz histopatologicznymi.

## **Inne kierunki badawcze**

### **Metodyka badań w diagnostyce chorób nowotworowych**

Od 2016 roku pełnię funkcję kierownika Pracowni Biologii Molekularnej w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Moja praca w tej jednostce polega przede wszystkim na wykonywaniu badań molekularnych u pacjentów: (I) niezbędnych podczas diagnostyki różnicowej (np. rearanżacje w obrębie genów *BCL2*, *BCL6*, *MYC* w niektórych chłoniakach), (II) o znaczeniu prognostycznym dla pacjentów (np. kodelecja 1p/19q czy mutacje *IDH1/IDH2* w glejakach), (III) mających znaczenie w predykcji odpowiedzi na leczenie (m.in. mutacje *BRAF* w czerniaku, mutacje *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* w raku jelita grubego, amplifikacja *HER2* w raku piersi).



Ponadto staram się wykorzystać swoje doświadczenia związane z opracowywaniem protokołów do badań diagnostycznych dla pacjentów i przedstawić je w postaci publikacji, które mogą posłużyć innym do opracowania własnych protokołów badawczych. I tak w publikacji: **Kiwerska K, Wroblewska J, Kaluzna A, Marszalek A. Justification of direct Sanger sequencing application for detection of KIT and PDGFR $\alpha$  gene mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from gastrointestinal stromal tumours. J Clin Pathol. 2020 Apr;73(4):213-219. DOI: 10.1136/jclinpath-2019-206225** porównałam przydatność technik opartych na PCR w czasie rzeczywistym i sekwencjonowania Sangera do wykrywania mutacji w genach *KIT* i *PDGFR $\alpha$*  w 41 próbkach guzów GIST (ang. *Gastrointestinal Stromal Tumor* - guz podścieliska przewodu pokarmowego), utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE - ang. *Formalin Fixed, Paraffin Embedded*). Techniki oparte na PCR w czasie rzeczywistym obejmowały analizę HRM (ang. *High Resolution Melting* - analiza topnienia w wysokiej rozdzielczości) oraz wykorzystanie komercyjnie dostępnego zestawu do analizy wybranych mutacji (Entrogen, USA). Przeprowadzone badania pokazały duże rozbieżności pomiędzy liczbą wykrywanych wariantów: analiza HRM i sekwencjonowanie Sangera pokazały zbieżne wyniki, podczas gdy zestaw komercyjny pozwolił na wykrycie zdecydowanie mniejszej liczby wariantów (50%). Przeprowadzone badania wykazały, iż w próbkach GIST, które charakteryzują się szerokim spektrum delecji, sekwencjonowanie Sangera jest bardzo dobrą i czułą metodą wykrywania wariantów sekwencji w genach *KIT* i *PDGFR $\alpha$* . A zestaw komercyjny zaprojektowany pod wybrane zmiany uniemożliwia wykrycie wszystkich istotnych wariantów patogennych. Uzyskane wyniki są cenne w kontekście użyteczności diagnostycznej, gdyż zmiany w badanych genach są oznaczane u pacjentów z nieoperacyjnym lub rozsianym GIST przed leczeniem inhibitorami kinaz.

#### **Badanie zmian leżących u podstaw nowotworów hematologicznych**

W ostatnich latach zaangażowałam się równolegle w badania dotyczące nowotworów hematologicznych: klasycznego chłoniaka Hodgkina (cHL – ang. *classic Hodgkin Lymphoma*) oraz zespołów mielodysplastycznych (MDS - ang. *Myelodysplastic Syndrome*). Badania nad podłożem genetycznym chłoniaka Hodgkina są realizowane w Zakładzie Genetyki Nowotworów IGCz PAN od wielu lat pod kierownictwem prof. Macieja Giefinga. W wyniku tych badań zidentyfikowano m.in. czynniki transkrypcyjne charakterystyczne dla limfocytów B (ang. *B-cell specific*), których utrata prowadzi do utraty fenotypu B przez komórki Hodgkina i Reed-Sternberga (tzw. komórki HRS) a w efekcie do rozwinięcia fenotypu cHL. Jednym ze zidentyfikowanych czynników transkrypcyjnych, który ulega utracie w przebiegu tej choroby jest *ELF1* (ETS-Related Transcription Factor Elf-1). W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano brak lub bardzo niską ekspresję białka *ELF1* w komórkach HRS (31/35 przypadków (89%)) w porównaniu do prawidłowych komórek nacieku limfatycznego (ang. *bystander cells*) oraz istotne obniżenie ekspresji mRNA w liniach komórkowych cHL w porównaniu do linii komórkowych chłoniaków nieziarnicznych ( $p < 0.01$ ). Kolejne badania wykazały, że w 4/7 linii komórkowych cHL (57%) zniesienie ekspresji *ELF1* jest wywołane delecjami heterozygotycznymi współlistniejącymi z metylacją DNA w promotorze genu. Hipermetylacja DNA obserwowana była we wszystkich siedmiu badanych liniach komórkowych cHL i wynosiła średnio 98%. Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy: **Paczkowska J, Soloch N, Bodnar M, Kiwerska K, Janiszewska J, Vogt J, Domanowska E, Martin-Subero JJ, Ammerpohl O, Klapper W, Marszalek A, Siebert R, Giefing M. Expression of ELF1, a lymphoid ETS domain-containing transcription factor, is recurrently lost in classical Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 2019 Apr;185(1):79-88. DOI: 10.1111/bjh.15757.**

Z kolei tematyka podłoża genetycznego zespołów mielodysplastycznych pojawiła się w kręgu moich zainteresowań dzięki współpracy naukowej z prof. dr hab. Lidią Gil (Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu). MDS to grupa klonalnych nowotworów hematologicznych, charakteryzujących się obecnością cytopenii wynikającej z nieskutecznej hematopozy, wieloliniową dysplazją oraz wysokim ryzykiem przekształcenia we wtórną ostrą białaczkę szpikową (AML - ang. *Acute Myeloid Leukemia*). Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji (NGS - ang. *Next Generation Sequencing*) zidentyfikowano wiele genów, m.in. zaangażowanych w splicing mRNA, metylację DNA, modyfikację histonów, i in.,

których zmiany molekularne powiązano z rozwojem zespołów mielodysplastycznych [43]. Z uwagi na ryzyko rozwinienia AML na podłożu MDS, monitorowanie choroby resztkowej w oparciu o zmiany molekularne jest istotnym elementem procesu terapeutycznego. W prowadzonych badaniach sprawdzano przydatność diagnostyczną różnych technik molekularnych do monitorowania dynamiki zmian w próbkach szpiku kostnego, krwi obwodowej i śliny pobranych od pacjenta z MDS, u którego nastąpiła progresja do AML. W próbkach pobranych od pacjenta na etapie MDS zidentyfikowano zmiany, które opisywane były jako występujące w AML: c.4044+2dupT w genie *TET2* oraz c.1945G>T w genie *ASXL1*. W związku z uzyskanymi wynikami zaproponowano aby NGS był techniką stosowaną z wyboru do wykrywania wariantów sekwencji we wczesnym MDS a wykryty profil zmian powinien być monitorowany w trakcie leczenia. Wyniki tych badań opublikowano w pracy: *Adamska MM, Kowal-Wiśniewska E, Kiwerska K, Ustaszewski A, Czerwińska-Rybak J, Kandula Z, Wojtaszewska M, Barańska M, Pruchniewski Ł, Lewandowski K, Jarmuż-Szymczak M, Gil L. New genetic variants of TET2 and ASXL1 identified by next generation sequencing and pyrosequencing in a patient with MDS-RS-MLD and secondary acute myeloid leukemia. Cent Eur J Immunol. 2021;46(4):524-530. DOI: 10.5114/ceji.2021.111166.*

## Plany

Moje najbliższe plany naukowe koncentrują się wokół gruczolaków wielopostaciowych ślinianek (PA), w dwóch aspektach: I) identyfikacja podłoża genetycznego tych guzów oraz II) dalsza identyfikacja zmian różnicujących PA szybko rosnące od wolno rosnących (część wyników opublikowana została w publikacji włączonej do cyklu habilitacyjnego (P5)).

W ostatnim czasie wykonaliśmy całogenomową analizę metylacji DNA w materiale wyizolowanym z siedmiu nienowotworowych fragmentów ślinianek, wyniki której w połączeniu z wynikami uzyskanymi wcześniej dla guzów PA pozwolą na ustalenie pełnego profilu metylacji DNA w gruczolakach wielopostaciowych (dane są w trakcie analizy bioinformatycznej). Również w ostatnim czasie mieliśmy możliwość wykonania całoksomowego sekwencjonowania dziewięciu guzów PA (WES - ang. *Whole Exome Sequencing*). Badanie wykonano w Innowacyjnym Centrum Medycznym zlokalizowanym przy Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych zidentyfikowano 23 inaktywujące warianty sekwencji w genach kodujących białka. W dwóch genach (*GOLGA5* i *POT1*) potwierdzono, iż zidentyfikowane warianty mają pochodzenie somatyczne a ekspresja obu genów jest istotnie obniżona w guzach PA w porównaniu do prawidłowych ślinianek. Zachęcona tymi wynikami planuję kontynuować analizę wariantów w w/w genach poprzez sekwencjonowanie ich sekwencji kodujących w powiększonej grupie gruczolaków wielopostaciowych.

Jeśli chodzi o dalszą identyfikację zmian różnicujących PA szybko rosnące od wolno rosnących to planuję w najbliższym czasie złożyć wniosek grantowy oparty o wykorzystanie techniki transkryptomiki przestrzennej do zwizualizowania zmian w ekspresji genów w zależności od klinicznego przebiegu PA.

## Podsumowanie współpracy naukowej

W trakcie mojej pracy naukowej współpracowałam lub współpracuję z następującymi ośrodkami naukowymi:

1. Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań  
*prof. dr hab. n. med. Małgorzata Wierzbicka, wcześniej prof. dr hab. n. med. Witold Szyfter*

Współpraca z prof. Wierzbicką trwa od początku mojej pracy naukowej, zaowocowała wieloma publikacjami, wystąpieniami i projektami dotyczącymi genetycznego podłoża nowotworów głowy i szyi. Zaowocowała również stworzeniem w Zakładzie opisanej i scharakteryzowanej klinicznie kolekcji

próbek DNA i RNA wyizolowanych od pacjentów z tymi nowotworami - zarówno z guza jak i z krwi obwodowej oraz osocza. Wyniki uzyskane w trakcie tej współpracy były zarówno podstawą mojej pracy doktorskiej jaki i osiągnięcia habilitacyjnego.

2. Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów, Szpital Uniwersytecki w Mainz, Niemcy, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany  
*Prof. Dr. Jürgen Brieger*

W ramach współpracy z dr Briegerem odbyłam 3-miesięczny staż naukowy (19.09.2002 – 20.12.2002r.) w kierowanym przez niego Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów. Badania, które prowadziłam w trakcie stażu dotyczyły analizy utraty heterozygotyczności w guzach krtani, marginesie operacyjnym oraz tkankach otaczających a wyniki uzyskane w trakcie pobytu zostały opublikowane w czasopiśmie Medical Science Monitor oraz weszły w skład mojej pracy doktorskiej.

3. Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, ul. Świącickiego 4, 60-781 Poznań  
*dr hab. n. farm. Jarosław Paluszczak*

Współpraca z dr hab. Jarosławem Paluszczakiem dotyczyła badania metylacji DNA w wybranych genach szlaków Wnt i Shh oraz powiązania zmian w metylacji DNA z występowaniem raków głowy i szyi. Wyniki uzyskane w ramach tej współpracy zostały opublikowane w trzech manuskryptach.

4. Zakład Patomorfologii Klinicznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz  
*prof. dr hab. Andrzej Marszałek/dr hab. Magdalena Bodnar*
5. Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań  
*prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek*

Współpraca z prof. Marszałkiem i dr Bodnar obejmuje przede wszystkim aspekty morfologicznej oceny badanych guzów nowotworowych, wykonywanie oznaczeń immunohistochemicznych oraz analizę ekspresji białek w preparatach tkankowych. Wyniki uzyskane w ramach tej współpracy zostały przedstawione w dziewięciu publikacjach. Ponadto, pracując aktualnie w Zakładzie Patologii Nowotworów WCO mam możliwość zdobywania praktycznej wiedzy z zakresu onkologii i patologii, którą mogę wykorzystywać w prowadzonych badaniach naukowych.

6. Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań  
*prof. dr hab. Lidia Gil*

Współpraca z prof. Gil dotyczy przede wszystkim poszukiwania zmian genetycznych powiązanych z progresją zespołów mielodysplastycznych do ostrych białaczek szpikowych. W wyniku tej współpracy opublikowana została jedna praca a dalsze badania są w toku. Natomiast uzyskane w ramach tej współpracy wyniki prezentowane ustnie czy też w formie plakatu na konferencjach zdobyły łącznie cztery nagrody za najlepsze prezentacje.

## Piśmiennictwo

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slotweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017. WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 9
2. Szyfter K. Molekularne podstawy kancerogenezy w nowotworach głowy i szyi. W „Nowotwory w otolaryngologii”. Pod redakcją Witolda Szyftera. Wydanie II uaktualnione. 2015. Termedia Wydawnictwa Medyczne. ISBN: 978-83-7988-239-7.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
4. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 02.11.2022.
5. Lassen P. The role of Human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. *Radiother Oncol*. 2010 Jun;95(3):371-80. doi: 10.1016/j.radonc.2010.04.022. Epub 2010 May 20.
6. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov 26;6(1):92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.
7. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020. Feb;8(2):e180-e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17.
8. Szyfter K. Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. *Postępy w chirurgii głowy i szyi*, 2002; 1: 5-19.
9. Brauze D, Fijalkiewicz K, Szaumkessel M, Kiwerska K, Bednarek K, Rydzanicz M, Richter J, Grenman R, Jarmuz-Szymczak M. Diversified expression of aryl hydrocarbon receptor dependent genes in human laryngeal squamous cell carcinoma cell lines treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Toxicol Lett*. 2014 Nov 18;231(1):99-107. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.09.005. Epub 2014 Sep 8.
10. Brauze D, Zawierucha P, Kiwerska K, Bednarek K, Oleszak M, Rydzanicz M, Jarmuz-Szymczak M. Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Mol Cell Biochem*. 2017 Jan;425(1-2):59-75. doi: 10.1007/s11010-016-2862-3. Epub 2016 Oct 28.
11. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Gajęcka M, Kiwerska K, Rydzanicz M, Kaczmarczyk D, Olszewski J, Szyfter K, Błasiak J, Morawiec-Sztandera A. Polymorphism of the DNA repair genes RAD51 and XRCC2 in smoking- and drinking-related laryngeal cancer in a Polish population. *Arch Med Sci*. 2012 Dec 20;8(6):1065-75. doi: 10.5114/aoms.2012.32417. Epub 2012 Dec 19.
12. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2488-92.
13. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576–582 (2015). This paper provides a comprehensive description of the genomic landscape of human HNSCC tumours.
14. Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol*. 2013 Nov;108(6):387-97. doi: 10.1002/jso.23406.
15. Wierzbicka M. Nowotwory jamy ustnej. W „Nowotwory w otolaryngologii”. Pod redakcją Witolda Szyftera. Wydanie II uaktualnione. 2015. Termedia Wydawnictwa Medyczne. ISBN: 978-83-7988-239-7.
16. Nowak K, Wierzbicka M, Szyfter W. Nowotwory krtani. W „Nowotwory w otolaryngologii”. Pod redakcją Witolda Szyftera. Wydanie II uaktualnione. 2015. Termedia Wydawnictwa Medyczne. ISBN: 978-83-7988-239-7.
17. Alshafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, Tavassoli M. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019 Jul 15;10(8):540. doi: 10.1038/s41419-019-1769-9.
18. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094.
19. Wierzbicka M, San Giorgi MRM, Dikkers FG. Transmission and clearance of human papillomavirus infection in the oral cavity and its role in oropharyngeal carcinoma - A review. *Rev Med Virol*. 2022 Feb 22:e2337. doi: 10.1002/rmv.2337. Online ahead of print.

20. Latsuzbaia, A.; Wienecke-Baldacchino, A.; Tapp, J.; Arbyn, M.; Karabegović, I.; Chen, Z.; Fischer, M.; Mühlischlegel, F.; Weyers, S.; Pesch, P.; et al. Characterization and Diversity of 243 Complete Human Papillomavirus Genomes in Cervical Swabs Using Next Generation Sequencing. *Viruses* 2020, 12, 1437.
21. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):709-20. doi: 10.1093/jnci/92.9.709.
22. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):260-5. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.046. Epub 2009 Jan 8.
23. Sobiech K. Wykrywanie wirusów HPV w nowotworach głowy i szyi. Praca magisterska wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN pod kierunkiem dr Katarzyny Kiwerskiej. 11.06.2013r.
24. Wierzbicka M, Kopec T. Nowotwory gruczołów ślinowych. W „Nowotwory w otolaryngologii”. Pod redakcją Witolda Szyftera. Wydanie II uaktualnione. 2015. Termedia Wydawnictwa Medyczne. ISBN: 978-83-7988-239-7.
25. Piwowarczyk K, Bartkowiak E, Kosikowski P, Chou JT, Wierzbicka M. Salivary Gland Pleomorphic Adenomas Presenting With Extremely Varied Clinical Courses. A Single Institution Case-Control Study. *Front Oncol.* 2021 Jan 8;10:600707. doi: 10.3389/fonc.2020.600707. eCollection 2020.
26. Giefing M, Martin-Subero JI, Kiwerska K, Jarmuz M, Grenman R, Siebert R, Szyfter K. Characterization of homozygous deletions in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Jul;184(1):38-43. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.03.004.
27. Rosenthal M, Huang B, Katabi N, Migliacci J, Bryant R, Kaplan S, Blackwell T, Patel S, Yang L, Pei Z, Tang YW, Ganly I. Detection of HPV related oropharyngeal cancer in oral rinse specimens. *Oncotarget.* 2017;8(65): 109393–401.
28. Guimerà N, Lloveras B, Lindeman J, Alemany L, van de Sandt M, Alejo M, Hernandez-Suarez G, Bravo IG, Molijn A, Jenkins D, Cubilla A, Muñoz N, de Sanjose S, Bosch FX, Quint W. RIS HPV TTHPV VVAPO study groups. The occasional role of low-risk human papillomaviruses 6, 11, 42, 44, and 70 in anogenital carcinoma defined by laser capture microdissection/PCR methodology: results from a global study. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(9): 1299–310
29. Talia KL, Rahimi S, Hawkes D, McCluggage WG. HPV42-associated Seborrhoeic Keratosis-like Lesion of the Cervix: First Reported Case With High-grade Morphology. *Int J Gynecol Pathol.* 2022 Nov 1;41(6):649-654. doi: 10.1097/PGP.0000000000000835. Epub 2021 Nov 12.
30. Abel J, Haarmann-Stemmann T (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391:1235–1248. doi:10.1515/BC.2010.128
31. Shii L, Song L, Maurer K, Zhang Z, Sullivan KE. SERPINB2 is regulated by dynamic interactions with pause-release proteins and enhancer RNAs, *Mol. Immunol.* 88 (2017) 20–31.
32. Szyfter K, Hemminki K, Szyfter W, Szmaja Z, Banaszewski J, Yang K. Aromatic DNA adducts in larynx biopsies and leukocytes. *Carcinogenesis.* 1994 Oct;15(10):2195-9. doi: 10.1093/carcin/15.10.2195.
33. Piotrowski, I.; Zhu, X.; Saccon, T.; Ashiqueali, S.; Schneider, A.; Nunes, A.d.C.; Noureddine, S.; Sobecka, A.; Barczak, W.; Szewczyk, M.; et al. miRNAs as Biomarkers for Diagnosing and Predicting Survival of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancers* 2021, 13, 3980.
34. Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer,* 1953; 6: 953-71.
35. Cerami E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012. PMID: 22588877
36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013 Apr 2;6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
37. Janiszewska J, Szaumkessel M, Kostrzevska-Poczekaj M, Bednarek K, Paczkowska J, Jackowska J, Grenman R, Szyfter K, Wierzbicka M, Giefing M, Jarmuz-Szymczak M. Global miRNA Expression Profiling Identifies miR-1290 as Novel Potential oncomiR in Laryngeal Carcinoma. *PLoS One.* 2015 Dec 22;10(12):e0144924. doi: 10.1371/journal.pone.0144924. eCollection 2015.
38. Alter BP: Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 53: 99-110, 1996.
39. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors.* 2013 Feb;31(1):1-31. doi: 10.3109/08977194.2012.752737. Epub 2012 Dec 21.

40. Jarmuz M, Grenman R, Golusinski W, Szyfter K. Aberrations of 11q13 in laryngeal squamous cell lines and their prognostic significance. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jul 1;160(1):82-8. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.12.006.
41. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 1995;17(6):471–80.
42. Kostrzewska-Poczekaj M, Giefing M, Jarmuz M, Brauze D, Pelinska K, Grenman R, Bartochowska A, Szyfter W, Szyfter K Recurrent amplification in the 22q11 region in laryngeal squamous cell carcinoma results in overexpression of the CRKL but not the MAPK1 oncogene. *Cancer Biomark.* 2010-2011;8(1):11-9. doi: 10.3233/DMA-2011-0814
43. Spaulding TP, Stockton SS, Savona MR. The evolving role of next generation sequencing in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2020 Jan;188(2):224-239. doi: 10.1111/bjh.16212. Epub 2019 Oct 1.

## 6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.

### **Osiągnięcia dydaktyczne:**

Podczas mojej pracy pełniłam funkcję promotora jednej pracy magisterskiej i jednej pracy inżynierskiej oraz sprawowałam opiekę nad wykonaniem pięciu prac magisterskich i dwóch prac inżynierskich.

#### *Promotor pracy magisterskiej:*

Katarzyna Sobiech

„Wykrywanie wirusa HPV w nowotworach głowy i szyi”.

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Biotechnologia - Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Poznań 2013r.

#### *Promotor pracy inżynierskiej:*

Marcin Drzewiecki

„Optymalizacja i analiza ekspresji genu *EXO1* w nowotworach krtani”.

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Biotechnologia - Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Poznań 2018r.

#### Opiekun prac magisterskich i inżynierskich:

Anna Sowińska (2005) – praca magisterska

Agata Antkowiak (2006) – praca magisterska

Martyna Pastok (2006) – praca magisterska

Katarzyna Sobiech (2013) – praca magisterska

Katarzyna Pielaszkiewicz (2015) – praca magisterska

Ewelina Kowal (2016) – praca inżynierska

Ewelina Kowal (2018) – praca magisterska

Jagoda Pieczyńska (2018) - praca inżynierska

Aktualnie pełnię funkcję opiekuna i promotora pracy magisterskiej pana Macieja Bodyła, studenta V roku Biotechnologii na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Temat realizowanej pracy magisterskiej: „*Analiza ekspresji wybranych genów w gruczolakach wielopostaciowych ślinianek*”. Planowana obrona – czerwiec 2023r.

### **Inne osiągnięcia dydaktyczne:**

- w latach 2001-2002 sprawowałam opiekę nad pracami cytogenetycznymi Studenckiego Koła Naukowego Kliniki Laryngologii w Poznaniu
- w latach 2003-2006 miałam wykłady w ramach seminariów dla studentów IV r. Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu
- sprawowałam opiekę nad stażystami:
  - p. Moniką Grzonką, studentką UP w Poznaniu (2014; 1-mies. praktyka wakacyjna)
  - p. Daniłem Ałtuninem i p. Marcinem Skalskim w ramach projektu „Studia na Biotechnologii i Ochronie Środowiska UAM drogą do sukcesu zawodowego” (07/08.2015)
  - p. Ewelina Kowal w ramach projektu „Studiujesz – praktykuj. Program stażowy dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii UP w Poznaniu” (01.2017)
- miałam wykład na zaproszenie Koła Naukowego Studentów Biotechnologii „OPERON” UP w Poznaniu pt. „Inaktywacja genu *FAM107A* w płaskonabłonkowym raku krtani” (6.11.2017)
- przedstawiłam dwa wykłady dla doktorantów Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w IGCz PAN (3.11.2021)
  - „Viral related carcinogenesis”
  - „Modern diagnostics of solid tumors”
- w latach 2014-2022 byłam recenzentem 10 prac magisterskich realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym UMP w Poznaniu
  - Ewelina Kiper (2014)
  - Mariusz Gronkowski (2015)
  - Kinga Wojtek (2016)
  - Katarzyna Gafka (2017)
  - Agnieszka Szymko (2017)
  - Marek Kwaśniewski (2018)
  - Szymon Piecuch (2019)
  - Karolina Mazur (2020)
  - Maria Marcysiak (2021)
  - Barbara Krüger (2022)

### **Osiągnięcia organizacyjne:**

- w trakcie mojej pracy naukowej pełniłam funkcję kierownika dwóch projektów badawczych, realizowanych w Instytucie Genetyki Człowieka PAN:

#### *Narodowe Centrum Nauki*

Konkurs: Miniatura-2

Nr grantu: 2018/02/X/NZ5/00365

Tytuł: Kompleksowa analiza ekspresji i metylacji łagodnych guzów ślinianek

Czas trwania projektu: 15.09.2018 – 14.09.2019r.

#### *Komitet Badań Naukowych/Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego*

Konkurs: Grant młodego badacza

Nr grantu: 3PO5A07522

Tytuł: Analiza utraty heterozygotyczności (LOH) w 3 loci mikrosatelitarnych na ramieniu 13q. Porównanie utraty alleli w materiale tkanki nowotworowej, tkanki marginesu i zdrowej błony śluzowej w preparatach od chorych z płaskonabłonkowym rakiem krtani  
Czas trwania projektu: 16.04.2002 – 30.06.2003r.

- od 2016 roku pełnię funkcję kierownika Pracowni Biologii Molekularnej w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Działalność moja polega na organizacji pracy laboratorium, wdrażaniu technik biologii molekularnej do diagnostyki i predykcji chorób nowotworowych na podstawie najnowocześniejszych danych naukowych

#### 7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE Podać INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

##### **Otrzymane nagrody i wyróżnienia:**

- nagroda zespołowa Wydziału Nauk Medycznych PAN za cykl 5 prac dotyczących utraty genów supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani (dr hab. Maciej Giefing, dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak, dr Magdalena Kostrzewska-Poczekaj, **dr Katarzyna Kiwerska**) - 11.12.2019, Warszawa.
- II miejsce w sesji konkursowej za prezentację „Analysis of *TET2* gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes”. Adamska M, Kowal E, **Kiwerska K**, Ustaszewski A, Paczkowska J, Czerwińska-Rybak J, Jarmuż-Szymczak M, Gil L. XVIII International Congress of Young Medical Scientists, Oncology, Hematology and Radiotherapy Session, Poznań 16.06.2018r.
- I miejsce w sesji konkursowej za prezentację „Polymorphism of *TET2*, *DMNT3A*, *RUNX1* genes in patients with myelodysplastic syndromes”. Gronowska W, Loba J, Adamska M, Kowal E, **Kiwerska K**, Ustaszewski A, Czerwińska-Rybak J, Jarmuż-Szymczak M, Gil L. 20th International Congress of Young Medical Scientists, Poznań 28-30.05.2020r.
- I miejsce w sesji konkursowej za prezentację „Polymorphism of *TET2* gene mutations in Polish patients with myelodysplastic syndromes”. Adamska M, Kowal E, **Kiwerska K**, Ustaszewski A, Paczkowska J, Czerwińska-Rybak J, Jarmuż-Szymczak M, Gil L. „3rd International Medical Interdisciplinary Congress Medicine Sciences”, Bydgoszcz 09.06.2018r.
- I miejsce w sesji konkursowej onkologia i medycyna paliatywna za pracę „Analiza mutacji genu *TET2* występujących u chorych z zespołem mielodysplastycznym”. Adamska M, Kowal E, **Kiwerska K**, Ustaszewski A, Paczkowska J, Czerwińska-Rybak J, Gil L, Jarmuż-Szymczak M. „Magis in Medicinae III”, Poznań 19.05.2018r.
- I nagroda za plakat pt. „Targeted next-generation sequencing of selected genes in patients with myelodysplastic syndromes” Autorzy: Kowal E, **Kiwerska K**, Ustaszewski A, Paczkowska J, Adamska M, Pruchniewski Ł, Czerwińska- Rybak J, Komarnicki M, Gil L, Jarmuż-Szymczak M. II Ogólnopolskie Sympozjum Nauk Przyrodniczo-Rolniczych, Poznań 7-8.04.2018r.
- I nagroda za plakat pt. „Geny ze ścieżki Fanconiego *USP1*, *UBE2T*, *CHK1*, *ATR*, *RPA*, *MRE11*, *FANCG*, *FANCI/BRIP1*, *FANCN/PALB2* w kontekście patogenezy raka krtani”. Autorzy: Szaumkessel M, Kiwerska K, Pelińska K, Szyfter K. XIV Sympozjum „Onkologia w Laryngologii”. Warszawa, 22-24.09.2011r.



W latach 2018/2019 byłam członkiem zespołu edytorów (Editorial Board Member) w czasopiśmie Scientific Reports.

W latach 2012 - 2021 wykonałam recenzję sześciu prac skierowanych do publikacji w międzynarodowych czasopismach:

- Oral Oncology (1 manuskrypt w 2012r.)
- Scientific Reports (1 manuskrypt w 2017 r.)
- BMC Cancer (1 manuskrypt w 2017 r. i 1 manuskrypt w 2018 r.)
- Molecular Biology Reports (1 manuskrypt w 2019 r.)
- Journal of Applied Genetics (1 manuskrypt w 2021 r.)

**Podsumowanie dorobku naukowego:**

*Stan na dzień 13.01.2023r.*

Sumaryczny IF (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji): 105,729


Sumaryczna liczba punktów ministerialnych (MNIŚZ): 1862

Liczba cytowań wg Web of Science (lata 2004-2022): 504 (456 bez autocytowań)

Liczba cytowań wg Scopus: 524 (470 bez autocytowań)

Indeks Hirscha wg Web of Science: 14

Indeks Hirscha wg Scopus: 13

  
.....  
(podpis wnioskodawcy)