

Załącznik nr 2 do wniosku
o wszczęcie postępowania habilitacyjnego
z dnia 18 czerwca 2018 r.

Dr n. med. Janusz Godlewski

Autoreferat

**„Analiza ekspresji genu *PLAGL1* oraz powiązanych z nim genów i białek w raku
jasnokomórkowym nerki i ich rola w prognozowaniu przebiegu choroby”**

Katedra Histologii i Embriologii Człowieka
Wydział Lekarski, *Collegium Medicum*,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2018

1. Imię i nazwisko
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.
4. Informacje o obecnym zatrudnieniu
5. 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,
 - b) cykl publikacji (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),
 - c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

1. Imię i nazwisko - Janusz Godlewski

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

1988 r. Dyplom lekarza, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Białymstoku.

2007 r. Stopień doktora nauk medycznych w zakresie anatomii prawidłowej człowieka na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Gdańsku, „Immunohistochemiczna charakterystyka neuronów zwojów śródściennych jelita grubego u chorych na raka esicy i odbytnicy”, promotor prof. dr hab. Ireneusz Mirosław Łakomy.

1994 r. I stopień specjalizacji z Chirurgii Ogólnej, kierownik specjalizacji lek. H. Zalewski.

1999 r. II stopień specjalizacji z Chirurgii Ogólnej, kierownik specjalizacji lek. H. Zalewski.

2005 r. Specjalizacja z Chirurgii Onkologicznej, kierownik specjalizacji dr med. G. Kuciel-Lisieska.

1998 r. Dyplom studiów podyplomowych z zakresu pedagogiki, Olsztyńska Szkoła Wyższa.

3. Informacje o obecnym zatrudnieniu:

Od 2008 r. do nadal: Katedra Histologii i Embriologii Człowieka, Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie - adiunkt.

Od 2002 r. do nadal: Oddział Chirurgii Onkologicznej, Zespół Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych z Warmińsko-Mazurskim Centrum Onkologii w Olsztynie (SP ZOZ MSW z W-M CO) - starszy asystent.

4. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:

1998-2017 r. Wydział Fizjoterapii, Wydział Zdrowia publicznego, Olsztyńska Szkoła Wyższa im. J. Rusieckiego - wykładowca przedmiotu: anatomia prawidłowa człowieka.

1995-1998 r. Wydział Fizjoterapii, Studium Podyplomowe „GLOB” w Olsztynie- asystent, przedmiot: anatomia prawidłowa człowieka.

1992-2002 r. Oddział Chirurgii Ogólnej w Szpitalu Ministerstwa Spraw Wewnętrznych w Olsztynie- starszy asystent.

1991-1992 r. Oddział Chirurgii Ogólnej w Szpitalu Wojewódzkim w Wałbrzychu- młodszy asystent.

1990-1991 r. Praca w Health Force w Riverhead, NY. USA na stanowisku pielęgniarki w Central Suffolk Hospital i Southampton Hospital i w zakresie opieki domowej.

1988 – 1989 r. Staż podyplomowy w Szpitalu Miejskim w Olsztynie.

5. 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.).

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl czterech prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. We wszystkich tych pracach jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego.

„Analiza ekspresji genu *PLAGL1* oraz powiązanych z nim genów i białek w raku jasnokomórkowym nerki i ich rola w prognozowaniu przebiegu choroby”

b) Cykl publikacji (autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania).

1. **Godlewski J**, Krazinski B.E, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sulik M, Tenderenda M, Biernat W, Kmiec Z. *PLAGL1 protein is differentially expressed in the nephron segments and collecting ducts in human kidney*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2015; 53(1): 96–104. IF: 1,060; Punktacja MNiSW: 15.

2. **Godlewski J**, Krazinski BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sliwinska-Jewsiewicka A, Maslowski Z, Kmiec Z. *PLAGL1 (ZAC1/LOT1) Expression in clear cell renal cell carcinoma: correlations with disease progression and unfavorable prognosis*. *Anticancer Research*. 2016; 36(2):617-24.

IF: 1,937; Punktacja MNiSW: 20.

3. **Godlewski J**, Kraziński BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sliwinska-Jewsiewicka A, Wierzbicki PW, Kmiec Z. *Expression and prognostic significance of EP300, TP 53 and BAX in clear cell renal cell carcinoma*. *Anticancer Research*. 2017; 37(6): 2927-2937.

IF: 1,937; Punktacja MNiSW: 20.

4. **Godlewski J**, Kiezun J, Kraziński BE, Kozielec Z, Wierzbicki PM, Kmiec Z. *The presence of YAP1 and LATS1 proteins in the clear cell renal cell carcinoma - an impact to the patients' survival*. *BioMed International Journal*, 2018 Apr 3;2018:2653623. doi: 10.1155/2018/2653623. eCollection 2018.

IF: 2,476; Punktacja MNiSW: 25.

Łączny IF prac składających się na „osiągnięcie naukowe” wynosi: 7,410.

Łączna liczba punktów MNiSW prac wynosi: 80.

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

Wprowadzenie

Nowotwory złośliwe są istotnym problemem zdrowotnym, w Polsce w roku 2015 zachorowało 63 281 osób. Jest to choroba o wyniszczającym przebiegu i obarczona jest bardzo dużą śmiertelnością. Obecnie jest to druga w kolejności przyczyna zgonów, w roku 2015 z jej powodu w Polsce zmarło 100 600 chorych. Nowotworem, który charakteryzuje się stale wzrastającym trendem zachorowań jest rak nerki, co w liczbie ogólnej nowotworów złośliwych stanowi 3,9% u mężczyzn i 2,4% u kobiet, z ogólną liczbą 5 077 nowych przypadków w roku 2015 [1].

Powszechnie wiadomo, że możliwość wyleczenia z nowotworu narządowego, w tym i raka nerki, uzależniona jest wyłącznie od wczesnego wykrycia choroby i rozpoczęcia leczenia na etapie regionalnego zaawansowania choroby. Uważa się, że w wielu typach nowotworów złośliwych rozwój guza następuje w wyniku sekwencji kolejnych mutacji w kolejności: protoonkogenów, genów supresorowych i genów mutatorowych. Identyfikacja genów których mutacja prowadzi do rozwoju raka, służy wytypowaniu grupy osób z ryzykiem choroby (u których taka mutacja wystąpiła), które należy objąć zwiększonym nadzorem w zakresie badań profilaktycznych i wykrycia choroby we wczesnym etapie rozwoju. W chwili obecnej nie ma pełnej wiedzy dotyczącej genów których mutacja prowadzi do powstania choroby i do jej progresji, a ponadto każdy typ nowotworu ma swój własny, specyficzny profil mutacji genowych.

W przypadku wykrycia nowotworu złośliwego ocena kliniczna zaawansowania choroby służy do przygotowania planu leczenia. W raku nerki, w okresie choroby ograniczonym tylko do narządu, leczenie chirurgiczne, usunięcie nerki lub usunięcie jej części, jest zasadniczym leczeniem. W zakresie pooperacyjnej oceny histopatologicznej w raku nerki stosuje się klasyczne barwienie histologiczne, hematoksyliną i eozyną, które służy do rozpoznania morfologicznego typu nowotworu, określenia stopnia złośliwości biologicznej (skala G, z uwzględnieniem klasyfikacji Fuhrman w raku jasnokomórkowym nerki) oraz zdefiniowanie nowotworu wg skali TNM, w której określany jest stopień nacieku raka w obrębie narządu (wielkość guza - cecha T) oraz obecność lub brak przerzutów w węzłach chłonnych (cecha N). Te cechy w zestawieniu z klinicznie stwierdzoną obecnością przerzutów odległych (cecha M) stanowią o stopniu zaawansowania [2]. Obecnie w zakresie oceny patomorfologicznej używa się także barwień immunohistochemicznych (IHC)

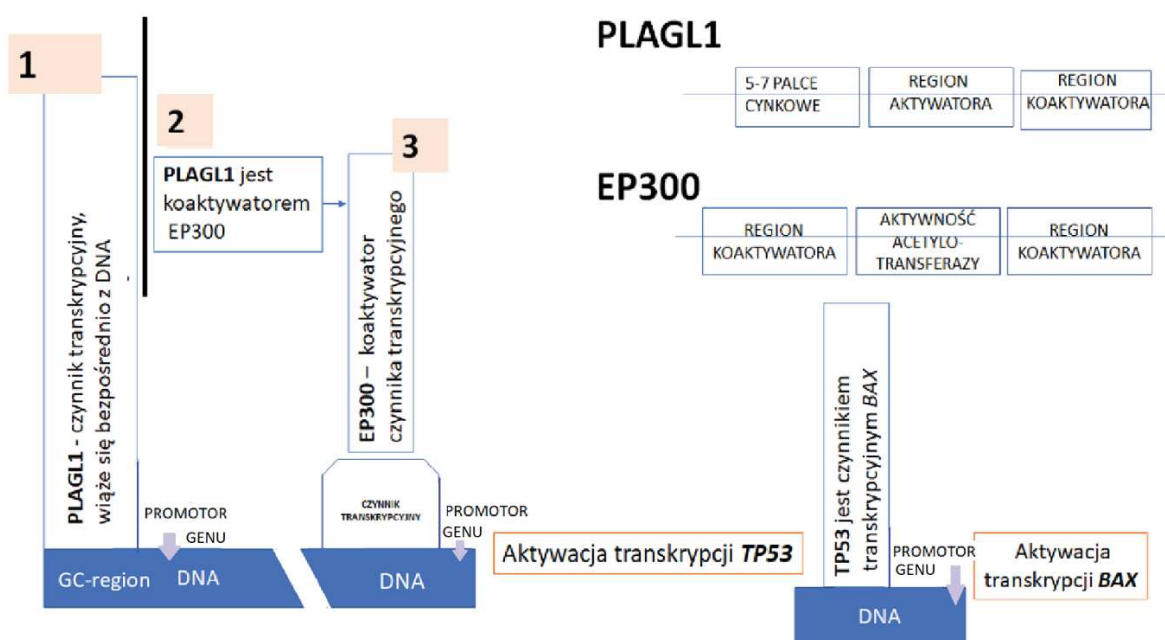
wykrywających obecność określonych antygenów, w zakresie potwierdzenia typu morfologicznego raka nerki.

Nowotwory nerki wywodzące się z komórek nabłonkowych dzieli się na typy według kryteriów zawartych w klasyfikacji WHO. Przez wiele lat wyróżniano następujące podstawowe rodzaje nowotworów nerki: rak jasnokomórkowy nerki (RJK), rak brodawkowaty, rak chromofobowy, rak cewek zbiorczych, rak rdzeniasty, rak śluzowocewkowy i wrzecionowatokomórkowy, gruczolak brodawkowaty, onkocytoma i rak niesklasyfikowany. W aktualizacji z roku 2016 wyróżniono nowe typy nowotworów nerki takie jak torbielowaty wielokomorowy nowotwór nerki o małym potencjale złośliwości (multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential), rak rodzinny związany z translokacją MiT, rak cewkowo-torbielowaty, dziedziczny rak towarzyszący mięśniakowi gładkokomórkowemu, rak jasnokomórkowy brodawkowaty, rak związany z niedoborem dehydrogenazy bursztynianowej i rak towarzyszący nabytej torbielowatości nerek [3]. Jak dotąd, mimo wielu badań nie udało się ustalić molekularnych markerów, które mogłyby stosowane jako wskaźniki prognostyczne i predykcyjne raka nerki [2]. Istnieje więc pilna potrzeba dalszych poszukiwań w celu wykrycia genów oraz kodowanych przez nie białek, których ekspresja może służyć prognozowaniu przebiegu choroby, określeniu potencjału przerzutowania lub ustaleniu ryzyka nawrotu choroby. Ustalenie markerów molekularnych określonych rodzajów nowotworów stanowi podstawę „medycyny spersonalizowanej”, który to termin oznacza indywidualnie określony profil leczenia systemowego i ponadto odpowiedni dobór badań kontrolnych i przedziałów czasowych pomiędzy tymi badaniami. Na podstawie tej oceny molekularnej jest wdrażane bardziej lub mniej agresywne leczenie adjuwantowe, np. w raku piersi, raku jelita grubego i czerniaku.

W grupie raków nerki, rak jasnokomórkowy nerki (RJK) jest najczęstszym typem morfologicznym i stanowi około 65-70% przypadków. Makroskopowo jest to zazwyczaj dobrze odgraniczony, owalny guz o jasno lub ciemno żółtym kolorze z ogniskami martwicy i włóknienia. W obrazie mikroskopowym tkankę guza budują owalne komórki o bardzo jasnej cytoplazmie. Obraz jasnej cytoplazmy powstaje w efekcie wypłukania z niej glikogenu i lipidów przez alkohol użyty w technice histologicznej. Komórki zazwyczaj tworzą struktury lite, pęcherzykowe lub zrazikowe, a w utkaniu tego nowotworu widoczne są liczne naczynia włosowate [4]. Stopień złośliwości biologicznej raka jasnokomórkowego jest oceniany według klasyfikacji Fuhrman. W czterostopniowej skali (G1-G4) oceniane są takie cechy komórki nowotworowej jak wielkość jądra od 10 do powyżej 20µm, jego polimorfizm i wystąpienie płatowości jądra, a także obecność w nim jąderek, ich liczba i

wielkość [5]. RJN w porównaniu do innych typów raka nerki ma zdecydowanie zły przebieg i niepomyślne rokowanie [6]. Rak ten nacieka rozlegle okoliczne do nerki struktury, nacieka żyłę nerkową i szerząc się głównie drogą krwionośną, tworzy przerzuty odległe w płucach, wątrobie, kościach, tkankach miękkich i mózgu [7].

Wiedza dotycząca onkogenezy raka jasnokomórkowego nerki nie jest jeszcze pełna. Z tego względu postanowiłem zająć się w swoich badaniach analizą ekspresji niektórych genów supresorowych i onkogenów w materiale klinicznym RJN.



Ryc. 1. Rola białek PLAGL1 i EP300 w aktywacji proapoptycznego białka BAX [8,14-16]. Szczegółowy opis poniżej.

Na podstawie danych literaturowych założyłem, że gen *PLAGL1* (*pleiomorphic adenoma gene-like 1*) (*ZAC/LOT1*) może mieć związek z onkogenezą raka nerki. *PLAGL1* koduje białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych typu C2H2, które za pomocą 5,6 lub 7 palców cynkowych (zależnie od izoformy) wiąże się bezpośrednio z DNA, regulując jego aktywność transkrypcyjną [8]. *PLAGL1* wiąże się z DNA w miejscach występowania sekwencji nukleotydów GGGGGGCCCC [9]. Ponadto białko *PLAGL1* jako czynnik transkrypcyjny może bezpośrednio aktywować receptor jądrowy typu I, podobnie

jak to jest w mechanizmie działania hormonów steroidowych [10]. Podczas rozwoju embrionalnego człowieka białko PLAGL1 jest obecne w wielu narządach [8]. Wykazano, że myszy z wyciszonym genem *PLAGL1*^{-/-} wykazują zahamowanie rozwoju embrionalnego i zniekształcenia ciała wynikające z zaburzeń w procesie formowania kości [11]. Uważa się że *PLAGL1* jako gen supresorowy odgrywa rolę w regulacji wzrostu i różnicowania komórkowego poprzez wpływ na aktywację transkrypcji genów proapoptotycznych [12].

W mechanizmie działania PLAGL1 jest ważna jego interakcja z białkami grupy acetylotranferaz histonowych: CREB (*cAMP response element – binding protein*) lub EP300 (*histone acetyltransferase E1A binding protein p300*). Wiążąc się z nimi PLAGL1 może wzmacniać ich oddziaływanie jako koaktywatora receptora jądrowego lub może wzmacniać ich aktywność enzymatyczną typu acetylotranferazy histonowej [10, 13]. Ustalono, że EP300 jako czynnik transkrypcyjny odgrywa także istotną rolę w wielu procesach komórkowych, a także w procesach karcynogenezy [14]. W warunkach stresu komórkowego EP300 powoduje aktywację genu *TP53*. Co więcej PLAGL1 jest także koaktywatorem transkrypcji *TP53*, a następnie, wiążąc się z białkiem TP53 wzmacnia jego proapoptotyczną aktywność [15,16]. Wiadomo, że *TP53* jest zasadniczym genem supresorowym, którego mutacje obecne są w blisko połowie wszystkich nowotworów. Spadek lub zanik ekspresji *TP53* powoduje brak kaspazo-zależnej ścieżki apoptozy w zmienionych nowotworowo komórkach, co prowadzi do wzrostu guza i progresji nowotworu. W aktywacji apoptozy zasadnicze znaczenie ma białko BAX, które obecność powoduje uwolnienie cytochromu C z mitochondrium do cytoplazmy, co prowadzi do efektorowej, końcowej fazy apoptozy w wyniku aktywacji kaspaz [17,18].

Wyniki badań dotyczących ekspresji genu *PLAGL1* w przebiegu wielu nowotworów złośliwych wskazują na jego rolę jako genu supresorowego [19]. Spadek lub brak ekspresji tego genu stwierdzono zarówno w liniach komórkowych jak i w raku jajnika i raku piersi [20-22], a także w łagodnym nowotworze rdzenia nadnerczy, pheochromocytoma [23]. Spadek ekspresji genu *PLAGL1* może następować w wyniku utraty heterozygocności (LOH), co stwierdzono w części próbek tkankowych raka jajnika oraz w części guzów pheochromocytoma [21, 24].

Dotychczasowe badania wskazują na to, że zmiany ekspresji *PLAGL1* mogą mieć różny charakter, zależnie od typu nowotworu. W grupie 51 chorych na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi nie wykryto mutacji w genie *PLAGL1* [25], natomiast w raku podstawnkomórkowym stwierdzano wyraźny spadek ekspresji genu *PLAGL1* [26]. Z kolei w raku ślinianek [27] oraz w raku żołądka [28] nie stwierdzano istotnych zmian w

rearanżacjach genu *PLAGL1* zlokalizowanego na chromosomie 6 przy pomocy metody FISH. Mechanizmy epigenetyczne mogą wpływać na ekspresję genu *PLAGL1*, dlatego były one przedmiotem badań w liniach komórkowych oraz w pierwotnych guzach raka jajnika i raka piersi [29], gruczolakoraku żołądka [30], mięsakach tkanek miękkich [31] oraz w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B [32]. Wyniki tych badań wskazują na zróżnicowane zmiany w epigenetycznej kontroli genu *PLAGL1* w różnych nowotworach na poziomie metylacji jego promotora oraz deacylacji histonów [29-32]. Zastanawiające jest to, że nie była wykonana analiza ekspresji białka *PLAGL1* w różnych rodzajach nowotworów, przy pomocy metody immunohistochemicznej (IHC), która jest łatwo dostępna i użyteczna tak w badaniach diagnostycznych jak i w analizie czynników prognostycznych.

Na aktywność *PLAGL1* wpływają naskórkowy i transformujący czynnik wzrostu (EGF i β TGF), które poprzez szlak komórkowy MEK-ERK mogą znosić działanie *PLAGL1* jako czynnika supresorowego [33]. Szlak MEK-ERK odgrywa zasadniczą rolę w procesach proliferacji komórek i ma istotne znaczenie we wzroście grupy nowotworów określanych jako KRAS-zależnych [34]. Na mysim modelu gruczolakoraka trzustki wykazano, że przy wyhamowaniu szlaku MEK-ERK, wskutek zablokowania KRAS, dochodzi do funkcjonalnego zastąpienia aktywności tego szlaku poprzez zwiększoną ekspresję białka YAP1 (Yes-associated protein 1) i czynnika transkrypcyjnego TEAD2, co skutkuje aktywacją cyklu komórkowego i proliferacją komórek [35].

Z tego względu białko YAP1 pełniące rolę onkogenu stało się także przedmiotem moich badań w raku jasnokomórkowym nerki. W warunkach fizjologicznych YAP1 jest białkiem efektorowym szlaku Hippo, który podczas rozwoju embrionalnego ma fundamentalne znaczenie w regulacji wielkości narządów [36]. Białko YAP1 jest koaktywatorem transkrypcji szczególnego typu, ponieważ mimo braku domeny wiążącej się z DNA oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym TEAD (TEAD1-4) i w ten sposób uczestniczy w aktywacji promotorów wielu genów [37]. Taki funkcjonalny kompleks złożony z YAP1 i TEAD1-4 aktywuje ekspresję wielu genów związanych z proliferacją komórkową (np. *CTGF*, *Cyr61*, *Myc* i *Gli*) [38, 39].

Gen *YAP1* jest zlokalizowany na 11q22 chromosomie i ten *locus* jest amplifikowany w przebiegu wielu nowotworów [39]. Wzrost ekspresji tak genu jak i białka YAP1 zaobserwowano w niedrobnokomórkowym raku płuca, raku piersi, raku jelita grubego i pierwotnym raku wątroby [40] w tym także w przebiegu RJN [41]. Aktywność YAP1 jest uzależniona od translokacji tego białka z cytoplazmy do miejsca efektorowego czyli jądra komórki. Ten kluczowy moment dla transdukcji sygnału ścieżki Hippo jest regulowany

przez kinazę serynowo/threoninową 1 (LATS1) [42], która w warunkach fizjologicznych fosforyluje YAP1, co prowadzi do zatrzymania YAP1 w cytoplazmie poprzez jego związanie z białkiem 14-3-3 z następującą ubikwitynacją tego kompleksu i jego degradacją w proteasomach [39].

Jak dotychczas rola genu i białka PLAGL1 w raku nerki, a szczególnie w raku jasnokomórkowym nerki nie była dotąd przedmiotem badań. Stan taki stanowił punkt wyjścia do określenia, czy w RJN dochodzi do zmian ekspresji PLAGL1 na poziomie mRNA i białka oraz czy ewentualne zmiany mogą dostarczyć informacji o charakterze diagnostycznym lub prognostycznym. Za wyborem badania PLAGL1 w raku nerki przemawiało także to, że tak w okresie embrionalnym i po zakończonym wzroście człowieka w obrębie nerki utrzymuje się bardzo wysoka ekspresja *PLAGL1* mRNA w porównaniu do poziomu stwierdzanego w innych narządach [9]. Ze względu na możliwość istnienia powiązań między szlakami wewnątrzkomórkowymi, w których uczestniczą PLAGL1 i YAP1 oraz LATS1 postanowiono także określić ewentualne znaczenie prognostyczne ekspresji YAP1 i LATS1 na poziomie białka przy pomocy metody immunohistochemicznej.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/21/02/2018>
2. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC. European Association of Urology Guideline Group. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Europ Urol* 2010; 58: 398-405.
3. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016; 70(1):93-105.
4. Aaron M. Udager and Rohit Mehra. Morphologic, Molecular, and Taxonomic Evolution of Renal Cell Carcinoma: A Conceptual Perspective With Emphasis on Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: 2016, 140 (10), 1026-1037.
5. Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982; 6: 655-663,
6. Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Ishida M, Kuroda N, Nagashima Y, Katsube K ichi and Okada Y: Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view. *Pathol Int*. 2016; 66: 481-490.
7. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2003; 4(5):385-90.

8. Abdollahi A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. *J Cell Physiol.* 2007; 210(1):16-25.
9. Varrault A, Ciani E, Apiou F et al. hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 8835–8840.
10. Huang SM, Stallcup MR. Mouse Zac1, a transcriptional coactivator and repressor for nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 2000;20(5):1855-67.
11. Varrault A, Gueydan C, Delalbre A, Bellmann A, Houssami S, Aknin C, Severac D, Chotard L, Kahli M, Le Digarcher A, Pavlidis P, Journot L. Zac 1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell.* 2006;11(5):711-22.
12. Valente T, Auladell C. Expression pattern of Zac1 mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development. *Mech Dev.* 2001;108(1-2): 2017-11.
13. Hoffmann A, Barz T, Spengler D. Multitasking C2H2 zinc fingers link Zac DNA binding to coordinated regulation of p300-histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(14): 5544-57.
14. Attar N, Kurdistani SK. Exploitation of EP300 and CREBBP Lysine Acetyltransferases by Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3).
15. Huang SM, Schönthal AH, Stallcup MR. Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene.* 2001; 20(17): 2134-43.
16. Grossman SR. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem.* 2001; 268(10): 2773-8.
17. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 978312.
18. van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* 2006; 16(2): 203-13.
19. Vega-Benedetti AF, Saucedo C, Zavattari P, Vanni R, Zugaza JL, Parada LA. PLAGL1: an important player in diverse pathological processes. *J Appl Genet.* 2017; 58(1): 71-78.
20. Abdollahi A, Roberts D, Godwin AK, Schultz DC, Sonoda G, Testa JR, Hamilton TC. Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene.* 1997; 14(16): 1973-9.
21. Cvetkovic D, Pisarcik D, Lee C, Hamilton TC, Abdollahi A. Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; 95(3): 449-55.
22. Bilanges B, Varrault A, Basyuk E, Rodriguez C, Mazumdar A, Pantaloni C, Bockaert J, Theillet C, Spengler D, Journot L. Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene.* 1999;18(27): 3979-88.
23. Jarmalaite S, Laurinaviciene A, Tverkuviene J, Kalinauskaite N, Petroska D, Böhling T, Husgafvel-Pursiainen K. Tumor suppressor gene ZAC/PLAGL1: altered expression and loss of the nonimprinted allele in pheochromocytomas. *Cancer Genet.* 2011; 204(7): 398-404.
24. Lemeta S, Salmenkivi K, Pylkkänen L, Sainio M, Saarikoski ST, Arola J, Heikkilä P, Haglund C, Husgafvel-Pursiainen K, Böhling T. Frequent loss of heterozygosity at 6q in pheochromocytoma. *Hum Pathol.* 2006; 37(6): 749-54.

25. Koy S, Hauses M, Appelt H, Friedrich K, Schackert HK, Eckelt U. Loss of expression of ZAC/LOT1 in squamous cell carcinomas of head and neck. *Head Neck*. 2004; 26(4): 338-44.
26. Basyuk E, Coulon V, Le Digarcher A, Coisy-Quivy M, Moles JP, Gandarillas A, Journot L. The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas. *Mol Cancer Res*. 2005; 3(9): 483-92.
27. Enlund F, Persson F, Stenman G. Molecular analyses of the candidate tumor suppressor gene, PLAGL1, in benign and malignant salivary gland tumors. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(6): 545-7.
28. Zhu XY, Yang JY, He Y, Liu GH, Sun Y, Ding Y. Correlation between gastric carcinoma and ZAC gene-associated microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Oncol Lett*. 2017; 14(2): 2422-2426.
29. Abdollahi A, Pisarcik D, Roberts D, Weinstein J. LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J Biol Chem*. 2003; 278(8): 6041-9.
30. Li Z, Ding Y, Zhu Y, Yin M, Le X, Wang L, Yang Y, Zhang Q. Both gene deletion and promoter hyper-methylation contribute to the down-regulation of ZAC/PLAGL1 gene in gastric adenocarcinomas: a case control study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014; 38(6): 744-50.
31. Peille AL, Brouste V, Kauffmann A, Lagarde P, Le Morvan V, Coindre JM, Chibon F, Bresson-Bepoldin L. Prognostic value of PLAGL1-specific CpG site methylation in soft-tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013; 8(11), doi: 10.1371/journal.pone.0080741.
32. Valleley EM, Cordery SF, Carr IM, MacLennan KA and Bonthron DT: Loss of expression of ZAC/PLAGL1 in diffuse large B-cell lymphoma is independent of promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49: 480-486,
33. Abdollahi A, Bao R, Hamilton TC. LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene*. 1999;18(47): 6477-87.
34. Kawada K, Toda K, Sakai Y. Targeting metabolic reprogramming in KRAS-driven cancers. *Int J Clin Oncol*. 2017; 22(4): 651-659.
35. Kapoor A, Yao W, Ying H, Hua S, Liewen A, Wang Q, Zhong Y, Wu CJ, Sadanandam A, Hu B, Chang Q, Chu GC, Al-Khalil R, Jiang S, Xia H, Fletcher-Sananikone E, Lim C, Horwitz GI, Viale A, Pettazzoni P, Sanchez N, Wang H, Protopopov A, Zhang J, Heffernan T, Johnson RL, Chin L, Wang YA, Draetta G, DePinho RA. Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell*. 2014;158(1):185-197.
36. Meng Z, Moroishi T and Guan K.L. Mechanisms of Hippo pathway regulation, *Genes Dev*. 2016; 30(1): 1-17.
37. Wierzbicki P.M. and Rybarczyk A. The Hippo pathway in colorectal cancer, *Folia Histochem Cytochem*. 2015; 53 (2): 109-119.
38. Zhu C, Lil L and Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator, *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015; 47 (1): 16-28.
39. Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H, Guan K.L. and Xu Y. Structural insights into the YAP and TEAD complex, *Genes Dev*. 2010; 24 (3): 235-40.

40. Zanconato F, Cordenonsi M and Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer, *Cancer Cell*. 2016; 29 (6): 783-803.
41. Rybarczyk A., Klacz J., Wronska A., Matuszewski M., Kmiec Z. and Wierzbicki P.M., Overexpression of the YAP1, oncogene in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor outcome, *Oncol Rep*. 2017. 38 (1): 427-439.
42. Visser S and Yang X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis, *Cell Cycle*. 2010; 9 (19): 3892-903.

OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

W zbiorze czterech prac przedstawionych jako „osiągnięcie naukowe” skupiono się na odpowiedzi na następujące problemy i zagadnienia:

- opisanie lokalizacji białka *PLAGL1* w niezmienionych makroskopowo strukturach ludzkiej nerki uzyskanych w wyniku przeprowadzonej amputacji nerki u chorych na raka tego narządu.
- określenie ekspresji genu *PLAGL1*, *EP300*, *TP53* oraz *BAX* na poziomie mRNA i białka w tkankach RJN i w odniesieniu do niezmienionej części nerki.
- określenie immunoreaktywności białek *LATS1* i *YAP1* w tkankach RJN i w niezmienionej morfologicznie części nerki.
- ocena zależności między cechami kliniczno-patologicznymi chorych na RJN a poziomem ekspresji badanych genów i białek.
- ocena zależności między przebiegiem choroby a poziomem analizowanych czynników molekularnych.

Wyniki badań przedstawionych w prezentowanym „osiągnięciu naukowym” wskazują na to, że wzrost ekspresji *PLAGL1* ma istotne znaczenie prognostyczne w raku jasnokomórkowym nerki. Wykazano też, że cytoplazmatyczna ekspresja białka *YAP1* powiązana jest z gorszym rokowaniem chorych na raka jasnokomórkowego nerki.

Poniżej przedstawiono szczegółowy opis czterech prac wchodzących w cykl artykułów stanowiących „osiągnięcie naukowe”.

Publikacje 1-3 stanowią realizację uzyskanego przeze mnie grantu Narodowego Centrum Nauki (NN 402 452 839) pt. „Analiza ekspresji genu *PLAGL1* jako markera molekularnego raka nerki oraz regulatora ekspresji acetylotransferaz histonowych (p300/CBP, PCAF) i białek szlaku apoptozy (p53 oraz Bax)”. Badania przedstawione w publikacji nr 4 zostały wykonane w ramach grantu statutowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

PUBLIKACJA 1

Godlewski J, Krazinski B.E, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sulik M, Tenderenda M, Biernat W, Kmiec Z. *PLAGL1 protein is differentially expressed in the nephron segments and collecting ducts in human kidney*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2015; 53(1): 96–104.

IF: 1,060; Punktacja MNiSW: 15.

Cel naukowy pracy

Stwierdzenie lokalizacji białka PLAGL1 w obrębie poszczególnych struktur morfologicznie niezmiętej nerki człowieka jako wstęp do dalszych badań opartych na porównaniu ekspresji genu i białka PLAGL1 w tkance guza RJN. Zestawienie uzyskanych danych z wynikami *in silico* pozyskanymi z baz danych w celu określenia prawdopodobnej roli PLAGL1 w funkcji ludzkiej nerki.

Syntetyczne omówienie wyników

Przy pomocy metody immunohistochemicznej przeprowadzono analizę materiału tkankowego niezmiętej morfologicznie części nerek, które jako materiał pooperacyjny pochodziły od chorych leczonych z powodu raka jasnokomórkowego nerki. Materiał pochodził od grupy 39 chorych i był pozyskany w ramach realizowanego projektu NCN (NN 402 452 839) dotyczącego analizy ekspresji PLAGL1 w raku jasnokomórkowym nerki. Analizowano immunoreaktywność białka PLAGL1 w obrębie kłębuszków nerkowych, poszczególnych części nefronu i w kanalikach zbiorczych. Wykazano silną reakcję świadczącą o obecności PLAGL1 w obrębie komórek nabłonkowych kanalików krętych II rzędu i kanalików zbiorczych (intensywność barwienia $45.4 \pm 3.9\%$ i $48.7 \pm 1.8\%$, średnia \pm SD). Immunoreaktywność PLAGL1 była znacząco silniejsza niż komórek nabłonkowych kanalików I rzędu i kłębuszka nerkowego ($21.8 \pm 3.1\%$ i $13.6 \pm 2.3\%$). W przeprowadzonej analizie statystycznej nie znaleziono korelacji pomiędzy ekspresją w kierunku PLAGL1, a danymi demograficznymi. Założono, że różnice w ekspresji białka PLAGL1 w obrębie kanalików wynikają z różnego działania tego białka, w obrębie zróżnicowanych funkcjonalnie komórek nabłonkowych poszczególnych kanalików nerki. Jak wynika z danych literaturowych dotychczas wyższą ekspresję *PLAGL1* mRNA stwierdzano w narządach, których funkcja jest regulowana przez hormony steroidowe. Co więcej, w danych The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000151623-NR3C2/tissue/kidney>) prezentowane są barwienia receptora mineralokortykoidów (NR3C2) w których wykazano podobne, silniejsze wybarwienie kanalików dalszych nerki, tak jak to

otrzymaliśmy w wyniku naszych barwień. Powyższy wynik sugeruje potencjalną rolę PLAGL1 jako czynnika modyfikującego działanie składowych Na^+/K^+ -ATPase i aldosteronu w obrębie nerki.

W celu szerszej analizy przeprowadzono analizę *in silico* dostępnych baz danych dotyczącą możliwych funkcji białka PLAGL1 w regulacji czynności kanalików nerki. Przeszukano konserwatywną sekwencję nukleotydów odpowiadającą miejscu wiązania PLAGL1 i wytypowano wstępnie 1054 transkryptów należących do 478 genów. Przeanalizowano związek pomiędzy genami docelowym PLAGL1 a szlakami związanymi z fizjologią nerki: transport błonowy, procesy metaboliczne, szlaki sygnałowe i organogeneza i wytypowano 67 transkryptów 43 genów. Ustalono, że najbardziej prawdopodobnym jest regulacja przez PLAGL1 genów uczestniczących w przemianie metabolicznej fosforanu inozytolu, regulowanej hormonalnie reabsorpcji jonu wapnia i ścieżce sygnałowej jonów wapnia.

Podsumowując, w pracy nr 1 po raz pierwszy w piśmiennictwie stwierdzono większą immunoreaktywność PLAGL1 w obrębie kanalików krętych II rzędu i kanalików zbiorczych, co może mieć związek z regulacją przez ten czynnik transkrypcyjny procesów fizjologicznych zachodzących w obrębie tych struktur nerki.

PUBLIKACJA 2

Godlewski J, Krazinski BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sliwinska-Jewsiewicka A, Maslowski Z, Kmiec Z. *PLAGL1 (ZAC1/LOT1) Expression in clear cell renal cell carcinoma: correlations with disease progression and unfavorable prognosis. Anticancer Research.* 2016; 36(2):617-24.

IF: 1,937; Punktacja MNiSW: 20.

Cel naukowy

Porównanie ekspresji PLAGL1 na poziomie genu i białka w tkankach raka jasnokomórkowego nerki z kontrolą, którą stanowił fragment niezmiennej morfologicznie nerki. Odniesienie tego wyniku do danych kliniczno-patologicznych i przebiegu choroby celem określenia roli PLAGL1 jako markera molekularnego RJN.

Syntetyczne omówienie uzyskanych wyników

Badanie zostało przeprowadzone na materiale pooperacyjnym, który pochodził z wyciętych nerek, w grupie 40 chorych operowanych z powodu RJN. Do badania włączono sparowany materiał tkankowy: wyłącznie rak jasnokomórkowy nerki i odpowiednio fragment niezmienny nerki, jako kontrola. Materiał pobierano w latach 2010-12, a w celu określenia korelacji ekspresji genów i białka *PLAGL1* do przeżycia odległego, grupę badaną objęto obserwacją trwającą do roku 2015. Mediana obserwacji to 37.1 miesiący, w jej trakcie 37.5% chorych zmarło. Materiał analizowano przy pomocy następujących metod: reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR), Western blot (WB) oraz barwieniem immunohistochemicznym. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych i całkowitego czasu przeżycia chorych.

Ustalono, że średnia względna ekspresja genu *PLAGL1* była znacząco wyższa w tkankach raka nerki w porównaniu do tkanek niezmiennych (1.67 ± 0.20 vs. 1.00 ± 0.10 , $p=0.0002$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy tymi danymi a danymi kliniczno-patomorfologicznymi.

W przeprowadzonym barwieniu IHC porównano wybarwienie skrawków raka jasnokomórkowego nerki (RJN) z kanalikami bliższymi nefronu (miejsce pochodzenia tego nowotworu). Średnia intensywność immunoreaktywności *PLAGL1* była znacząco silniejsza w komórkach RJN w porównaniu do komórek nabłonka kanalików bliższych (2.89 ± 0.15 vs. 1.79 ± 0.18 , $p < 0.0001$). Natomiast analiza poziomu białka *PLAGL1* metodą WB w sparowanych próbkach tkankowych wykazała, że średni poziom białka jest podobny w poszczególnych parach ($p=0.4030$). Głębsza analiza materiału klinicznego pozwoliła na wykazanie, że występuje korelację pomiędzy poziomem białka *PLAGL1* a obecnością przerzutów odległych ($p=0.0471$). Stwierdzono prawie 3-krotnie większy średni poziom *PLAGL1* w guzach, które przerzutowały do innych narządów w porównaniu do grupy M0 (2.79 ± 0.74 vs. 1.06 ± 0.17 , odpowiednio; $p=0.0105$). Poziom *PLAGL1* w homogenatach tkankowych raka nerki korelował z krótszym czasem przeżycia chorych ($p=0.0319$). Zaobserwowano także, że ryzyko zgonu w grupie chorych z wysokim poziomem białka *PLAGL1* ocenianym metodą WB było 3 razy wyższe ($HR=3.58$, $p=0.0304$) w porównaniu do grupy z niskim poziomem tego białka.

Podsumowując, zestawienie różnych metod badawczych pozwoliło na stwierdzenie w pracy nr 2, że gen *PLAGL1* może odgrywać rolę jako czynnik promujący rozwój RJN, ponieważ wyższa ekspresja *PLAGL1* na poziomie białka w tkankach RJN korelowała z obecnością przerzutów i krótszym czasem przeżyciem chorych.

PUBLIKACJA NR 3

Godlewski J, Kraziński BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kieżun J, Kwiatkowski P, Sliwiska-Jewsiewicka A, Wierzbicki PW, Kmiec Z. Expression and prognostic significance of EP300, TP 53 and BAX in clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Research*. 2017; 37 (6): 2927-2937.

IF: 1,937; Punktacja MNiSW: 20.

Cel naukowy

Analiza poziomu ekspresji genów *EP300 TP53 i BAX* i kodowanych przez nie białek w celu ustalenia ich znaczenia w raku jasnokomórkowym nerki i zbadania korelacji tych czynników molekularnych z danymi kliniczno-patologicznymi i przeżyciem chorych.

Syntetyczne omówienie wyników

Badaniu poddano grupę 31 chorych (materiał tkankowy i dane kliniczne) z puli analizowanych w poprzednio omówionej pracy dotyczącej ekspresji PLAG1 w RJN. Materiał analizowano na poziomie ekspresji genów przy pomocy reakcji qPCR i na poziomie ekspresji białek przy pomocy metody immunohistochemicznej. Materiał pobierano w latach 2010-12, a mediana czasu obserwacji chorych wyniosła 37 miesięcy. Otrzymane dane analizowano statystycznie porównując sparowany materiał tkankowy: wycinki raka jasnokomórkowego nerki z fragmentem morfologicznie niezmięnionej nerki, ponadto odniesiono uzyskany wynik do danych kliniczno-patologicznych i całkowitego czasu przeżycia chorych.

Wykazano, że średnia ekspresja genu *EP300* była istotnie wyższa w tkankach RJN w odniesieniu do materiału kontrolnego (1.61 ± 0.18 vs. 1.00 ± 0.12 , $p < 0.0001$), ponadto względny poziom *EP300* mRNA był wyższy w 25/31 i niższy niż w materiale kontrolnym w 6/31 analizowanych próbkach tkanki nowotworowej. Immunoreaktywność białka EP300 oceniana metodą Remmele i Sternberga była podobna w tkance RJN i w komórkach nabłonkowych kanalików bliższych nerki niezmięnionej (1.81 ± 0.20 vs. 1.32 ± 0.20 , $p = 0.1073$). Nie obserwowano zależności pomiędzy zmianami ekspresji EP300 a danymi demograficznymi i klinicznymi chorych.

Średnia ekspresja genu *TP53* na poziomie mRNA była istotnie wyższa w tkankach RJN w odniesieniu do materiału kontrolnego (1.91 ± 0.15 vs. 1.00 ± 0.07 ; $p < 0.0001$), przy czym podwyższony poziom mRNA stwierdzono u 27/31 chorych. Średni poziom immunoreaktywności białka TP53 wybarwionego metodą IHC był znacznie wyższy w komórkach RJN niż w komórkach nabłonka kanalików bliższych (0.81 ± 0.22 vs. 0.03 ± 0.03 ,

$p=0.0020$). Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy wielkością guza pierwotnego nerki ($r=0.3807$; $p=0.0346$) a intensywnością wybarwienia białka TP53. Wyniki te potwierdziły dotychczasowe obserwacje innych autorów uzyskane przy pomocy techniki qPCR lub immunohistochemicznej, gdzie w raku nerki była analizowana wartość prognostyczna TP53.

Ekspresja genu *BAX* na poziomie mRNA była znamienne wyższa w tkance RJN niż w sparowanych tkankach niezmiętej nerki (1.78 ± 0.17 vs. 1.00 ± 0.07 , $p<0.0001$), przy czym wzrost ekspresji wystąpił u 26/31 chorych. Natomiast barwienie BAX metodą IHC wykazało podobną intensywność reakcji barwnej w RJN i w nerce niezmiętej (2.45 ± 0.13 vs. 2.21 ± 0.14 , $p=0.1210$). Zaobserwowano jednak ujemną korelację pomiędzy immunoreaktywnością białka BAX a wielkością guza pierwotnego ($r=-0.3787$; $p=0.0356$). Ponadto stwierdzono obniżoną immunoreaktywność BAX u chorych z przerzutami (M1) względem chorych (M0) z nowotworem ograniczonym do nerki (2.13 ± 0.19 vs. 2.69 ± 0.12 , $p=0.0295$).

Wyniki dotyczące ekspresji EP300, TP53 i BAX odniesiono do wcześniej uzyskanych danych z analiz ekspresji *PLAGL1* w tej samej grupie chorych RJN. Zaobserwowano korelację między względną immunoreaktywnością białka EP300 a immunoreaktywnością białka *PLAGL1* ($r=0.5488$; $p=0.0014$) oraz z ekspresją genu *TP53* ($r=0.4097$; $p=0.0221$) i genu *PLAGL1* ($r=0.3975$; $p=0.0268$) na poziomie mRNA.

Analiza statystyczna nie wykazała korelacji pomiędzy ekspresją genów i białek EP300, TP53 i BAX z czasem przeżycia chorych. Wydaje się, że analizowana grupa chorych była reprezentatywna, ponieważ zaobserwowano korelację pomiędzy czasem przeżycia chorych na RJN, a powszechnie znanymi cechami tego nowotworu wpływającymi na gorsze przeżycie chorych takimi jak wyższy stopień Fuhrman ($HR=3.76$, $p=0.0098$) i obecność przerzutów odległych ($HR=3.31$, $p=0.0331$).

Podsumowując, w pracy nr 3 po raz pierwszy wykazano wyższą ekspresję EP300 tak na poziomie genu jak i białka w tkance RJN, co może wskazywać na rolę EP300 w rozwoju tego nowotworu. Uzyskane dane potwierdzają obserwacje innych autorów wskazujące na to, że białka TP53 i BAX, które odgrywają istotną rolę w procesach apoptozy, mogą nie mieć znaczenia w rozwoju i progresji RJN.

PUBLIKACJA NR 4

Godlewski J, Kieżun J, Kraziński BE, Kozielec Z, Wierzbicki PM, Kmieć Z. The presence of YAP1 and LATS1 proteins in the clear cell renal cell carcinoma - an impact to the patients' survival. *BioMed International Journal*, 2018 Apr 3;2018:2653623. doi: 10.1155/2018/2653623. eCollection 2018.

IF: 2,476; Punktacja MNiSW: 25.

Cel naukowy

Celem badań było ustalenie lokalizacji i oznaczenie poziomu ekspresji białek LATS1 i YAP1 w obrębie komórki RJN i ustalenie korelacji w odniesieniu do danych klinicznych i obserwacji przeżycia chorych.

Syntetyczne omówienie wyników

Analizie poddano sparowane próbki tkanki raka jasnokomórkowego nerki i fragmentów nerki niezmienionej morfologicznie, pochodzące z materiału pooperacyjnego wyciętych nerek w grupie 54 chorych. Zebrano dane kliniczne i patomorfologiczne, a czas obserwacji odległej wynosił 41 miesięcy.

Wykonane barwienie immunohistochemiczne wykazało zróżnicowaną lokalizację białka YAP1 tkance raka i w nerce niezmienionej. W komórkach raka obecność YAP1 zaobserwowano głównie w obrębie jądra oraz, u części chorych, także w cytoplazmie, natomiast w komórkach nabłonka kanalików bliższych białko YAP1 obecne było wyłącznie w obrębie cytoplazmy. W jądrze komórkowym u 65% chorych na RJN zaobserwowaną silną immunoekspresję YAP1, zaś u 35% pacjentów słabą lub jej brak. Zaskakującą obserwację stanowiło wykazanie „niekanonicznej” obecności białka YAP1 w cytoplazmie komórek nowotworowych (a także w jądrze komórkowym) u 24% chorych na RJN. Z kolei immunoreaktywność białka LATS1 w cytoplazmie komórek nabłonka kanalików bliższych była wyraźnie wyższa ($p < 0.001$) niż w cytoplazmie komórek RJN, w których była znacznie zróżnicowana, od słabej w 40.7% przypadków do umiarkowanej i silnej w 59.3%. Wykazano ujemną korelację między immunoreaktywnością białka LATS1 a rozmiarem guza pierwotnego ($r = -0,39$, $p = 0,0035$). Natomiast obecność YAP1 nie korelowała z danymi kliniczno-patologicznymi w badanej grupie chorych na RJN. Zastanawiające było to, że w podgrupie chorych na RJN, w której obserwowano cytoplazmatyczną (i jądrową) obecność YAP1 stwierdzono znacząco krótsze przeżycie całkowite (mediana = 24.3 miesięcy) w porównaniu do grupy chorych z wyłącznie jądrową lokalizacją YAP1 (mediana nieoznaczalna). Analiza wieloczynnikowa metodą

Coxa wykazała, że obecność YAP1 w cytoplazmie (HR = 4.53) i obniżona immunoreaktywność LATS1 są powiązane ze znacząco gorszym rokowaniem, co może posiadać znaczenie prognostyczne w przebiegu raka jasnokomórkowego nerki.

Podsumowując, w pracy nr 4 po raz pierwszy wykazano obecność białka LATS1 w komórkach RJN. Obniżona ekspresja LATS1, a także cytoplazmatyczna obecność białka YAP1 chorych na RJN korelowały z gorszym rokowaniem. Obserwacje te wskazują na możliwość wykorzystanie immunohistochemicznej analizy ekspresji tych białek w komórkach raka jasnokomórkowego nerki w celu przewidywania przebiegu choroby.

PODSUMOWANIE

Wyniki badań przeprowadzonych w czterech omówionych pracach dostarczyły nowych oryginalnych danych dotyczących ekspresji genów i białek PLAGL1, EP300, TP53 i BAX w przebiegu raka jasnokomórkowego nerki. Na podstawie analizy danych klinicznych i okresu przeżycia dowiedziono, że podwyższona ekspresja PLAGL1 może mieć znaczenie prognostyczne u chorych na raka jasnokomórkowego nerki, ponieważ koreluje z obecnością przerzutów odległych i krótszym czasem przeżycia chorych. Analiza ekspresji genów i białek TP53 i BAX w raku jasnokomórkowym nerki nie dostarczyła jednoznacznych wyników. Wydaje się to wskazywać, że aktywowanie ścieżki apoptozy nie jest zasadniczym czynnikiem w rozwoju raka jasnokomórkowego nerki. Zmniejszona ekspresja LATS1 w obrębie cytoplazmy i zwiększona ekspresja YAP1 w obrębie jądra komórek nowotworowych wskazuje na to, że zahamowanie szlaku Hippo (zniesienie kontroli proliferacji) może odgrywać istotną rolę w rozwoju raka jasnokomórkowego nerki. Ponadto, wykazano że obecność YAP1 w cytoplazmie i spadek immunoreaktywności LATS1 mogą mieć znaczenie prognostyczne.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

W 2002 roku rozpocząłem pracę w nowo tworzonego Warmińsko-Mazurskiego Centrum Onkologii (W-M CO) w Olsztynie. Pracując na co dzień z chorymi, zainteresowałem się możliwościami wczesnego wykrycia wzrostu nowotworu w obrębie ściany przewodu pokarmowego. W obszarze moich zainteresowań badawczych znalazł się jelitowy układ nerwowy (ENS, *enteric nervous system*) i jego morfologiczne i czynnościowe zmiany w sąsiedztwie nacieku raka jelita grubego (RJG). Mając sprecyzowane cele naukowe w poszukiwaniach warsztatu badawczego w roku 2004 nawiązałem współpracę z prof. dr hab. Ireneuszem Mirosławem Łakomym, kierownikiem Katedry Anatomii Zwierząt Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UW-M) w Olsztynie. Za pomocą techniki barwień immunofluorescencyjnych analizowałem zmiany w obrębie splotozwojów położonych w pobliżu nacieku raka. Najważniejszymi wnioskami tej pracy było to, że nacieki raka dochodząc do splotozwojów, powoduje stopniową dekompozycję i zanik całych splotozwojów ściany jelita grubego. Analizując obecność neuronów z poszczególnymi neuropeptydami zaobserwowałem, że stopniowy zanik składowych unerwienia jelita grubego przebiegał w sposób zróżnicowany. Stwierdziłem, że w obrębie pośluzówkowych i mięśniówkowych splotozwojów znajdujących się w pobliżu raka, następuje istotnie zmniejszenie liczby neuronów zawierających neuropeptydy NPY i CGRP, a liczba neuronów zawierających VIP, PACAP, SP i SOM utrzymuje się niezmienną w porównaniu do odcinka kontrolnego (zdrowego) jelita. Ponadto stwierdziłem w obrębie mięśniówkowych splotozwojów istotny wzrost liczby neuronów zawierających galaninę (GAL). Efektem tych badań była rozprawa doktorska p.t. *„Immunohistochemiczna charakterystyka neuronów zwojów śródściennych jelita grubego u chorych na raka esicy i odbytnicy”* (promotor: prof. dr hab. I.M. Łakomy), którą obroniłem w 2007 roku na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Gdańsku. Wyniki badań zawartych w rozprawie doktorskiej przedstawiłem jako ustne doniesienia zjazdowe i następnie opublikowałem w formie cyklu pięciu artykułów w anglojęzycznych czasopismach naukowych z tzw. listy filadelfijskiej o łącznym IF – 4,773 i punktacji KBN/MNiSW 74 (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 17, 20-23).

Cykl powyższych publikacji nie zamknął moich poszukiwań badawczych w tym obszarze, ponieważ kontynuowałem je od roku 2008 w nowo powstałej Katedrze Histologii i Embriologii Człowieka na Wydziale Nauk Medycznych UW-M w Olsztynie (kierownik: prof. dr hab. Zbigniew Kmiec). Przeniosłem do zespołu wcześniejsze moje spostrzeżenia

dotyczące wzrostu obecności GAL w obrębie neuronów zanikowych splotozwojów ENS, a także wzrostu zawartości GAL w tkankach raka, które stwierdziłem w materiale pochodzącym od części chorych. Był to punkt wyjścia do badań polegających na analizie GAL jako substancji markerowej rozwoju RJG. Przy użyciu metody immunoenzymatycznej (ELISA) wykonano pomiar stężenia GAL w surowicy krwi chorych na RJG. Wynik tej analizy wykazał ponad dwukrotnie wyższe stężenie GAL w surowicy chorych niż w surowicy osób zdrowych. Ponadto pomiar stężenia GAL w homogenatach poszczególnych warstw ściany jelita grubego pozwolił stwierdzić, że najwyższe stężenie GAL obserwowano w homogenatach z tkanek nowotworu. Wyniki te zostały opublikowane (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 8).

Badania związane z zmianami zanikowymi w obrębie ENS na pograniczu nacieku raka jelita grubego kontynuowałem we współpracy z zespołem Katedry Fizjologii Człowieka WL UWM, prof. M. Majewski, dr A. Kozłowska i dr A. Oponowicz. Zrealizowaliśmy badanie dotyczące stwierdzenia charakteru tych zmian, w którym zróżnicowano apoptozę *versus* zmiany zapalno-martwicze. Wykonane barwienia immunofluorescencyjne wykazały dużą obecność neuronów z kaspazą 8 co wskazywało na silną aktywację zewnątrzpo pochodnego szlaku apoptozy, w porównaniu do mniejszego odsetka perykarionów z kaspazą 3 – wykonawczą, co może świadczyć o wyciszaniu zaktywowanego uprzednio procesu apoptozy. Stwierdzono też prawie wyłączną kolokalizację GAL i kaspazy 3 w neuronach co może przemawiać za neuroprotekcijną rolą GAL w hamowaniu kaskady apoptotycznej. Wykluczono proces martwiczo-zapalny jako przyczynę zaniku splotozwojów ponieważ wykonane barwienia immunohistochemiczne z markerami makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych nie wykazały gromadzenia się tych komórek wokół neuronów śródściennych jelita. Wyniki powyższych badań stały się w 2016 r. podstawą rozprawy doktorskiej lek. P. Kwiatkowskiego „*Występowanie i zawartość galaniny w tkance guza, ścianie jelita grubego i surowicy krwi chorych chorych na raka jelita grubego: badania biochemiczne, morfologiczne i morfometryczne*”. Promotorem pracy był prof. dr hab. Z. Kmieć, a ja byłem promotorem pomocniczym.

Kontynuację tych badań stanowiła praca opublikowana w 2018 r. w której przedstawiono zmiany w ekspresji neuropeptydu CART w splotach mięśniówkowych (Auerbacha) w pobliżu nacieku raka jelita grubego (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 1).

Powyżej przedstawiony problem badawczy dotyczący zmian w ENS w pobliżu nacieku RJG uzupełnia analiza morfologiczna neuronów wykonana przy użyciu techniki mikroskopii elektronicznej we współpracy z Katedrą i Zakładem Histologii Gdańskiego Uniwersytetu

Medycznego. Obserwacja ultrastruktury neuronów śródściennych pozwoliła stwierdzić pojedyncze perykariony z morfologicznymi cechami apoptozy (pozycja 5).

Moje prace dotyczące zmian w jelitowym układzie nerwowym w pobliżu nacieku raka jelita grubego były cytowane w 39 pracach (wg bazy Web of Science Core Collection) dotyczących tej problematyki. Na początku roku 2018 wykonałem recenzję rozprawy doktorskiej Suh Youn Ko, z Uniwersytetu Victoria w Melbourne, Australia zatytułowaną „*Effect of Netrin-1 on the mature enteric nervous system and colorectal cancer*”. W tej pracy, w oparciu o szereg wykonanych badań doktorantka broniła cztery rozbudowane tezy dotyczące interakcji pomiędzy neuronami jelitowego układu nerwowego a komórkami raka jelita grubego i roli netryny 1 w tych procesach. Promotor, profesor Kulmira Nurgali z Enteric Neuropathy Laboratory, College of Health and Biomedicine, Melbourne, zaprosiła mnie do dalszej współpracy w zakresie tej tematyki badań.

Potencjał naukowy KHiEC stworzony przez prof. dr hab. Z. Kmiecia oparty o zespół pracowników i warsztat badawczy owocuje w postaci wykonanych i realizowanych badań w ramach projektów NCN i statutowych UWM w Olsztynie. Wiodącym problemem badawczym jest analiza ekspresji genów i białek w raku nerki i raku jelita grubego i odniesienie tych danych molekularnych do danych klinicznych z przebiegiem choroby i odległą obserwacją włącznie. W tych pracach brałem aktywny udział, który polegał na pobieraniu i gromadzeniu pooperacyjnego materiału tkankowego/ surowic chorych, gromadzeniu danych klinicznych i danych follow-up, przygotowywaniu danych do analizy statystycznej, analizie części barwień immunohistochemicznych i wykonywaniu dokumentacji zdjęciowej. Efektem tych badań są publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych prace (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 3,4,7,10,11, łączny IF = 12,435 oraz 120 punktów MNiSW).

Aktywnie współpracuję z zespołem Katedry Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w zakresie prowadzonych w tamtym ośrodku badań. Dotyczą one zmian ekspresji genów *TLR-5* i *FHIT* w chorobach zapaleń nieswoistych jelit a także genów *FHIT*, *LATS1* i *p73* w raku jelita grubego. Mój udział w tych pracach polegał na gromadzeniu i dostarczeniu materiału badawczego od chorych, a także przeprowadzenia analizy danych klinicznych. Ta współpraca zaowocowała czterema publikacjami (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 6,14,26-28).

Aspekty dotyczące wzrostu i przerzutowania komórek nowotworowych, a także rola profilowania genowego w raku jelita grubego były tematem trzech prac poglądowych, które

powstały w latach 2008, 2009 i 2012 (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 18,33,34) a których byłem współautorem.

Opanowane przeze mnie wcześniej techniki badawcze w zakresie immunodetekcji neuropeptydów w komórkach nerwowych wykorzystałem w analizie porównującej ultrastrukturę raka Merkla i z jego metachronicznym przerzutem. W pracy tej wykazałem, że komórki raka Merkla wykazywały immunoreaktywność w kierunku szeregu neuropeptydów: GAL, VIP, PACAP, NPY i CGRP. Ponadto zaobserwowałem zmianę morfologii komórek nowotworowych zawierających te neuropeptydy, z dużych i wielobiegunowych w guzie pierwotnym, na komórki mniejsze i owalne z wyraźnym zwiększeniem ich liczby w guzie przerzutowym. Obserwacje te zostały opublikowane w 2015 r. (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 13).

Równolegle z wyżej przedstawionymi badaniami naukowymi prowadziłem analizy dotyczące chorych operowanych z powodu nowotworów na oddziale chirurgii onkologicznej Warmińsko-Mazurskiego Centrum Onkologii (W-M CO). W 2008 opublikowałem użyteczną analizę kliniczną, która dotyczyła wprowadzanej do praktyki klinicznej procedury węzła wartownika w leczeniu raka piersi. Wynik tej pracy przekonywał do rutynowego stosowania tej metody ze znamieną korzyścią dla operowanych kobiet. Obecnie jest to rutynowo stosowana procedura która umożliwiła odejście od limfadenektomii pachowej, dotychczas wykonywanej w leczeniu raka piersi (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 35).

Ponadto w roku 2009 byłem współautorem doniesienia naukowego przedstawiającego nową metodę nieanatomicznej resekcji części wątroby lub nerki sposobem Habiba. We wstępnej analizie pokazaliśmy użyteczność tej metody jako bezpiecznej dla osób operowanych. Metodą tą z powodzeniem posługujemy się w leczeniu operacyjnym guzów nowotworowych tych narządów mięsaszowych (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 29).

Z wielu nowotworów które były operowane w W-M CO szczególną moją uwagę zwrócił czerniak ze względu na swoją swoistość biologiczną. Opublikowałem doniesienie kazuistyczne pierwotnego czerniaka z lokalizacją w przełyku który był operowany w Oddziale chirurgii onkologicznej. Ponadto zebrałem w materiale oddziału przypadki przerzutów czerniaka do narządów przewodu pokarmowego i opublikowałem w następnej pracy. Przedstawiłem losy wybranych dwóch chorych operowanych z powodu rozlanego czerniaka (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 30, 31). W roku 2017 pod moim kierunkiem kolega z zespołu chirurgii onkologicznej lek. P. Stefaniak przeprowadził analizę mikroskopową żyły odpiszczelowej, która w obrębie dużego przerzutu czerniaka uległa

przebudowie i uzyskała cechy morfologiczne charakteryzujące tętnicę mięśniową (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 2).

Ponadto byłem także współautorem analizy epidemiologicznej chorych na czerniaka w 10-letnim materiale oddziału chirurgii onkologicznej. Była to pracochłonna epidemiologiczna i kliniczna analiza, obejmująca 251 chorych leczonych w szpitalu i w ambulatorium. Na jej podstawie stwierdziliśmy, że najczęstszą lokalizacją czerniaka był tułów, następnie kolejno: kończyna dolna, kończyna górna i w najniższym procencie głowa i szyja. Taka lokalizacja pierwotnego umiejscowienia choroby wskazuje, że czynnik promieniowania ultrafioletowego nie jest znaczącym w etiologii tej choroby w populacji naszego regionu. Udokumentowaliśmy też późną zgłaszalność chorych do leczenia, ponieważ aż 34,7% chorych w momencie rozpoczęcia leczenia było w IV^o zaawansowania choroby (załącznik 3, wykaz publikacji pozycje 19).

Ponadto opublikowałem kilka doniesień klinicznych dotyczących przypadków kazuistycznych. Duża ilość chorych leczonych na oddziale chirurgii onkologicznej umożliwiła mi zetknięcie się z ciekawym przebiegiem choroby lub z rzadkimi przypadkami nowotworów. Taką publikacją była praca omawiająca sposób operacji, wycięcia zaawansowanego miejscowo raka okrężnicy esowatej który stanowił zawartość worka prawostronnej przepukliny pachwinowej. W pracy tej pokazałem właściwe złożenie kolejnych technik chirurgicznych w celu wykonania korzystnego dla chorego zabiegu przy tak zaskakującej śródoperacyjnie lokalizacji guza nowotworowego (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 24). W następnej pracy przedstawiłem pacjentkę operowaną z powodu nasilonej kolki nerkowej u której oprócz wycięcia guza moczowodu wykonaliśmy resekcję wielonarządową w przebiegu zaawansowanego raka żołądka. Na podstawie przeglądu literaturowego sugerowałem, że efektem operacji paliatywnych wykonywanych z powodu ostrych wskazań chirurgicznych jest także przedłużenie życia tych chorych, złagodzenie dolegliwości i czasową kontrolę choroby (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 16). W oparciu o demonstracje preparatów histopatologicznych (barwienia HE oraz IHC) wykonałem dwie prace, w pierwszej pokazywałem możliwość wystąpienia pierwotnego kostniakomięsaka w obrębie pęcherza moczowego (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 32), natomiast w drugiej pracy pokazałem rzadki, łagodny guz nerki – adenoma. Prezentowałem ewaluację oceny tego guza w oparciu o badanie radiologiczne, kliniczne i patomorfologiczne. (załącznik 3, wykaz publikacji pozycja 12).

Granty badawcze

W 2010 roku zostałem kierownikiem własnego projektu badawczego finansowanego w ramach konkursu MNiSz/Narodowego Centrum Nauki (nr NN 402 452 839) pt. „Analiza ekspresji genu PLAGL1 jako markera molekularnego raka nerki oraz regulatora ekspresji acetylotransferaz histonowych (p300/CBP, PCAF) i białek szlaku apoptozy (p53 oraz Bax)”. Uzyskane środki finansowe umożliwiły prowadzenie badań w zakresie analiz molekularnych i immunohistochemicznych w raku jasnokomórkowym nerki. Badania w ramach tego projektu prowadzone były do 2014 roku, a ich wynik zostały opublikowane w trzech publikacjach wchodzących w skład przedstawionej rozprawy habilitacyjnej.

Byłem też wykonawcą czterech grantów finansowanych przez Narodowego Centrum Nauki: „Analiza ekspresji genu PLAGL 1 jako markera molekularnego raka jelita grubego oraz regulatora ekspresji acetylotransferaz histonowych (p300/CBP, PCAF) i białek szlaku apoptozy (p53 oraz Bax)”. Nr 402 452 339, lata 2010-2014.

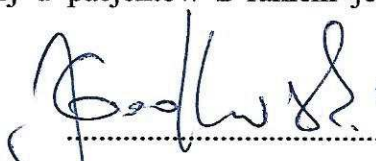
„Epigenetyczna regulacja ekspresji DDR1 i IKK beta w liniach komórkowych raka nerki - rola mikro-RNA-199a-5p i mikro-RNA-199b-5p w patogenezie raka jasnokomórkowego nerki”. Nr UMO-2012/05/B/NZ4/01832.

„Analiza niezależnego od białka p53 szlaku apoptotycznego w raku jelita grubego”. Nr NN402 683940, lata 2011-2015.

„Analiza genu RASSF1A jako markera molekularnego raka nerki oraz regulatora apoptozy FasL-RASSF1A-LATS1-YAP1-PUMA-BAX”. Nr IP2010 045970, lata 2010-2011.

Ponadto byłem kierownikiem projektów statutowych finansowanych przez Uniwersytet warmińsko-Mazurski w Olsztynie „Ocena mechanizmów ultrastrukturalnych zaniku neuronów zwoju Auerbacha w jelitowym układzie nerwowym w przebiegu raka jelita grubego”, rok 2015 i obecnie jestem w trakcie realizacji badania „Ocena poziomu ekspresji POLD1 jako jądrowego markera proliferacji komórkowej u pacjentów z rakiem jelita grubego” lata 2017-18.

Olsztyn 18.06.2018
.....
miejsowość, data


.....
podpis kandydata

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie