

Autoreferat

Elżbieta Janina Płuciennik

Zakład Kancerogenezy Molekularnej
Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2016

1. Imię i nazwisko:

Elżbieta Janina Płuciennik

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

2007- tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, uzyskany na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Wykorzystanie metody amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym do oznaczania poziomu ekspresji wybranych markerów diagnostyczno-prognostycznych w raku piersi.*

2003-tytuł magistra biologii, uzyskany na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, specjalność biochemia.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2011- do chwili obecnej – adiunkt, Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

2007-2011 – asystent, Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r.

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego: *Rola genu supresorowego WWOX w regulacji procesów biologicznych nowotworów pęcherza moczowego i błony śluzowej trzonu macicy (endometrium).*

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

1. Płuciennik E, Nowakowska M, Stepień A, Wołkowicz M, Stawiński A, Różański W, Lipiński M, Bednarek AK.

Alternating expression levels of WWOX tumor suppressor and cancer-related genes in patients with bladder cancer.

Oncol Lett. 2014 Nov;8(5):2291-2297. doi: 10.3892/ol.2014.2476 (IF 1,554, MNiSW 15)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współdziałanie w wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie i interpretacji otrzymanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz wysłaniu go do redakcji.

Udział procentowy: 80%

2. Pluciennik E*, Kośla K*, Wójcik-Krowiranda K, Bieńkiewicz A, Bednarek AK

The WWOX tumor suppressor gene in endometrial adenocarcinoma.

Int J Mol Med. 2013 Dec;32(6):1458-64. doi: 10.3892/ijmm.2013.1526 (IF 1,88, MNiSW 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współdziałanie w wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie i interpretacji otrzymanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu.

Udział procentowy: 60%

3. Pluciennik E*, Nowakowska M*, Pospiech K, Stępień A, Wołkowicz M, Gałdyszyńska M, Popęda M, Wójcik-Krowiranda K, Bieńkiewicz A, Bednarek AK

The role of WWOX tumor suppressor gene in the regulation of EMT process via regulation of CDH1-ZEB1-VIM expression in endometrial cancer.

Int J Oncol. 2015 Jun;46(6):2639-48. doi: 10.3892/ijo.2015.2964 (IF 3,018, MNiSW 25)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współdziałanie w wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie i interpretacji otrzymanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz wysłaniu go do redakcji.

Udział procentowy: 60%

4. Pluciennik E, Nowakowska M, Gałdyszyńska M, Popęda M, Bednarek AK

The influence of WWOX gene in the regulation of biological processes during endometrial carcinogenesis.

Int J Mol Med 2016; 37: 807-815. doi: 10.3892/ijmm.2016.2469 (IF 2,348, MNiSW 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współdziałanie w wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie i

interpretacji otrzymanych wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz wysłaniu go do redakcji.

Udział procentowy: 80%

*Równy udział autorów

Sumaryczny IF prac stanowiących osiągnięcie naukowe: 8,80

Punktacja MNiSW: 80

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Celem prowadzonych przeze mnie badań stanowiących podstawę niniejszego opracowania było określenie mechanizmów wpływających na poziom ekspresji genu *WWOX* (utrata heterozygotyczności i metylacja sekwencji promotora) oraz wpływu genu *WWOX* na ekspresję innych genów związanych z proliferacją, apoptozą, cyklem komórkowym, transdukcją sygnału w raku pęcherza moczowego (brodawkowaty rak urotelialny) oraz endometrium. Ponadto, wykorzystując modele *in vitro* nowotworów endometrium oceniłam wpływ genu *WWOX* na przejście epitelialno-mezenchymalne oraz jego udział procesach biologicznych (adhezja do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, zdolność do przechodzenia przez błonę podstawną, aktywność metaloproteinaz, zdolność do wzrostu w zawiesinie) w nowotworowych liniach komórkowych endometrium o różnym statusie zróżnicowania.

Przedstawione badania zostały przeprowadzone na tkankach pochodzących od pacjentów z nowotworami pęcherza moczowego i endometrium oraz na modelach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych prawidłowych i nowotworowych endometrium.

Wprowadzenie

Gen *WWOX* (*WW domain-containing oxidoreductase*) jest jednym z genów supresorowych, którego zmiany w poziomie ekspresji zaobserwowano w licznych nowotworach takich jak trzustki (1), przełyku (2), żołądka (3), nie-drobnokomórkowym raku płuc (4,5), nowotworach krwi (6,7,8), guzie Wilmsa (9), szpiczaku mnogim (10), raku tarczycy (11), wątroby (12), szyjki macicy (13), w tym również hormonozależnych takich jak rak piersi (14-23), prostaty (24), jajnika (25,26). Gen ten zlokalizowany jest w powszechnym łamliwym miejscu chromosomowym FRA16D, znajdującym się na chromosomie 16 –

pozycja 16q23.3-q24. Składa się z 9 eksonów o długości od 58 do 1060 par zasad (pz). Pierwszy ekson zawiera 5'UTR, znajdujący się w obrębie wysp CpG, od pozycji -660 od kodonu startu translacji i rozciąga się do pozycji +282. Obszar ten zawiera 63% reszt G i C, a wyspy CpG stanowią 8% jego składu nukleotydowego. Gen *WWOX* rozciąga się na obszarze ponad 1 miliona pz, z czego eksony stanowią 2 264 pz (14). Badania nad genem *WWOX* wykazały obecność jego 8 alternatywnych transkryptów w licznych liniach komórkowych i tkankach nowotworowych. Najczęściej obserwowane są transkrypty pozbawione eksonów 6-8 (*WWOXΔ6-8*), które zanotowano w liniach komórkowych raka piersi i u pacjentek z pierwotnym rakiem piersi, a także w gruczolakoraku jelita (14,15,20), raku żołądka (3,15,20), szpiczaku mnogim (14,20), raku przełyku (2), nie-drobnokomórkowym raku płuc (5), raku jajnika (27). Niewielki odsetek stanowią transkrypty *WWOXΔ 2-6*, *Δ2-9*, *Δ1-8* np. w liniach komórkowych nowotworów krwi (28), raku trzustki (1)), czy *WWOXΔ 7-8* w raku żołądka (3).

Białko *WWOX* zbudowane jest z 414 aminokwasów o masie 46 kDa. Składa się z dwóch N-terminalnych domen WW oraz w centralnej części z domeny krótkołańcuchowej dehydrogenazy SDR (ang. *short-chain dehydrogenase/reductase*), dlatego przypuszcza się, że białko to może jako dehydrogenaza steroidowa brać udział w regulacji interakcji receptorów hormonów sterydowych. Pierwsza domena WW znajduje się pomiędzy 18 a 47 aminokwasem, gdzie występują dwie charakterystyczne reszty tryptofanu i jedna reszta proliny (14). Odpowiada ona za interakcje z białkami partnerskimi takimi jak ERBB4 (22,29), czynnikami transkrypcyjnymi AP2γ (30,31), YAP (29), Jun (32), HIF1α (33).

Druga domena WW znajduje się w pozycji od 59 do 88 aminokwasu, a jedna z reszt tryptofanowych (W) została zastąpiona przez tyrozynową (Y), co jest często obserwowane w domenach WW.

Na N-końcu domeny SDR białko *WWOX* zawiera sekwencję GGANSGIG wiążącą koenzym w pozycji 131-137, zaś sekwencja wiążąca substrat YNRSK występuje w pozycji 293-297, poprzedzona resztą serynową (S) (14).

Gen ten należy do nietypowych genów supresorowych, ponieważ jak dotąd nie stwierdzono występowania mutacji inaktywujących obydwie allele. Najprawdopodobniej utrata jednego allele jest wystarczająca do zaburzenia jego prawidłowej funkcji biologicznej (zjawisko niewystarczającej haploidalności). Badania *in vivo* wykazały, że pozbawienie jednego allele genu *WWOX* u myszy powoduje zwiększoną częstość występowania nowotworów. Liczne badania wskazują, iż spadek ekspresji genu *WWOX* jest związany z

utrata heterozygotyczności (*loss of heterozygosity*, LOH) oraz metylacją reszt cytozyny w wyspach CpG regionu promotorowego i pierwszego eksonu (34,35).

Badania na ortotropowych modelach *in vivo*, z wykorzystaniem agresywnych komórek nowotworowych raka piersi MDA-MB-435 transdukowanych retrowirusami przenoszącymi cDNA genu *WWOX*, wykazywały powstawanie znacznie mniejszych guzów w stosunku do myszy, którym wszczepiono te same komórki nowotworowe po transdukcji pustym wektorem (15). Ponadto badania na myszach *knock-out* pozbawionych genu *WWOX* wykazały, że jego brak wiąże się z wystąpieniem licznych wad i upośledzeń, takich jak kwasica metaboliczna, leukopenia, atrofia śledziony, hipoglikemia, hipokalcemia, zaburzenia w rozwoju układu kostnego oraz śmierć najdalej w 3-4 tygodniu życia (36).

Powyższe dane literaturowe były podstawą do podjęcia przeze mnie próby określenia roli genu *WWOX* w procesie nowotworzenia tkanki endometrium i pęcherza moczowego.

Rak pęcherza moczowego

W Polsce w 2013 roku rak pęcherza moczowego u mężczyzn zajmował 4 miejsce pod względem zachorowalności (5390 przypadków), zaś u kobiet 14 miejsce (1575 przypadków). Ponadto, śmiertelność na ten nowotwór była wysoka u mężczyzn i zajmowała 5 miejsce (2686 przypadki), zaś u kobiet 15 miejsce (727 przypadków) (<http://epid.coi.waw.pl/krn/>). Nowotwór ten powstaje w nabłonku przejściowym wyściełającym pęcherz moczowy i może występować w formie brodawki (brodawczak) lub wnikać do wnętrza pęcherza (*transitional cell carcinoma*, TCC; rak przejściowokomórkowy). Najczęściej występującym typem jest rak przejściowokomórkowy (90% przypadków), rak płaskonabłonkowy i gruczolak. Można wyróżnić dwie odrębne molekularne ścieżki powstawania dla nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (*non-muscle-invasive bladder cancers*, NMIBCs) oraz raka naciekającego błonę mięśniową pęcherza moczowego (*muscle-invasive bladder cancers*, MIBCs)(37).

Do najczęstszych zaburzeń w obrębie onkogenów typu NMIBC zalicza się m.in.: mutacje punktowe *PIK3CA* (25%), mutacje punktowe *FGFR3* (60-70%) i nadekspresję białka *FGFR3* (80%), mutacje punktowe *HRAS* (5-10%), nadekspresję białka *EGFR* (20%) oraz zmiany w genach supresorowych nowotworów: metylacje promotora *RUNX3* (65%), mutacje *CTNBI* (2%), hemizygotyczne delecje *CDK2A* (50-60%) i homozygotyczne delecje *CDKN2A* (15%), mutacje *PIK3RI* (5%), delecje *PTEN* (6-8%), mutacje *TP53* (0-14%) i *STAG2* (32-36%). Ponadto, dla typu NMIBC zanotowano utratę heterozygotyczności w regionach 3p, 4p, 4q, 8p, 9q, 11p, 11q oraz 14q (38,39).

W drugim typie (MIBC) najczęściej obserwuje się m.in. nadekspresję białka EGFR (50%), nadekspresję *FGFR1* (80%), amplifikację *ERBB2*(5-14%) i nadekspresję *ERBB2* (8-30%), metylację promotora *RUNX3* (85%), mutację inaktywującą *ARID1A* (25%), hemizygotyczne delecje *CDK2A* (50-60%) i homozygotyczne delecje *CDKN2A* (20%-30%), hemizygotyczne delecje *PTEN* (25-58%) i homozygotyczne delecje *PTEN* (4-6%), inaktywację *RBI* (11-13%), mutacje *TP53* (24-56%) i nadekspresję *TP53* (30-50%) (39). Dodatkowo w typie inwazyjnym obserwuje się utratę regionów na chromosomach w pozycjach 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11pi 18q oraz dodatkowe fragmenty w obszarach 1q, 5p, 8q i 17q (38,39).

Wciąż jednak poszukuje się nowych genów, które pozwoliłyby na lepsze zrozumienie biologii molekularnej raka pęcherza moczowego.

W pracy *Alternating expression levels of WWOX tumor suppressor and cancer-related genes in patients with bladder cancer* [1] podjęłam się określenia roli genu supersorowego *WWOX* oraz innych genów związanych z proliferacją (*MKI67*), apoptozą (*BCL2*, *BAX*, *BIRC5*), cyklem komórkowym (*CCND1*, *CCNE1*) i transdukcją sygnału (*EGFR*, *VEGF*) w kancerogenezie pęcherza moczowego oraz zbadania, czy utrata heterozygotyczności (LOH) oraz metylacja promotora mogą regulować poziom ekspresji genu *WWOX* w tym typie nowotworu. W badaniach wykorzystałam próbki tkanek od 32 pacjentów z brodawkowatym nowotworem urotelialnym. Tkanka nowotworowa pozyskana została od 26 mężczyzn i 6 kobiet; 16 próbek zakwalifikowano jako stopień złośliwości (*grade*, G) 1, 9 jako G2, 3 jako G3, natomiast 4 były nieokreślone.

Badania nad utratą heterozygotyczności w dwóch analizowanych intronach, 1 (marker D16S518) i 8 (D16S3096), genu *WWOX* wykazały hemizygotyczność odpowiednio u 64,5% i 25,8% pacjentów z brodawkowatym nowotworem urotelialnym. Uwzględniając homozygotyczności powyższych markerów w populacji wg bazy Genome (odpowiednio 17% dla D16S518 oraz 26% dla D16S3096) mogę wnioskować, iż utrata heterozygotyczności w tym typie nowotworu występuje wyłącznie w intronie 1 (47,5%). Ponadto, nie zanotowałam związku między LOH a poziomem ekspresji genu *WWOX* ($p>0,05$), co mogło być związane z małą liczebnością badanych przypadków.

Postanowiłam więc sprawdzić, czy metylacja dwóch fragmentów genu *WWOX* (w pozycji -508 do -174 pz w sekwencji promotorowej oraz od -171 do +239 pz, pokrywająca koniec 3' promotora oraz część eksonu 1) może regulować poziom tego genu.

Zaobserwowałam 31% przypadków pacjentów ze zmetylowanym pierwszym analizowanym fragmentem, co znacząco zmniejszyło poziom mRNA genu *WWOX*. Podobne wyniki wykazali Iliopoulos i wsp. w raku przejściowokomórkowym pęcherza moczowego, gdzie 29% pacjentów wykazywało metylacje sekwencji promotorowej oraz 14% eksonu 1 genu *WWOX* (40). Wykazałam również istotny spadek poziomu mRNA *WWOX* u heterozygotycznych pacjentów pod względem markera D16S3096 i jednocześnie wykazujących metylację sekwencji promotorowej w lokalizacji -508 do -174 pz.

Ponadto, przeprowadzona przeze mnie analiza ekspresji genów u pacjentów z rakiem pęcherza wykazała pozytywną korelację między inhibitorem apoptozy *BIRC5* (surwiwiną) a markerem proliferacji *MKI67* oraz regulatorem przejścia z fazy G1 do S w cyklu komórkowym – *CCNE1* (cyklina E1), receptorem naskórkowego czynnika wzrostu *EGFR* i czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyniowego związanego z angiogenezą *VEGF*. Zanotowałam również pozytywną korelację pomiędzy *MKI67* a *EGFR* i *CCNE1*, a także między *EGFR* i *VEGF* oraz genem *WWOX* a cykliną D1.

Zaprezentowane powyżej wyniki moich badań wskazują, iż w raku pęcherza moczowego ekspresja genu *WWOX* regulowana jest na drodze utraty heterozygotyczności oraz metylacji jego sekwencji promotorowej. Ponadto, wykazałam pozytywną korelację między inhibitorem apoptozy *BIRC5* (surwiwiną) a markerem proliferacji *MKI67* oraz regulatorem cyklu komórkowego fazy G1/S- cykliną E1, receptorem naskórkowego czynnika wzrostu *EGFR* oraz czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyniowego związanego z angiogenezą *VEGF*.

Rak błony śluzowej trzonu macicy (endometrium)

W Polsce w 2013 roku zanotowano 5706 przypadków zachorowań na raka trzonu macicy, co u kobiet stanowiło 4 miejsce, zaraz po raku piersi, oskrzeli i płuc oraz nowotworach złośliwych skóry. Pod względem śmiertelności ten typ nowotworu zajmował 11 miejsce (1243 przypadków) (<http://epid.coi.waw.pl/krn/>).

W latach 80. Bokhman i wsp. zaproponowali rozróżnienie dwóch typów kancerogenezy endometrium na podstawie cech histopatologicznych i szlaków molekularnych. Typ I to endometrioidalny typ raka endometrium (*endometrioid endometrial carcinoma*, EEC), który stanowi 70-80% sporadycznych raków endometrium i występuje głównie u kobiet młodych zarówno przed, jak i po menopauzie. Są to głównie nowotwory o

niskim stopniu złośliwości rozwijające się z rozrostów hyperplastycznych endometrium spowodowanych nadmierną proliferacją stymulowaną poprzez estrogeny oraz wykazujące dobre prognozy. Jednym z charakterystycznych zaburzeń tego typu raka endometrium jest niestabilność mikrosatelitarna obserwowana u 45% pacjentek, która jest spowodowana mutacjami/metylacją genów związanych z systemem naprawy błędnie sparowanych zasad, takich jak *MLH1*, *MSH2* i *MSH6*. Ponadto, w tym typie raka zanotowano inaktywację genu *PTEN*, mutacje w genach *KRAS* (K-ras) i *CTNNB1* (β -katenina) oraz spadek ekspresji *CDH1* (kadheryna E).

Typ II raka trzonu macicy, tzw. nie-endometrioidalny (*non-endometrioid endometrial carcinoma*, NEEC), nie zależy od czynników hyperestrogennych. Są to najczęściej raki surowicze, jasnokomórkowe, rozwijające się na podłożu atroficznej tkanki endometrium u kobiet starszych. Typ ten wykazuje agresywniejszy przebieg choroby i obserwuje się w nim zaburzenia cyklu komórkowego na skutek akumulacji niefunkcjonalnego białka p53, inaktywacji p16 oraz zaburzeń *CDKN2A* oraz nadekspresji *HER2*. Obserwuje się również utratę ekspresji kadheryny E, odgrywającej rolę w przejściu epitelialno-mezenchymalnym w przerzutowaniu (41). Jednak nie wszystkie przypadki raka endometrium da się zakwalifikować do któregoś z omówionych powyżej typów. Ponadto, część pacjentek z rakiem endometrium nie wykazuje wyżej wymienionych zaburzeń molekularnych, co skłania do poszukiwania innych genów związanych z kancerogenezą tej tkanki.

Dane literaturowe wskazują na zmiany w ekspresji genu *WWOX* w hormono-zależnych nowotworach: piersi, prostaty, jajników i jąder (14,42-44). Dlatego też **jako pierwsza** podjęłam próbę sprawdzenia, czy gen ten ma wpływ na proces nowotworzenia w tkance endometrium.

W artykule *The WWOX tumor suppressor gene in endometrial adenocarcinoma* [2] zostały przedstawione wyniki badań nad zmianami na poziomie mRNA i białka *WWOX*. W badaniach zostało wykorzystanych 79 próbek uzyskanych od pacjentek ze zdiagnozowanym gruczolakorakiem endometrioidalnym, w porównaniu z tkanką prawidłową endometrium (28 pacjentek z nienowotworowymi zmianami ginekologicznymi). Jednym z celów badania było określenie zależności pomiędzy zmianami ekspresji genu *WWOX* a standardowymi danymi patologicznymi pacjentek, takimi jak stopień zaawansowania choroby, stopień złośliwości histopatologicznej, naciekanie na warstwę myometrium czy przerzuty do węzłów chłonnych.

Sprawdziłam również, czy zjawisko utraty heterozygotyczności może wpływać na poziom ekspresji genu *WWOX* oraz jaki jest związek ekspresji tego genu z innymi genami istotnymi w nowotworzeniu, takimi jak *MKI67* (marker proliferacji), *BAX* (gen proapoptotyczny), *BCL2* (gen antyapoptotyczny), *EGFR*, *CCNE1* (regulator cyklu komórkowego – cyklina E1), *CCND1* (regulator cyklu komórkowego – cyklina D1), *CDH1* (kadheryna E), *TP73* (partner białka *WWOX*) oraz *NCOR1* (jądrowy korepresor ER α).

W badaniach tych wykazałam, że istnieje tendencja zmniejszenia ilości białka *WWOX* pomiędzy tkanką prawidłową endometrium a tkanką nowotworową. Ponadto, zanotowałam u pacjentek z rakiem endometrium 38% hemizygotyczność w regionie intronu 8 genu *WWOX* (marker mikrosatelitarny D16S3096), co zmniejszało ekspresję genu. Pokazałam również pozytywną korelację ekspresji genu *WWOX* z genami *BCL2*, cykliną D1, indeksem *BCL2/BAX*, zaś negatywną z *BAX*, *CDH1* i *NCOR1*. Analiza związku genu *WWOX* z danymi klinicznymi wskazywała na tendencję spadku mRNA *WWOX* ze stopniem zaawansowania choroby (FIGO I względem II, III) oraz stopniem zróżnicowania (*grade* G1 względem G2 i G3).

Wyniki tych badań jako pierwsze pokazują potencjalną rolę genu *WWOX* w kancerogenezie endometrium poprzez regulację ścieżek apoptozy (*BAX*, *BCL2*), szlaku Wnt (*CDH1*, *CCND1*) oraz genu estrogenozależnego *NCOR1*. Jako pierwsza zanotowałam tendencję spadku ekspresji genu supresorowego nowotworu *WWOX* wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby wg FIGO oraz stopniem zróżnicowania raka błony śluzowej trzonu macicy.

Otrzymane wyniki badań skłoniły mnie do podjęcia kolejnych badań (*The role of WWOX tumor suppressor gene in the regulation of EMT process via regulation of CDH1-ZEB1-VIM expression in endometrial cancer* [3]), tym razem na modelu *in vitro* oraz na zwiększonej ilości pacjentek z rakiem endometrium (164 pacjentki) w celu określenia, czy gen *WWOX* może odrywać rolę w przejściu epitelialno-mezenchymalnym (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Proces ten ogrywa ważną rolę w embriogenezie i rozwoju narządów, ale także w stanach patologicznych jakim jest nowotworzenie, gdzie wpływa na tworzenie przerzutów (45-47). W trakcie tego procesu komórki epitelialne zmieniają polarność oraz nabywają cech komórek mezenchymalnych, takich jak zdolność do ruchu na skutek zmian w ekspresji genów, tj. obniżenie ekspresji genów związanych ze ścisłym

przyleganiem komórek do siebie czy do macierzy zewnątrzkomórkowej (np. cytokeratyn czy kadheryny E) a podwyższenie ekspresji kadheryny N czy wimentyny (48,49).

W badaniach wykorzystana została linia komórkowa ECC1, którą charakteryzuje wysokie zróżnicowanie i hormonozależność (komórki posiadają receptory: ER α , ER β , AR, PR). W pierwszym etapie badań *in vitro* przeprowadziłam transdukcję stałą wektorem retrowirusowym pLNCX2, przenoszącym cDNA genu supresorowego nowotworów *WWOX*. Następnie w celu określenia, w jakich biologicznych procesach oraz ścieżkach sygnałowych gen *WWOX* odgrywa istotną rolę w raku endometrium przeprowadziłam analizę ekspresji 30 000 genów przy pomocy techniki mikromacierzy. Zaobserwowałam istotną różnicę w ekspresji ponad 800 genów pomiędzy wariantami ECC1/*WWOX* a ECC1/wektor. Wśród nich znajdowały się geny związane z różnicowaniem, apoptozą, architekturą tkankową oraz z następującymi szlakami sygnałowymi: Wnt, integryn, procesów zapalnych związanych z chemokinami i cytokinami, TGF- β czy kadheryny E.

Następnie przeprowadziłam testy biologiczne pozwalające na określenie procesów komórkowych, w jakich gen *WWOX* może uczestniczyć w raku endometrium. Stwierdziłam, że komórki ECC1 z nadekspresją *WWOX* wykazywały zwiększoną zdolność do przechodzenia przez błonę podstawną w porównaniu do komórek kontrolnych, co związane było ze zwiększoną aktywnością metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Takie wyniki sugerowały wyższą inwazyjność komórek z podwyższonym poziomem genu *WWOX*, co zaprzeczałoby funkcji supresorowej tego genu. Jednakże, kolejny przeprowadzony test wzrostu komórek epitelialnych z nadekspresją genu *WWOX* w zawieszynie pokazał, iż komórki te wykazują zmniejszoną zdolność do wzrostu, co może wskazywać na utratę zdolności przerzutowania z krwiobiegami. Ponadto, w badaniu tym wykazałam, że komórki ECC1 z podwyższonym poziomem genu *WWOX* wykazywały zmniejszoną zdolność do wiązania się z wybranymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (tj. z fibrynogenem), co również może hamować proces tworzenia przerzutów. Podobne wyniki dotyczące zdolności komórek raka jajnika (ze zmienionym poziomem genu *WWOX*) do adhezji do białka fibronektyny zaobserwował Gourley i wsp. (50).

Co więcej, w badaniu tym wykazałam związek pomiędzy ekspresją genów wimentyny, kadheryny E oraz dwóch represorów kadheryny E (*ZEB1* i *SNAI1*) z poziomem genu *WWOX* zarówno w transdukowanej linii komórkowej ECC1, jak i u pacjentek z rakiem endometrium. Wykazałam 1,6-krotny wzrost poziomu białka kadheryny E (marker komórek epitelialnych), zaś 1,9-krotny spadek białka wimentyny (marker komórek mezenchymalnych)

w komórkach ECC1/*WWOX*. Analogiczną zależność zauważyłam także na poziomie mRNA (odpowiednio 3,5-krotny wzrost dla *CDH1* i 2-krotny spadek dla *VIM*). Z kolei u pacjentek z rakiem endometrium zanotowałam negatywną korelację ekspresji genu *WWOX* z *CDH1* oraz z *VIM*, zaś pozytywną z *ZEB1*. Różnice w korelacji pomiędzy *WWOX* a *CDH1* w badaniach *in vitro* i na pacjentkach mogą wynikać ze złożoności oddziaływań komórek nowotworowych m.in. z macierzą zewnątrzkomórkową.

Warto podkreślić, że u pacjentek z niskim ryzykiem wznowy (wg klasyfikacji Pecorelliego i wsp. (51)) poziom ekspresji genu *WWOX* był wyższy niż przy średnim ryzyku wznowy. Zaobserwowałam również negatywną zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu *WWOX* a ryzykiem wznowy choroby i stopniem złośliwości histopatologicznej (*grade*, G). Pacjentki z niskim ryzykiem wznowy i niskim stopniem złośliwości G1 wykazywały najwyższy poziom mRNA *WWOX*. Ponadto, obniżony poziom *CDH1* był widoczny u pacjentek ze stopniem złośliwości G3 i wykazywały one najwyższe ryzyko wznowy choroby. Zaś pacjentki z G2 i średnim ryzykiem wznowy wykazywały wyższy poziom ekspresji *CDH1* w porównaniu z G1 i niskim ryzykiem wznowy choroby. Można więc przypuszczać, iż negatywna zależność ekspresji genu *WWOX* z *CDH1* u pacjentek może wynikać z zaangażowania genu *WWOX* w proces różnicowania guza, co zaobserwowali Sakuragi i wsp. u pacjentek z rakiem endometrium, gdzie redukcja białka CDH1 związana była z odróżnicowaniem guza i wzrostem inwazyjności (52).

W pracy tej po raz pierwszy wskazałam, że gen supresorowy nowotworów *WWOX* odgrywa istotną rolę w procesie EMT w raku endometrium. Wykazałam, że komórki raka endometrium wykazujące nadekspresję genu *WWOX* inicjują przechodzenie przez błonę podstawną w procesie inwazji, jednakże charakteryzują się zahamowanym wzrostem w zawiesinie, a także zmniejszoną zdolnością do wiązania się z wybranymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, poziom ekspresji genu *WWOX* wykazuje zależność z ryzykiem wznowy choroby u pacjentek z rakiem endometrium. Wyniki te wskazują również po raz pierwszy na istotną rolę genu *WWOX* w regulacji szlaków sygnałowych takich jak Wnt, integryn, procesów zapalnych związanych z chemokinami i cytokinami, apoptozy, TGF- β czy kadheryny E.

Powyżej opisane wyniki badań skłoniły mnie do dalszych doświadczeń *in vitro* nad rolą genu *WWOX* w procesach biologicznych prawidłowych komórek endometrium oraz nowotworowych linii komórkowych endometrium o różnym statusie zróżnicowania (*The*

influence of WWOX gene in the regulation of biological processes during endometrial carcinogenesis [4]). Tym razem przeprowadzono wyciszenie genu *WWOX* przy pomocy shRNA w oparciu o system lentiwirusowy w trzech liniach komórkowych: THESC, Ishikawa i MFE296. Linia komórkowa THESC stanowiła model prawidłowych komórek endometrium, ponieważ pochodzi od pacjentek z mięśniakami i bez potencjału nowotworowego. Linia Ishikawa to model komórek nowotworowych endometrium dobrze zróżnicowanych (*grade 1*), wykazujących ekspresję receptorów estrogenów (*estrogen receptors, ERs*) jak i progesteronu (*progesterone receptor, PR*). Trzecia linia MFE296 reprezentowała średnio zróżnicowany (*grade 2*) typ raka endometrium z ekspresją wimentyny, cytokeratyn 7, 8, 18 i 19, brakiem ekspresji receptorów estrogenowych oraz wykazujący potencjał tworzenia dobrze zróżnicowanych guzów u myszy bezgrasiczych.

Przeprowadzone testy biologiczne pozwoliły na określenie procesów komórkowych, w jakich gen *WWOX* może uczestniczyć w endometrium w różnych etapach nowotworzenia. Prawidłowe komórki endometrium THESC z wyciszonym genem *WWOX* wykazywały spadek zdolności adhezji do czterech białek macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix, ECM*): fibronektyny, kolagenu 1, lamininy 1 i fibrynogenu. Dobrze zróżnicowana linia Ishikawa z wyciszonym genem *WWOX* wykazywała 49% wzrost adhezji do fibronektyny, zaś MFE296 37% wzrost adhezji do fibrynogenu w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponadto, przeprowadzona analiza zmian ekspresji integryny wykazała zmniejszoną ekspresję integryny alfa1 i alfa4 dla linii Ishikawa/sh*WWOX*, zaś 2-krotnie zwiększoną ekspresję podjednostki alfa3 integryny dla linii MFE296/sh*WWOX*.

Wykazałam również, iż obniżenie ekspresji genu *WWOX* zmniejsza zdolność komórek endometrium do inwazji przez błonę podstawną, ale tylko dla linii słabo zróżnicowanej – MFE296. Związane to było m.in. z obniżeniem o 36% aktywności metaloproteinazy 2 (MMP-2). Udokumentowałam również, że gen *WWOX* zmienia zdolność komórek nowotworowych endometrium do wzrostu w zawieszynie jedynie w komórkach słabo zróżnicowanych (wzrost o 27,7% dla MFE296/sh*WWOX*), zaś w dobrze zróżnicowanych komórkach Ishikawa wpływa na zdolność tworzenia kolonii (wzrost o 68% dla Ishikawa/sh*WWOX*). Analiza ekspresji na poziomie mRNA wykazała, iż obniżenie ekspresji genu *WWOX* w linii nowotworu słabo zróżnicowanego MFE296 powoduje ponad 2-krotny wzrost ekspresji dwóch genów regulujących adhezję komórek: kadheryny E (*CDH1*) i ezryny (*EZR*) oraz genu *SPARC*, którego produkt reguluje wzrost komórek poprzez oddziaływania z białkami ECM i cytokinami.

Przedstawione wyniki po raz pierwszy wskazują na rolę genu *WWOX* na różnych etapach kancerogenezy endometrium. Wyniki te dostarczają nowych informacji na temat udziału genu *WWOX* w procesie adhezji prawidłowych komórek endometrium, jak i komórek nowotworowych endometrium do białek ECM. Ponadto, w słabo zróżnicowanych komórkach raka endometrium gen *WWOX* wpływa zarówno na proces przerzutowania (poprzez zmiany w przechodzeniu przez błonę podstawną, w aktywności metaloproteinaz oraz w zdolności do wzrostu w zawieszynie), jak i na ekspresję genów *CDHI*, *EZR* i *SPARC*.

Wszystkie wykonane przeze mnie badania na tkankach pochodzących od pacjentów zostały przeprowadzone za zgodą lokalnej Komisji Bioetyki ds. Badań na Ludziach.

Literatura

1. Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM. *The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis*. Clin Cancer Res. 2004 Apr 1;10(7):2459-65..
2. Kuroki T, Trapasso F, Shiraishi T, Alder H, Mimori K, Mori M, Croce CM. *Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res. 2002 Apr 15;62(8):2258-60.
3. Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R, Huebner K, Edmonds P, Croce CM. *Loss of WWOX expression in gastric carcinoma*. Clin Cancer Res. 2004 May 1;10(9):3053-8..
4. Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. *WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer*. Cancer Res. 2003 Feb 15;63(4):878-81.
5. Zhou Y, Xu Y, Zhang Z. *Deletion and mutation of WWOX exons 6-8 in human non-small cell lung cancer*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2005;25(2):162-5.
6. Ishii H, Vecchione A, Furukawa Y, Sutheesophon K, Han SY, Druck T, Kuroki T, Trapasso F, Nishimura M, Saito Y, Ozawa K, Croce CM, Huebner K, Furukawa Y. *Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies*. Mol Cancer Res. 2003 Nov;1(13):940-7.
7. Ishii H, Furukawa Y. *Alterations of common chromosome fragile sites in hematopoietic malignancies*. Int J Hematol. 2004 Apr;79(3):238-42.
8. Krummel KA, Roberts LR, Kawakami M, Glover TW, Smith DI. *The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations*. Genomics. 2000 Oct 1;69(1):37-46.
9. Skotnicka-Klonowicz G, Rieske P, Bartkowiak J, Szymik-Kantorowicz S, Daszkiewicz P, Debiec-Rychter M. *16q heterozygosity loss in Wilms' tumour in children and its clinical importance*. Eur J Surg Oncol. 2000 Feb;26(1):61-6.

10. Mangelsdorf M, Ried K, Woollatt E, Dayan S, Eyre H, Finnis M, Hobson L, Nancarrow J, Venter D, Baker E, Richards RI. *Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer*. Cancer Res. 2000 Mar 15;60(6):1683-9.
11. Sbrana I, Veroni F, Nieri M, Puliti A, Barale R. *Chromosomal fragile sites FRA3B and FRA16D show correlated expression and association with failure of apoptosis in lymphocytes from patients with thyroid cancer*. Genes Chromosomes Cancer. 2006 May;45(5):429-36.
12. Li YP, Wu CC, Chen WT, Huang YC, Chai CY. *The expression and significance of WWOX and β -catenin in hepatocellular carcinoma*. APMIS. 2013 Feb;121(2):120-6.
13. Qu J, Lu W, Li B, Lu C, Wan X. *WWOX induces apoptosis and inhibits proliferation in cervical cancer and cell lines*. Int J Mol Med. 2013 May;31(5):1139-47.
14. Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. *WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer*. Cancer Res. 2000 Apr 15;60(8):2140-5.
15. Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K, Brenner AJ, Aldaz CM. *WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth*. Cancer Res. 2001 Nov 15;61(22):8068-73.
16. Driouch K, Prydz H, Monese R, Johansen H, Lidereau R, Frengen E. *Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors*. Oncogene. 2002 Mar 14;21(12):1832-40.
17. Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, Hauck WW, McCue P, Huebner K. *The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma*. Cancer. 2004 Apr 15;100(8):1605-14.
18. Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, McCue P, Huebner K. *Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development*. Pathol Int. 2005 Aug;55(8):471-8.
19. Krummel KA, Denison SR, Calhoun E, Phillips LA, Smith DI. *The common fragile site FRA16D and its associated gene WWOX are highly conserved in the mouse at Fra8E1*. Genes Chromosomes Cancer. 2002 Jun;34(2):154-67.
20. Ludes-Meyers JH, Bednarek AK, Popescu NC, Bedford M, Aldaz CM. *WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene*. Cytogenet Genome Res. 2003;100(1-4):101-10.
21. Mangelsdorf M, Ried K, Woollatt E, Dayan S, Eyre H, Finnis M, Hobson L, Nancarrow J, Venter D, Baker E, Richards RI. *Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer*. Cancer Res. 2000 Mar 15;60(6):1683-9.
22. Aqeilan RI, Donati V, Gaudio E, Nicoloso MS, Sundvall M, Korhonen A, Lundin J, Isola J, Sudol M, Joensuu H, Croce CM, Elenius K. *Association of Wwox with ErbB4 in breast cancer*. Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9330-6.
23. Aqeilan RI, Croce CM. *WWOX in biological control and tumorigenesis*. J Cell Physiol. 2007 Aug;212(2):307-10.
24. Qin HR, Iliopoulos D, Semba S, Fabbri M, Druck T, Volinia S, Croce CM, Morrison CD, Klein RD, Huebner K. *A role for the WWOX gene in prostate cancer*. Cancer Res. 2006 Jul 1;66(13):6477-81.
25. Nunez MI, Rosen DG, Ludes-Meyers JH, Abba MC, Kil H, Page R, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Liu J, Mills GB, Aldaz CM. *WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome*. BMC Cancer. 2005 Jun 27;5:64.
26. Xiong Z, Hu S, Wang Z. *Cloning of WWOX gene and its growth-inhibiting effects on ovarian cancer cells*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2010 Jun;30(3):365-9.

27. Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D, Porteous DJ, Smyth JF, Gabra H, Watson JE. *WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11417-22.
28. Ishii H, Vecchione A, Furukawa Y, Sutheesophon K, Han SY, Druck T, Kuroki T, Trapasso F, Nishimura M, Saito Y, Ozawa K, Croce CM, Huebner K, Furukawa Y. *Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies*. Mol Cancer Res. 2003 Nov;1(13):940-7.
29. Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarsky Y, Sudol M, Croce CM. *WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function*. Cancer Res. 2005 Aug 1;65(15):6764-72.
30. Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM. *Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor*. Cancer Res. 2004 Nov 15;64(22):8256-61.
31. Guler G, Huebner K, Himmetoglu C, Jimenez RE, Costinean S, Volinia S, Pilarski RT, Hayran M, Shapiro CL. *Fragile histidine triad protein, WW domain-containing oxidoreductase protein Wwox, and activator protein 2gamma expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer*. Cancer. 2009 Feb 15;115(4):899-908.
32. Gaudio E, Palamarchuk A, Palumbo T, Trapasso F, Pekarsky Y, Croce CM, Aqeilan RI. *Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity*. Cancer Res. 2006 Dec 15;66(24):11585-9.
33. Abu-Remaileh M, Aqeilan RI. *Tumor suppressor WWOX regulates glucose metabolism via HIF1alpha modulation*. Cell Death Differ. 2014 Nov;21(11):1805-14.
34. Li J, Liu J, Ren Y, Yang J, Liu P. *Common Chromosomal Fragile Site Gene WWOX in Metabolic Disorders and Tumors*. Int J Biol Sci. 2014 Jan 11;10(2):142-8.
35. Gardenswartz A, Aqeilan RI. *WW domain-containing oxidoreductase's role in myriad cancers: clinical significance and future implications*. Exp Biol Med (Maywood). 2014 Mar;239(3):253-63.
36. Abu-Remaileh M, Aqeilan RI. *The tumor suppressor WW domain-containing oxidoreductase modulates cell metabolism*. Exp Biol Med (Maywood). 2015 Mar;240(3):345-50.
37. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. *Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history*. Rev Urol. 2008 Winter;10(1):31-43.
38. Luis NM, López-Knowles E, Real FX. *Molecular biology of bladder cancer*. Clin Transl Oncol 2007, 9:5-12.
39. Knowles MA, Hurst CD. *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer. 2015 Jan;15(1):25-41.
40. Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Johnston D, Druck T, McCorkell KA, Palazzo J, McCue PA, Baffa R, Huebner K. *Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer*. Oncogene. 2005 Feb 24;24(9):1625-33.
41. Bokhman JV. *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol. 1983 Feb;15(1):10-7.
42. Aqeilan RI, Hagan JP, de Bruin A, Rawahneh M, Salah Z, Gaudio E, Siddiqui H, Volinia S, Alder H, Lian JB, Stein GS, Croce CM. *Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis*. Endocrinology. 2009 Mar;150(3):1530-5.
43. Lan C, Chenggang W, Yulan B, Xiaohui D, Junhui Z, Xiao W. *Aberrant expression of WWOX protein in epithelial ovarian cancer: a clinicopathologic and immunohistochemical study*. Int J Gynecol Pathol. 2012 Mar;31(2):125-32.

44. Qin HR, Iliopoulos D, Nakamura T, Costinean S, Volinia S, Druck T, Sun J, Okumura H, Huebner K. *Wwox suppresses prostate cancer cell growth through modulation of ErbB2-mediated androgen receptor signaling*. Mol Cancer Res. 2007 Sep;5(9):957-65.
45. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell. 2009 Nov 25;139(5):871-90.
46. Garg M. *Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer*. World J Stem Cells. 2013 Oct 26;5(4):188-95.
47. Kalluri R, Weinberg RA. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1420-8.
48. Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M, Tanabe A and Ohmichi M. *Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer*. Cancer Biol Ther. 2013 Jan;14(1):13-9.
49. Huber MA, Kraut N and Beug H. *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol. 2005 Oct;17(5):548-58.
50. Gourley C, Paige AJ, Taylor KJ, Ward C, Kuske B, Zhang J, Sun M, Janczar S, Harrison DJ, Muir M, Smyth JF, Gabra H. *WWOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin alpha3*. Cancer Res. 2009 Jun 1;69(11):4835-42.
51. Pecorelli S. *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. Int J Gynaecol Obstet. 2009 May;105(2):103-114.
52. Sakuragi N, Nishiya M, Ikeda K, Ohkouch T, Furth EE, Hareyama H, Satoh C, Fujimoto S. *Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion*. Gynecol Oncol. 1994 May;53(2):183-189.

Podsumowanie

Przeprowadzone wyniki badań potwierdziły istotną *Rolę genu supresorowego WWOX w regulacji procesów biologicznych nowotworów pęcherza moczowego i błony śluzowej trzonu macicy (endometrium).*

Za najważniejsze osiągnięcia powyższych badań uważam:

1. Wykazanie, iż w raku pęcherza moczowego ekspresja genu *WWOX* regulowana jest na drodze utraty heterozygotyczności oraz metylacji jego sekwencji promotorowej. Udokumentowanie związku pomiędzy inhibitorem apoptozy *BIRC5* (surwiwiną) a markerem proliferacji *MKI67*, regulatorem cyklu komórkowego – cykliną E1, receptorem naskórkowego czynnika wzrostu *EGFR* oraz czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego związanego z angiogenezą *VEGF*.
2. Wykazanie zależności pomiędzy ekspresją genu supresorowego nowotworu *WWOX* a wzrostem stopnia zaawansowania choroby wg FIGO, stopniem zróżnicowania raka błony śluzowej trzonu macicy (tendencja) oraz ryzykiem wznowy choroby.
3. Wykazanie roli genu *WWOX* w kancerogenezie endometrium poprzez regulację szlaku apoptozy, Wnt, procesów zapalnych związanych z chemokinami i cytokinami, TGF- β czy kadheryny E.
4. W badaniach *in vitro* wykazałam, że pomimo zwiększenia przez gen *WWOX* zdolności komórek nowotworowych endometrium do przechodzenia przez błonę podstawną, gen ten hamuje metastazę poprzez zmniejszenie zdolności komórek nowotworowych do wzrostu w zawieszynie czy też wiązania się z wybranymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej.
5. Wykazanie udziału genu *WWOX* w adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej również w przypadku prawidłowych komórek endometrium.
6. Wykazanie szczególnie istotnej roli genu *WWOX* w procesie przerzutowania słabo zróżnicowanych komórek raka endometrium.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Dane bibliometryczne

Łączny *impact factor* prac wynosi w sumie **69,976**, w tym **19,781** przypada na prace oryginalne, w których występuję jako pierwszy autor. Suma punktów MNiSW za publikacje naukowe w czasopismach (bez suplementów) wynosi **615**, w tym **180** pkt. przypada na prace oryginalne i kazuistyczne, w których występuję jako pierwszy autor.

Łącznie **394** cytowania, indeks Hirscha wynosi **10**.
(Źródło: ISI Web of Science Core Collection).

Łącznie **401** cytowań, indeks Hirscha wynosi **10**.
(Źródło: Scopus).

b) Prace niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego dotyczą tematów takich jak:

1. Rola genu supresorowego nowotworów *WWOX* w kancerogenezie.
2. Molekularne mechanizmy wpływu układu renina-angiotensyna w nowotworach hormonozależnych (endometrium, prostata).
3. Poszukiwanie nowych molekularnych markerów diagnostyczno-prognostycznych w raku piersi.

1. Rola genu supresorowego nowotworów *WWOX* w kancerogenezie

Publikacje 1.1 i 1.2 dotyczące oceny wpływu genu *WWOX* na proces nowotworzenia piersi powstały w oparciu o doświadczenia przeprowadzone w trakcie realizacji mojej rozprawy doktorskiej pt. *Wykorzystanie metody amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym do oznaczania poziomu ekspresji wybranych markerów diagnostyczno-prognostycznych w raku piersi*.

Wyniki pierwszej pracy (1.1) wykazały zróżnicowanie poziomu ekspresji genu *WWOX* w zależności od obecności receptorów ER i PR, tzn. wyższy poziom ekspresji obserwowany był u pacjentek z obecnością receptora ER, jak również obu receptorów jednocześnie. Ponadto, poziom ekspresji genu *WWOX* związany był ze statusem menopauzalnym i wyższy poziom mRNA *WWOX* obserwowany był u pacjentek młodszych (poniżej 50 r.ż.). Analiza ekspresji wybranych genów wykazała istotną rolę genu *WWOX* w regulacji cyklu komórkowego, proliferacji, apoptozy, ale wyłącznie w rakach piersi ER+. Wyjątek stanowiła pozytywna korelacja z genem *TP73*, która występowała także w grupie

pacjentek ER-. Otrzymane wyniki wskazują, że gen *WWOX* może być związany z kontrolą szlaków sygnałowych regulowanych hormonami płciowymi.

Dodatkowo, w grupie tych samych pacjentek (1.2) zanotowano wyższy poziom ekspresji genu *WWOX* u pacjentek z guzami bez ekspresji cytokeratyn typu podstawnego: CK5/6 i CK17, z wysokim poziomem indeksu antyapoptotycznego ($AI > 2$), a także bez obecności alternatywnego transkryptu *WWOX* Δ 6-8. Co więcej, wysoki poziom mRNA *WWOX* związany był z brakiem przerzutów do węzłów chłonnych oraz mniejszym ryzykiem wznowy choroby w porównaniu z pacjentkami z niskim poziomem genu *WWOX*.

W kolejnym typie nowotworu, glejaku wielopostaciowym (1.3), wykazano wysoki odsetek pacjentów z utratą heterozygotyczności w markerach D16S3096 i D16S504 (intron 8 genu *WWOX*), ale bez wpływu na poziom mRNA genu *WWOX*. Odnotowano również 18% metylację fragmentu promotora w pozycji od -508 do -174 pz oraz 15% metylację drugiego fragmentu w pozycji -171 do +239 pz, co skutkowało spadkiem ekspresji genu *WWOX*. Ponadto, najwyższy poziom mRNA *WWOX* obserwowany był w próbach heterozygotycznych (pod względem obu markerów mikrosatelitarnych) i niemetylowanych jednocześnie. Metylacja sekwencji promotorowej obniżała poziom ekspresji *WWOX* zarówno w heterozygotycznych, jak i w homozygotycznych próbach pacjentów. Również w tym typie nowotworu wykazano związek genu *WWOX* z proliferacją, apoptozą oraz szlakiem sygnalizacyjnym *ERBB4* poprzez izoformę JM-a.

Kolejne badania dotyczyły oceny, czy gen *WWOX* może wpływać na proces nowotworzenia jelita grubego (1.4) i, jeśli tak, jakie molekularne szlaki może modyfikować w tej tkance. W badaniu tym nie wykazano związku metylacji promotora genu *WWOX* ani LOH z poziomem ekspresji genu zarówno u pacjentów, jak i w badanych ludzkich liniach komórkowych. Jednakże badania na modelach linii komórkowych wykazały zróżnicowany poziom ekspresji *WWOX*: najniższy dla linii HT29 (pochodzącej od gruczolaka jelita grubego), następnie dla SW620 (wywodzącej się od pacjenta z guzem pierwotnym) i SW480 (wywodzącej się od pacjenta z guzem metastatycznym), zaś najwyższy dla HCT116 (wyizolowanej z hodowli pierwotnej komórek raka okrężnicy, stadium IV-Dukes D). Zaobserwowano także pozytywną korelację genu *WWOX* z indeksem antyapoptotycznym *BCL2/BAX* oraz genem *BCL2*, zaś negatywną z *CCNE1* i *MKI67*.

Prowadziłam także badania nad udziałem genu *WWOX* w dwóch najczęstszych nowotworach dziecięcych – guzie Wilmsa (nefroblastomie) (1.5) i neuroblastomie (1.6).

W pierwszym typie nowotworu wykazano wysoki odsetek pacjentów (30,4%) z utratą heterozygotyczności w locusie D16S3096 bez wpływu na regulację ekspresji genu *WWOX*. Jednakże metylacja sekwencji promotorowej w regionie od -508 do -174 pz, jak również we fragmencie obejmującym 3' koniec sekwencji promotora jak i ekson 1 genu *WWOX* (-171 do +239 pz), powodowała spadek ekspresji genu *WWOX*. Badania te wykazały pozytywną korelację genu *WWOX* z genem antyapoptotycznym *BCL2*, indeksem antyapoptotycznym *BCL2/BAX*, naskórkowym czynnikiem wzrostu *EGFR*, izoformą JM-a *ERBB4* i *TP73*, zaś negatywną zależność z cyklinami E1 i D1.

Podobne obserwacje miały miejsce w przypadku neuroblastom, gdzie wysoki odsetek utraty heterozygotyczności nie wpływał na poziom ekspresji genu *WWOX*, podobnie jak metylacja obu analizowanych fragmentów promotora ww. genu. W tym typie nowotworu dziecięcego odnotowano również, podobnie jak w guzie Wilmsa, pozytywną korelację ekspresji genu *WWOX* z izoformą JM-a *ERBB4* i *BCL2* oraz negatywną z cyklinami E1 i D1. Ponadto, wyższy poziom ekspresji *WWOX* związany był z korzystniejszą klasyfikacją kliniczno-patologiczną neuroblastomy (*International Neuroblastoma Pathology Classification*, INPC).

Podsumowanie badań nad rolą genu *WWOX* w wielu nowotworach zostało opublikowane w pracy poglądowej (1.7), gdzie zaprezentowano również wyniki badań własnych *in vivo* na linii komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231. Wzrost ekspresji genu *WWOX* w estrogeno-negatywnych komórkach raka piersi powodował zwiększoną ruchliwość komórek przy przechodzeniu przez błonę podstawną. Jednak, z drugiej strony, hamował wzrost komórek w zawieszynie, co może wskazywać na brak zdolności do przerzutowania z krwiobiegiem. Ponadto, zmienia się morfologia komórek nowotworowych na fenotyp przypominający nabłonek gruczołu piersiowego.

1.1 **Pluciennik E**, Kusińska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek AK. *Different expression of WWOX in estrogen receptor positive and negative breast cancer. Relation to proliferation and apoptosis*. Clin. Exp. Med. Lett. 2005; 46(4):25-30.

1.2 **Pluciennik E**, Kusińska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek AK. *WWOX-the FRA16D cancer gene: Expression correlation with breast cancer progression and prognosis*. EJSO 2006; 32: 153-157.

1.3 Kosła K, **Pluciennik E**, Kurzyk A, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R, Potemski P, Bednarek AK. *Molecular analysis of WWOX expression correlation with proliferation and apoptosis in glioblastoma multiforme*. J Neurooncol. 2010 Jan;101(2):207-13.

1.4 Żelazowski MJ, **Pluciennik E**, Pasz-Walczak G, Potemski P, Kordek R, Bednarek AK. *WWOX expression in colorectal cancer-a real-time quantitative RT-PCR study*. Tumour Biol. 2011 Jun;32(3):551-60.

1.5 **Pluciennik E**, Nowakowska M, Wujcicka WI, Sitkiewicz A, Kazanowska B, Zielińska E, Bednarek AK. *Genetic alterations of WWOX in Wilms' tumor are involved in its carcinogenesis*. *Oncol Rep*. 2012 Jul 27; 2284-2668.

1.6 Nowakowska M, **Pluciennik E**, Wujcicka WI, Sitkiewicz A, Kazanowska B, Zielińska E, Bednarek AK. *The correlation analysis of WWOX expression and cancer related genes in neuroblastoma- a real time RT-PCR study*. *Acta Biochim Pol*. 2014;61(1):91-7.

1.7 Lewandowska U, Żelazowski M, Seta K, Byczewska M, **Pluciennik E**, Bednarek AK. *WWOX, the tumour suppressor gene affected in multiple cancer*. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009, 60, Suppl 1, 47-56.

2. Molekularne mechanizmy wpływu układu renina-angiotensyna w nowotworach hormonoależnych (endometrium, prostata)

Angiotensyna II jest peptydem układu renina-angiotensyna, który za pośrednictwem sygnału przenieszonego przez receptory AT1 uczestniczy w skurczu naczyń krwionośnych, proliferacji komórek, reakcji zapalnej, ale również w procesie apoptozy poprzez receptor AT2. Badania wskazują, że peptyd ten odgrywa także rolę w procesie nowotworzenia (poprzez zaburzenia równowagi między proliferacją a apoptozą) jak i w syntezie śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF.

Publikacja 2.1 wskazuje na istotną rolę angiotensyny II w procesie nowotworzenia endometrium we wczesnych etapach rozwoju, gdyż prawdopodobnie w kolejnych etapach proliferacja jest stymulowana przez VEGF. Ponadto, badania te wskazują na znaczne obniżenie ekspresji receptora AT1 przy niskim stopniu zróżnicowania raka endometrium G3 w porównaniu z dobrze zróżnicowanymi komórkami G1. Najwyższą ekspresję receptora estrogenowego typu alfa (ER α) zanotowano w grupie pacjentek z nowotworem średnio zróżnicowanym G2, zaś najniższą w grupie pacjentek sklasyfikowanych z nowotworem o najniższym zróżnicowaniu – G3. Natomiast ekspresja śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF osiągała wyższy poziom wraz ze zmniejszeniem stopnia zróżnicowania komórek nowotworu endometrium. Zarówno u pacjentek z dobrze- (G1), jak i średniozróżnicowanymi (G2) komórkami nowotworu endometrium zanotowaliśmy pozytywną korelację między dwoma receptorami dla angiotensyny, zaś w stopniu G1 korelacja między receptorem AT1 a VEGF była negatywna.

Kolejne badania (2.2) wykazały pozytywną korelację między receptorem AT1 a receptorem VEGF (VEGFR) we wszystkich stopniach zróżnicowania nowotworu endometrium (G1, 2, 3). Jednak najniższa ekspresja VEGFR obserwowana była u pacjentek z nowotworami sklasyfikowanymi jako G1 oraz przy naciekaniu na warstwę myometrium

poniżej połowy jej grubości. Badania te wskazują więc na istotną rolę angiotensyny II poprzez jej receptor AT1 w regulacji ekspresji VEGFR.

Badania *in vitro* na trzech liniach komórkowych raka endometrium różniących się stopniem zróżnicowania wykazały odmienną funkcję angiotensyny II (publikacja 2.3). We wczesnych etapach kancerogenezy peptyd już w niskich stężeniach zaburzał proliferację komórek nowotworowych endometrium. Co więcej, w dobrze- i słabozróżnicowanych komórkach nowotworu endometrium zanotowaliśmy wpływ na proliferację zależny od stężenia angiotensyny II, co związane było ze wzrostem ekspresji genów takich jak: *MKI67* (marker proliferacji), *CCND1* i *CCNE1* (regulatory cyklu komórkowego). Ponadto, słabozróżnicowane komórki raka endometrium (MFE280) po indukcji angiotensyną II wykazywały zmianę fenotypu na mezenchymalny, co korelowało ze wzrostem ekspresji markerów EMT (takich jak *VIM*, *CD44*, *SNAI1*, *ZEB1* i *ZEB2*). Dodatkowo udowodniliśmy udział angiotensyny II w regulacji adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, indukcji ruchliwości komórek, a także zahamowaniu apoptozy w raku endometrium.

Z receptorami AT1 i AT2 oddziaływać może również angiotensyna IV – heksapeptyd powstały w wyniku usunięcia dwóch N-końcowych aminokwasów: kwasu asparaginowego i argininy. Peptyd ten uczestniczy w ścieżkach sygnałowych takich jak szlak kinaz MAPK, kinaz tyrozynowych czy NK- β . Fizjologiczna rola tego peptydu w komórce wciąż jest nie do końca poznana. Przeprowadzone badania (2.4) wskazują, iż wpływa on wyłącznie na proliferację komórek gruczolaka prostaty zależnego od androgenów (LNCaP), nie ma natomiast znaczenia dla bardziej inwazyjnych komórek nowotworu prostaty niezależnego od wpływu androgenów (DU-145). Badania te wykazały również, iż angiotensyna IV może zmieniać ekspresję receptorów AT1 i AT2 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.

Kolejne przeprowadzone przez nas badania (2.5) *in vitro* na prawidłowej linii komórek prostaty PNT1A wskazują na wzajemne funkcjonalne powiązanie pomiędzy angiotensyną II i relaksyną 2 wobec żywotności, proliferacji, adhezji czy ruchliwości, co ma związek z procesem nowotworzenia gruczołu krokowego. Oba te peptydy jednocześnie wywierały efekt addytywny na żywotność komórek prostaty w hodowli 3D w porównaniu z działaniem każdego z tych peptydów testowanego osobno. Wpływ na to może mieć między innymi wzrost wartości indeksu antyapoptotycznego *BCL2/BAX*. Ponadto, komórki prostaty przy długim traktowaniu obydwoma peptydami wykazywały zwiększoną zdolność do

przechodzenia przez błonę podstawną, co związane było ze zmianą aktywności metaloproteinaz. Oprócz tego zaobserwowaliśmy, że relaksyna 2 zwiększa ekspresję receptora *LGR7*, ale także klasycznych receptorów angiotensyny *AT1* i *AT2*.

Wykazaliśmy również istotny wpływ obu tych peptydów na procesy biologiczne, takie jak: żywotność, proliferacja, adhezja, inwazja – w różnym stopniu w dwóch liniach raka prostaty o odmiennych profilach inwazyjności (PC3 – wysoki potencjał metastatyczny, LNCaP – niski stopień inwazyjności). Angiotensyna II i relaksyna 2 w istotny sposób zwiększały agresywność raka prostaty poprzez nadekspresję surwiwiny oraz zwiększoną ilość wydzielanych metaloproteinaz. Zaobserwowaliśmy również zmiany w ekspresji receptora angiotensyny, co może wskazywać na udział tych peptydów w przejściu od fenotypu zależnego od androgenów do niezależnego w raku prostaty (2.6).

2.1 Piastowska-Ciesielska A, **Pluciennik E**, Wójcik-Krowiranda K, Bieńkiewicz A, Bednarek AK, Ochędalski T. *Analysis of the expression of angiotensin II type 1 receptor and VEGF in endometrial adenocarcinoma with different clinicopathological characteristics*. Tumour Biol. 2012 Jun;33(3):767-74.

2.2 Piastowska-Ciesielska AW, **Pluciennik E**, Wójcik-Krowiranda K, Bieńkiewicz A, Nowakowska M, Pospiech K, Bednarek AK, Domińska K, Ochędalski T. *Correlation between VEGFR-2 receptor kinase domain-containing receptor (KDR) mRNA and angiotensin II receptor type 1 (AT1-R) mRNA in endometrial cancer*. Cytokine. 2013 Feb;61(2):639-44.

2.3 Nowakowska M, Matysiak-Burzyńska Z, Kowalska K, **Pluciennik E**, Domińska K, Piastowska-Ciesielska AW. *Angiotensin II promotes endometrial cancer cell survival*. Oncol Rep. 2016 Aug;36(2):1101-10.

2.4 Dominska K, Piastowska-Ciesielska AW, **Pluciennik E**, Lachowicz-Ochedalska A, Ochędalski T. *A comparison of the effects of Angiotensin IV on androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cell lines*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2013 Mar;14(1):74-81.

2.5 Domińska K, Ochędalski T, Kowalska K, Matysiak-Burzyńska ZE, **Pluciennik E**, Piastowska-Ciesielska AW. *A common effect of angiotensin II and relaxin 2 on the PNT1A normal prostate epithelial cell line*. J Physiol Biochem. 2016 Apr 27

2.6. Domińska K, Ochędalski T, Kowalska K, Matysiak-Burzyńska ZE, **Pluciennik E**, Piastowska-Ciesielska AW. *Interaction between angiotensin II and relaxin 2 in the progress of growth and spread of prostate cancer cells*. Int J Oncol. 2016 Jun;48(6):2619-28.

3. Poszukiwanie nowych molekularnych markerów diagnostyczno-prognostycznych w raku piersi

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym wśród kobiet w Polsce i na świecie. Wciąż poszukuje się nowych czynników molekularnych, które pozwolą na lepsze

prognozowanie przebiegu choroby jak i jej rokowania w porównaniu z klasycznymi czynnikami prognostycznymi stosowanymi w klinice (takimi jak typ histologiczny i ocena stopnia złośliwości histologicznej, status receptorów estrogenu i progesteronu, obecność receptora HER2, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, aktywność proliferacyjna, wielkość guza i wiek chorej). Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej, takich jak mikromacierze czy amplifikacja DNA w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), powstały komercyjne testy diagnostyczne (np. MammaPrint, OncotypeDx, Theros-breast cancer gene expression ratio assay, PAM50), które pozwalają na dokładniejszą klasyfikację pacjentek do odpowiedniej terapii. Z drugiej strony, mają one znaczne ograniczenia co do typów pacjentek, które można diagnozować tymi technikami. Dlatego wciąż prowadzone są badania molekularne, które pozwolą na lepsze zrozumienie biologii tego procesu, a co za tym idzie, przyczynią się do poprawy leczenia poprzez kontrolę podłoża molekularnego i indywidualizację przypadków.

Sprawdziliśmy więc, czy regulator cyklu komórkowego – cyklina E może być czynnikiem prognostycznym w raku piersi.

Badania te (3.1) wykazały związek między wysoką ekspresją cykliny E i gorszymi przeżyciami pacjentek w porównaniu z pacjentkami z niską ekspresją cykliny E, a także w grupie pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych i leczonych chemioterapią uzupełniającą.

Dodatkowo, wysoki poziom cykliny E związany był z negatywnym statusem receptorów steroidowych, wyższą proliferacją i stopniem zaawansowania choroby, a także obecnością receptora HER2. Co więcej, pacjentki z niską ekspresją cykliny E i wysokim indeksem ER/PR wykazywały lepsze prognozy przeżycia niż przy wysokiej ekspresji cykliny E i niskim indeksie ER/PR (3.2).

Jednym z istotniejszych kryteriów kwalifikujących pacjentki z rakiem piersi do odpowiedniego leczenia jest klasyfikacja pod względem obecności receptora estrogenowego (ER). Wykorzystując mikromacierze Perou i wsp. zanotowali odmienne profile molekularne dla pacjentek z rakiem piersi w zależności od obecności ER.

Celem naszej pracy (3.3) było określenie, która klasyfikacja pacjentek w zależności od statusu ER na poziomie mRNA (techniką RT-qPCR) czy na poziomie białka (techniką immunohistochemiczną) jest bardziej precyzyjna w ocenie ekspresji cytokeratyn typu

podstawnego (CK5 i CK17) oraz HER2. Wykazaliśmy pewną niezgodność między tymi dwiema technikami w klasyfikacji pacjentek według poziomu ER. Ponadto, poziom mRNA ER nie korelował z przeżyciami pacjentek; co więcej, analiza cytokeratyn typu bazalnego oraz HER2 nie pozwoliła na podzielenie pacjentek na ER-pozytywne i ER-negatywne na poziomie mRNA, co można było wykonać techniką immunohistochemiczną. Wyniki te mogą wskazywać na wątpliwą użyteczność oceny mRNA ER jako czynnika molekularnego w rozróżnianiu typów nowotworów piersi.

Technika immunohistochemiczna wydaje się również bardziej użyteczną metodą w ocenie prognozowania przeżyć pacjentek na podstawie poziomu cykliny E (3.4). Użycie tej techniki pozwoliło na wykazanie związku pomiędzy wysokim poziomem białka cykliny E a brakiem receptorów ER i PR oraz młodszym wiekiem pacjentek. Różnice w wynikach między tymi metodami otrzymaliśmy także w ocenie ekspresji cytokeratyn typu podstawnego (CK5, CK14, CK17) w raku piersi. Metoda immunohistochemiczna wykazała zależność między obecnością cytokeratyn a brakiem ER, podczas gdy na poziomie mRNA takiej zależności nie zaobserwowano (3.5). Kolejnym przebadanym przez nas techniką immunohistochemiczną i RT-qPCR potencjalnym markerem w raku piersi był *MKI67*, którego wartość prognostyczna nadal nie jest jednoznaczna. Przy pomocy obu technik wykazaliśmy związek między poziomem ekspresji tego genu a zwiększoną proliferacją u pacjentek z nowotworami piersi słabo zróżnicowanymi (grade 3), ale brak zależności z innymi czynnikami klinicznymi, takimi jak: wiek, stopień zaawansowania choroby, przerzuty do węzłów chłonnych, obecność receptorów ER czy HER2. Nie zaobserwowaliśmy, aby *MKI67* było niezależnym czynnikiem prognostycznym, w przeciwieństwie do ekspresji ER czy zajęcia węzłów chłonnych (3.6). Różnice w wynikach uzyskanych metodą RT-qPCR i immunohistochemiczną mogą wynikać z heterogenności tkanki raka piersi, jaką poddano analizie.

W kolejnej pracy (3.7) sprawdziliśmy, czy ocena ekspresji HER2 na poziomie mRNA może być użyteczną techniką obok standardowo wykonywanej oceny immunohistochemicznej tego markera jako czynnika prognostycznego. Zaobserwowaliśmy, iż RT-qPCR, podobnie jak barwienie immunohistochemiczne, pozwala na wyróżnienie odrębnych grup pacjentek z rakiem piersi w zależności od poziomu ekspresji HER2 z różnym ryzykiem zgonu w okresie 5 lat. Ponadto, analiza HER2 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA wykazała większe ryzyko zgonu przy wysokiej ekspresji HER2 u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych.

Sprawdziliśmy również wpływ poziomu ekspresji cytokeratyn typu podstawnego CK5/6 i 17 na przeżycie pacjentek z rakiem piersi (3.8). Zanotowaliśmy, iż pacjentki określone jako CK5/6- i CK17-pozytywne wykazywały krótsze przeżycie w porównaniu z pacjentkami CK5/6- i CK17-negatywnymi i bez przerzutów do węzłów chłonnych przy braku związku w grupie pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych. Wykazaliśmy jednak, iż złe prognozy raka piersi typu bazalnego związane są bardziej z brakiem ER oraz wysoką ekspresją cykliny E niż z ekspresją badanych cytokeratyn.

Kolejnym białkiem, które sprawdziliśmy pod względem czynnika prognostycznego w raku piersi typu bazalnego była kadheryna P – białko odgrywające rolę w adhezji komórek (3.9). Okazało się, iż poziom tego białka negatywnie korelował z obecnością receptorów estrogeny i progesteronu, zaś pozytywnie z ekspresją cytokeratyn typu podstawnego i cykliną E, jednak jej poziom nie wpływał na czas przeżycia pacjentek.

W następnej publikacji (3.10) wykazaliśmy, iż włączenie białka filamentów pośrednich – wimentyny do klasyfikacji panelu markerów raka piersi typu podstawnego (potrójnie negatywnego: ER-, PR-, HER2-) nie zwiększa skuteczności prognozowania przeżycia pacjentek.

W celu całościowego zrozumienia procesu kancerogenezy konieczne jest kompleksowe badanie genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, wzrostu, różnicowania, apoptozy, przekazywania sygnału czy regulacji hormonalnej. Dlatego też grupując geny pod względem wzajemnych korelacji, funkcji biologicznej jak i znaczenia przy leczeniu, opracowałam algorytm składający się z 10 genów, których wysoki poziom związany jest z lepszymi przeżyciami (*WWOXwt*, *CDH1*, *ESR*, *BAX*) oraz złymi prognozami (*CCNE1*, *BCL2*, *BIRC5*, *KRT5*, *KRT14*, *KRT117*) (3.11). Na podstawie poziomu ekspresji panelu genów zaobserwowałam znaczące różnice w ryzyku wznowy choroby nowotworowej wśród pacjentek z pierwotnym rakiem piersi. Pacjentki z wysoką wartością algorytmu wykazywały mniejsze ryzyko wznowy w ciągu 5 lat względem pacjentek z guzami wykazującymi niską wartość algorytmu. Analiza tego panelu genów pozwoliła na wydzielenie w grupie pacjentek z estrogeno-negatywnym (ER-) rakiem piersi dwóch grup różniących się ryzykiem wznowy choroby w zależności od wartości algorytmu. Pacjentki z nowotworami estrogeno-negatywnymi charakteryzującymi się niskim poziomem algorytmu wykazywały wyższe ryzyko nawrotu choroby w porównaniu z wysokim poziomem algorytmu. W przypadku raków estrogeno-zależnych piersi algorytm ten nie wykazywał znaczenia rokowniczego.

W kolejnych badaniach (3.12, 3.13, 3.14) oceniono użyteczność trzech markerów: mammaglobiny 1, telomerazy i cytokeratyny 19 w detekcji komórek nowotworowych we krwi obwodowej pacjentek z rakiem piersi. Wszystkie trzy analizowane geny na poziomie mRNA nie wykazywały znacząco wyższej ekspresji u pacjentek z rakiem piersi w porównaniu z kobietami zdrowymi czy z łagodnymi zmianami w gruczole piersiowym.

Podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat nowych molekularnych czynników prognostycznych (takich jak cytokeratyny typu podstawnego, cyklina E, receptory estrogenu i progesteronu, HER2) u chorych na raka piersi zostało przedstawione w pracy poglądowej 3.15.

- 3.1 Potemski P, Kusińska R, Pasz-Walczak G, Piekarski JH, Watała C, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kordek R. *Prognostic relevance of cyclin E expression in operable breast cancer*. Med Sci Monit, 2009; 15(2): MT34-40.
- 3.2 Potemski P, Kusinska R, Watala C, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kordek R. *Cyclin E expression in breast cancer correlates with negative steroid receptor status, HER2 expression, tumor grade and proliferation*. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2006;25:59-64.
- 3.3 Potemski P, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kusińska R, Kubiak R, Kordek R. *Evaluation of oestrogen receptor expression in breast cancer by quantification of mRNA*. Histopathology 2007, 51, 829–836.
- 3.4 Potemski P, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kusińska R, Kupnicka D, Pasz-Walczak G, Watała C, Kordek R. *Cyclin E expression in operable breast cancer quantified by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: a comparative study with immunostaining*. Jpn. J. Clin. Oncol. 2006;36:142-149.
- 3.5 Kordek R, Potemski P, Kusinska R, **Pluciennik E**, Bednarek A. *Basal keratin expression in breast cancer by quantification of mRNA and by immunohistochemistry*. J Exp Clin Cancer Res. 2010 Apr 28;29:39.
- 3.6 Potemski P, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kusinska R, Kubiak R, Jesionek-Kupnicka D, Watala C, Kordek R. *Ki-67 expression in operable breast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay*. Pathol Res Pract. 2006;202(7):491-5.
- 3.7 Potemski P, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kusinska R, Pasz-Walczak G, Jesionek-Kupnicka D, Watala C, Kordek R. *A comparative assessment of HER2 status in operable breast cancer by real-time RT-PCR and by immunohistochemistry*. Med Sci Monit. 2006 Dec; 12(12) :MT57-61.
- 3.8 Potemski P, Kusińska R, Watała C, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kordek R. *Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer*. Oncology (Basel) 2005;69:478-485.
- 3.9 Potemski P, Kusinska R, Kubiak R, Piekarski JH, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Kordek R. *Relationship of P-cadherin expression to basal phenotype of breast carcinoma*. Pol J Pathol 2007, 58, 3, 183-188.
- 3.10 Kusinska RU, Kordek R, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Piekarski JH, Potemski P. *Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'?* J Exp Clin Cancer Res. 2009 Aug 20;28:118.

- 3.11 **Pluciennik E**, Krol M, Nowakowska M, Kusinska R, Potemski P, Kordek R, Bednarek AK. *Breast cancer relapse prediction based on multi-gene RT-PCR algorithm*. Med Sci Monit. 2010 Feb 26;16(3):CR132-136.
- 3.12 Wroński K, **Pluciennik E**, Żelazowski MJ, Seta K, Byczewska M, Bednarek AK. *Czy ludzkie mRNA mammaglobiny 1 jest dobrym markerem detekcji komórek nowotworowych we krwi obwodowej chorych na raka piersi?* Współczesna Onkologia 2008; 12; 4 (153-161).
- 3.13 Wroński K, **Pluciennik E**, Żelazowski MJ, Seta K, Byczewska M, Bednarek AK. *Czy cytokeratyna 19 jest dobrym markerem detekcji komórek nowotworowych we krwi obwodowej pacjentek z rakiem piersi?* Gin Prakt 2008; 2: 24-33.
- 3.14 Wroński K, **Pluciennik E**, Żelazowski M, Seta K, Byczewska M, Bednarek AK. *Czy oznaczanie telomerazy na poziomie mRNA może być dobrym markerem detekcji komórek nowotworowych we krwi obwodowej pacjentek z rakiem piersi?* Gin Prakt 2010; 1: 27-33.
- 3.15 Bednarek A, **Pluciennik E**, Kordek R, Kusińska R. *Nowe molekularne czynniki prognostyczne u chorych na raka piersi*. Współcz Onkol (2004) vol. 8; 6 (296–302).

Inne badania

Tematyka badań, w które byłam zaangażowana, związana była również z badaniem podłoża molekularnego oponiaka (1) oraz nietypowych przypadków pacjentów: z kostnym mięśniakiem prążkowanokomórkowym przypominającym kostniakomięsaka (2) oraz z rzadkim przypadkiem pozawęzłowego chłoniaka strefy brzeżnej systemu MALT w centralnym układzie nerwowym (3).

Ponadto, brałam udział w badaniach szacujących powiązanie pomiędzy poziomem ekspresji genu *NEMO* a rozwojem stanu przedrzucawkowego. Określono w nich poziomy ekspresji genu *NEMO* dla jego poszczególnych transkryptów (1A, 1B, 1C) oraz dla całościowej frakcji mRNA. Uzyskane wyniki wskazywały, iż w czasie rozwoju stanu przedrzucawkowego we krwi kobiet oraz we krwi pępowinowej ich dzieci, poziom ekspresji całkowitej frakcji mRNA genu *NEMO* oraz poziomy ekspresji dla poszczególnych jego transkryptów 1A, 1B i 1C były znacząco wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast badanie przeprowadzone na preeklamptycznych łożyskach wykazało przeciwstawny efekt obserwowany we krwi w odniesieniu do poszczególnych transkryptów genu *NEMO* jak i dla transkryptu całkowitego. Sugeruje się, iż spadek ekspresji genu *NEMO* w łożyskach może być przyczyną ich nasilonej apoptozy, prowadzącej do rozwoju stanu przedrzucawkowego (4).

Jestem również współautorem pracy poglądowej dotyczącej białek uczestniczących w oporności wielolekowej w terapii przeciwnowotworowej (5).

1. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Woźniak K, Bednarek AK, **Pluciennik E**, Jaskólski D, Sikora B, Liberski PP. *GADD45a and 4.1R as putative tumour suppressor genes localized on 1p chromosome and involved in meningioma pathogenesis*. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Oct 1;162(1):63-7.
2. Kordek R, Sowa P, Panasiuk M, Kmiecik M, Chudobinski C, **Pluciennik E**, Bednarek AK, Potemski P, Jesionek-Kupnicka D. *Primary osseous rhabdomyosarcoma with focal matrix formation mimicking osteosarcoma*. Pathology – Research and Practice 203 (2007) 873–877.
3. Jesionek-Kupnicka D, Smolewski P, Kupnicki P, **Pluciennik E**, Zawlik I, Papierz W, Kordek R. *Primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type in the central nervous system (MZL CNS) presented as traumatic subdural hematoma and subarachnoid bleeding - case report*. Clin Neuropathol. 2013 Sep-Oct;32(5):384-92.
4. Sakowicz A, Hejduk P, Pietrucha T, Nowakowska M, **Pluciennik E**, Pospiech K, Gach A, Rybak-Krzyszowska M, Sakowicz B, Kaminski M, Krasomski G, Biesiada L. *Finding NEMO in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol. 2016 Apr;214(4):538.e1-7.
5. Popęda M, **Pluciennik E**, Bednarek AK. *Proteins in cancer multidrug resistance*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2014 May 20;68(0):616-32.

c) Udział w projektach badawczych

1. *Rola genu supresorowego WWOX w kancerogenezie endometrium*; 2010-2015, Narodowe Centrum Nauki, **kierownik**
2. *Wykorzystanie metody amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym do oznaczania poziomu ekspresji wybranych markerów diagnostyczno-prognostycznych w raku piersi*; 2005-2006, grant promotorski, Komitet Badań Naukowych, **główny wykonawca**
3. *Selektywne wyciszanie genów jako nowoczesne narzędzie w ocenie zaangażowania angiotensyny II w procesie transformacji endometrium - określenie roli receptora androgenowego w przekaznictwie sygnału indukowanego AngII*; 2014-2016, Narodowe Centrum Nauki, **wykonawca**
4. *Gen supresorowy nowotworów WWOX - charakterystyka funkcji w prawidłowym gruczole piersiowym i w komórkach raka piersi*; 2012-2016, Narodowe Centrum Nauki, **wykonawca**
5. *Ocena wpływu angiotensyny II i relaksyny 2 na inwazyjność komórek raka gruczołu krokowego w trójwymiarowych modelach in vitro*; 2010-2014, Komitet Badań Naukowych, **wykonawca**
6. *Badanie profili ekspresji genów kontroli cyklu komórkowego, szlaków sygnałowych i funkcjonalnych w raku jelita grubego*; 2008-2011, Komitet Badań Naukowych, **wykonawca**
7. *Mikromacierze DNA do oceny farmakogenomicznego profilu ekspresji genów w komórkach dziecięcych guzów zarodkowych*; 2008-2011, Komitet Badań Naukowych, **wykonawca**

d) Nagrody za działalność naukową

1. Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – nagroda naukowa zespołowa I stopnia za cykl publikacji *Rola genu WWOX w regulacji procesów komórkowych w nowotworach*, 2015,
2. Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – nagroda naukowa zespołowa I stopnia za cykl publikacji *Rola genu supresorowego WWOX w procesie nowotworzenia*, 2014,
3. Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – nagroda naukowa zespołowa II stopnia za cykl publikacji *Analiza ekspresji oraz zależności pomiędzy receptorem angiotensynowym typu pierwszego, VEGF i KDR w nowotworach endometrium o różnej charakterystyce*, 2013,
4. Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – nagroda naukowa zespołowa II stopnia *Wpływ peptydów z rodziny angiotensyn na proliferację, adhezję i rozprzestrzenianie się komórek androgenozależnego i androgenoniezależnego raka gruczołu krokowego*, 2013,
5. Indywidualna Nagroda Ministra Zdrowia – nagroda za pracę doktorską, 2008,
6. Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – nagroda naukowa zespołowa I stopnia, 2007.

e) Działalność ekspercka - recenzje dla czasopism naukowych

Recenzent w czasopismach:

1. Tumor Biology ISSN: 1010-4283, jeden manuskrypt w 2015, jeden manuskrypt w 2016,
2. Medical Science Monitor ISSN: 1643-3750, dwa manuskrypty w 2015,
3. International Journal of Oncology ISSN: 1019-6439, jeden manuskrypt w 2015,
4. Oncology Letters ISSN: 1792-1074, trzy manuskrypty w 2015,
5. Archives of Gerontology and Geriatrics ISSN: 0167-4943, jeden manuskrypt w 2015,
6. Diagnostic Pathology ISSN: 1746-1596, jeden manuskrypt w 2015, jeden manuskrypt w 2016,
7. Metabolic Brain Disease ISSN: 0885-7490, jeden manuskrypt w 2016,
8. Pharmaceutical Patent Analyst ISSN: 2046-8954, jeden manuskrypt w 2016,
9. International Journal of Molecular Medicine ISSN: 1107-3756, jeden manuskrypt w 2016,
10. Molecular Medicine Reports ISSN: 1791-2997, jeden manuskrypt w 2016,
11. Oncology Reports ISSN: 1021-335X, jeden manuskrypt w 2016.

f) Udział w szkoleniach

2011- ukończenie szkolenia „Intensywny kurs języka angielskiego” zrealizowanego w ramach projektu „Poprawa jakości nauczania w języku angielskim na Uniwersytecie

Medycznym w Łodzi poprzez podniesienie kompetencji akademickiej kadry dydaktycznej” organizowanego przez Centrum Nauczania Języków Obcych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2011- ukończenie szkolenia „Podstawy metodyki nauczania dyscyplin biomedycznych” zrealizowanego w ramach projektu „Poprawa jakości nauczania w języku angielskim na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi poprzez podniesienie kompetencji akademickiej kadry dydaktycznej”

g) Działalność dydaktyczna

Jestem kierownikiem przedmiotu biologia molekularna na I stopniu oraz *structural bioinformatics* na II stopniu studiów Biotechnologia Medyczna Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Ponadto, prowadzę zajęcia ze studentami z przedmiotów: bioinformatyka, genetyka drobnoustrojów, podstawy inżynierii genetycznej, kancerogeneza molekularna, komputerowe modelowanie białek, mikrobiologia z elementami mikrobiologii lekarskiej, *laboratory of genetic analysis method*.

Jestem współautorem skryptów dla studentów:

1. Bioinformatyka algorytmy ISBN: 978-83-61058-95-3
2. Bioinformatyka podstawy ISBN: 978-83-61058-91-5
3. Biologia molekularna ISBN: 978-83-62807-15-4
4. Kancerogeneza molekularna ISBN: 978-83-62807-29-1
5. Modelowanie białek ISBN: 978-83-62807-29-1

Ponadto, dwukrotnie (2011 i 2013) prowadziłam warsztaty z młodzieżą liceów patronackich Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z zakresu genotypowania.

Byłam promotorem 5 prac magisterskich oraz 15 prac licencjackich na Wydziale Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Jestem promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej Mgr inż. Izabeli Baryły „Białko WWOX jako wielofunkcyjny modulator transkrypcji w patogenezie cukrzycy ciężowej” na Wydziale Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (od 2013 roku do obecnego dnia).

Płucienik