

Autoreferat

dr Aleksandra Markiewicz

Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, kwiecień 2023

1. Imię i nazwisko.

Aleksandra Markiewicz, <https://orcid.org/0000-0003-4590-4698>

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **Stopień doktora** nauk biologicznych w zakresie biochemii nadany przez Uniwersytet Gdański, 2015 r. tytuł rozprawy doktorskiej „Analiza markerów związanych z inwazją i przerzutowaniem u chorych na raka piersi”; Praca wykonana pod opieką prof. dr hab. Jacka Bigdy i dr hab. Anny Żaczek (promotor pomocniczy)
- **Kurs doktorski** w Studium Medycyny Molekularnej, Warszawa, 2009-2013 r.
- **Stopień magistra** nadany przez Uniwersytet Gdański Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiej Akademii Medycznej, kierunek biotechnologia, 2009 r. Tytuł pracy „Analysis of topoisomerase II alpha gene copy number in breast cancer patients”; Promotor – dr Anna Żaczek.
- **Stopień licencjata** nadany przez Uniwersytet Gdański – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku; kierunek biotechnologia, 2007 r. Tytuł pracy „Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR”; Promotor – dr hab. Krzysztof Bielawski.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- **od 2017 – obecnie – adiunkt** naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Onkologii Translacyjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, MWB UG-GUMed
- **2015-2017 – pracownik naukowy/post-doc** w Zakładzie Medycyny Eksperymentalnej i Procedur Terapeutycznych, Uniwersytet w Ratyzbonie, Niemcy
- **2014-2015 – asystent** w Zakładzie Biologii Komórki, Gdański Uniwersytet Medyczny, MWB UG-GUMed

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Współczynnik IF (Impact factor) podano zgodnie z rokiem ukazania się pracy, punktację Ministerstwa Edukacji i Nauki (Pkt. MEiN) zgodnie z wykazem obowiązującym w roku ukazania się prac (co obejmowało różne systemy punktacji czasopism).

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Znaczenie procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej w agresywności raka piersi.

4.2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

- 1) *The Landscape of Circulating Tumor Cell Research in the Context of Epithelial-Mesenchymal Transition.*

Markiewicz A, Żaczek A; Pathobiology. 2017;84(5):264-283.

IF=1,592; Pkt. MEiN=25

Praca poglądowa

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w sformułowaniu koncepcji i konspektu pracy
- wykonanie przeglądu i doboru literatury
- udział w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu (w szczególności Introduction, Role of EMT in CTC Biology, Cluster Formation for Efficient Metastasis, Staying Mesenchymal – Cooperation with Other Cells, EMT in Dissemination, EMT and Stemness, EMT in Immune Escape, Conclusions)
- udzielenie odpowiedzi na pytania recenzentów i edytora

- 2) *Aggressive phenotype of cells disseminated via hematogenous and lymphatic route in breast cancer patients;*

Markiewicz A*, Nagel A, Szade J, Majewska H, Skokowski J, Seroczyńska B, Stokowy T, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Żaczek AJ

Translational Oncology 11(3), 2018

*autor korespondencyjny

IF=3,138; Pkt. MEiN=30

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w sformułowaniu hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- opracowanie metod: izolacji CTCs z krwi, preamplifikacji transkryptów w materiale z CTCs, analizy ekspresji genów metodą qPCR w CTCs/utrwalonych w formalinie zatopionych w parafinie fragmentach tkanek, analizy heterogenności białek w guzach pierwotnych i przerzutach indeksem Giniego, klasyfikacji fenotypów EMT w CTCs, guzach pierwotnych i przerzutach
- wykonanie analiz molekularnych: izolacja CTCs, izolacja RNA z CTCs/guzów pierwotnych/przerzutów, preamplifikacja transkryptom CTCs, analiza ekspresji genów w CTCs/guzach pierwotnych/przerzutach metodą qPCR
- analiza i interpretacja wyników ekspresji genów w guzach pierwotnych i przerzutach
- analiza statystyczna danych
- udział w interpretacji wyników
- udział w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, odpowiedzi do recenzentów i edytora,

- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego
- 3) *Spectrum of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in circulating tumour cells from early breast cancer patients;*
Markiewicz A*, Topa J, Nagel A, Skokowski J, Seroczynska B, Stokowy T, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ*
Cancers 11 (1), 59, 2019
*autorzy korespondencyjni
IF=6,126; Pkt. MEiN=140
Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w sformułowaniu hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- izolacja krążących komórek nowotworowych od chorych na raka piersi i zdrowych ochotników, izolacja i przygotowanie transkryptomu pozyskanych komórek do analiz molekularnych, wykonanie preamplifikacji transkryptomu dla większości próbek
- opracowanie kryteriów immunohistochemicznej identyfikacji EMT w guzach pierwotnych i przerzutach
- udział w analizie statystycznej danych
- interpretacja wyników
- udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu, odpowiedzi do recenzentów i edytora,
- pozyskanie środków na badania i kierowanie projektem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

- 4) *Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression – the impact of molecular subtype and stromal composition*
Markiewicz A*, Topa J, Popeda M, Szade J, Skokowski J, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ*;
Acta Biochimica Polonica 68(3), 2021
*autorzy korespondencyjni
IF=2,349; Pkt. MEiN=70
Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w tworzeniu hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- opracowanie kryteriów immunohistochemicznej identyfikacji EMT w guzach pierwotnych i przerzutach
- udział w analizie statystycznej danych
- interpretacja wyników
- udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu
- odpowiedzi na uwagi recenzentów
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

- 5) *Reduced expression of innate immunity-related genes in lymph node metastases of luminal breast cancer patients.*
Popeda M, **Markiewicz A**, Stokowy T, Szade J, Niemira M, Kretowski A, Bednarz-Knoll N, Zaczek AJ.
Scientific Reports, 11, 5097, 2021
IF=4,997; Pkt. MEiN=140
Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w opracowaniu koncepcji badań
- udział w interpretacji wyników analizy immunotranskryptomu (dane własne, dane z projektu GTex)
- redakcję manuskryptu
- udział w odpowiedzi na recenzję
- nadzór merytoryczny nad analizą immunotranskryptomu

6) *Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features—an unreachable target?*

Topa J, Grešner P, Żaczek AJ, **Markiewicz A***

Cellular and Molecular Life Sciences 79 (2), 2022

*autor korespondencyjny

IF=9,234; Pkt. MEiN=140

Praca poglądowa zawierająca obszerną analizę statystyczną danych literaturowych dotyczących metod i markerów do izolacji krążących komórek nowotworowych.

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w tworzeniu koncepcji pracy
- udział w pisaniu manuskryptu („Methods and markers for mesenchymal CTCs detection and characterization in clinical samples”, „Summary and discussion”, nadzór merytoryczny nad częścią „Comparison of methods efficiency for epithelial and mesenchymal CTCs recovery in spike-in tests”, udział w pisaniu „Introduction”)
- udział w przygotowaniu Tabel
- udział w wykonaniu analizy statystycznej i jej interpretacji
- dokonanie podsumowania i wyciągnięcia wniosków z całej pracy
- przygotowywanie odpowiedzi do recenzentów, korespondencja z edytorem, poprawianie manuskryptu w trakcie recenzji
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

Dane naukometryczne sześciu prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego:

Sumaryczny IF publikacji = 27,436

Sumaryczna wartość punktów MEiN = 545

4.3. Omówienie celu naukowego wymienionych wyżej prac i osiągniętych wyników

Celem prowadzonych badań była analiza znaczenia (biologicznego i klinicznego) stopnia aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) w komórkach nowotworowych na różnych etapach kaskady metastatycznej u chorych na raka piersi.

Szczegółowe cele, rozpatrywane w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego obejmowały:

1. Ocenę możliwych molekularnych i klinicznych konsekwencji aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej w krążących komórkach nowotworowych w szczególności w raku piersi - przegląd literatury (**Publikacja 1**).

2a. Analizę poziomu markerów komórek macierzystych w komórkach nowotworowych na różnych etapach kaskady metastatycznej chorych na raka piersi – guzie pierwotnym, krążących komórkach nowotworowych i przerzutach do węzłów chłonnych, z uwzględnieniem statusu aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej (**Publikacja 2**).

2b. Analizę znaczenia klinicznego aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej i ekspresji markerów komórek macierzystych w komórkach nowotworowych na różnych etapach kaskady metastatycznej – guzie pierwotnym, krążących komórkach nowotworowych i przerzutach do węzłów chłonnych (**Publikacja 2**).

3. Pogłębioną charakterystykę molekularną (zwłaszcza fenotypu epitelialno-mezenchymalnego) krążących komórek nowotworowych od chorych na raka piersi i znaczenie kliniczne wykrytych fenotypów krążących komórek nowotworowych (**Publikacja 3**).

4. Analiza zmian statusu epitelialno-mezenchymalnego komórek nowotworowych raka piersi w guzach pierwotnych i przerzutach do węzłów chłonnych w podtypach molekularnych raka piersi (**Publikacja 4**).

5. Analiza zmian w profilu immunotranskryptomu w guzach pierwotnych i przerzutach do węzłów chłonnych od chorych na raka piersi o podtypie luminalnym (**Publikacja 5**).

6a. Porównanie efektywności metod do izolacji krążących komórek nowotworowych o różnym fenotypie epitelialno-mezenchymalnym w modelach symulujących próbki kliniczne (**Publikacja 6**).

6b. Ocena efektywności izolacji krążących komórek nowotworowych o różnym fenotypie epitelialno-mezenchymalnym od chorych na raka piersi pod kątem metod oraz markerów wykorzystywanych do izolacji tych komórek (**Publikacja 6**).

4.3.1. Wstęp

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet na świecie i drugim pod względem liczebności zgonów¹. Śmierć chorych na raka piersi w dużej mierze wynika z rozwijania się wyniszczających i upośledzających funkcjonowanie organizmu przerzutów odległych. Utworzenie przerzutów odległych wymaga przedostania się komórek nowotworowych z lokalizacji pierwotnej do innego narządu np. poprzez naczynia krwionośne². Takie oderwane z masy guza komórki nowotworowe nazywane są krążącymi komórkami nowotworowymi (ang. *circulating tumour cells*, CTCs); są one wykrywane u chorych na raka piersi a ich obecność ma znaczenie rokownicze, identyfikując grupę chorych o większym ryzyku progresji choroby i zgonu³. Wyniki najnowszych badań klinicznych pokazują także, że CTCs mogą być także wykorzystywane do podejmowania decyzji terapeutycznych – wybór terapii w oparciu o liczbę CTCs w pewnych przypadkach klinicznych może dawać lepsze wyniki leczenia niż podejmowanie decyzji w oparciu o klasyczne czynniki kliniczno-patologiczne (badanie STIC-CTC)⁴. Wiele danych wskazuje zatem na użyteczność kliniczną CTCs w monitorowaniu przebiegu raka piersi^{5 6}. Problemy jakie zaobserwowano to heterogenność fenotypów CTCs, nie tylko pod kątem znanych markerów rokowniczych i predykcyjnych (jak obecność receptorów hormonów steroidowych czy receptora HER2), ale także pod względem podstawowych cech epitelialnych (np. ekspresji markera EpCAM), wykorzystywanych jako kluczowe cząsteczki do wychwytywania czy identyfikacji CTCs. Zmienność ta może wynikać z aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej (ang. *epithelial-mesenchymal*

transition, EMT) w wyniku której komórki pochodzenia nabłonkowego (jak komórki raka piersi) obniżają ekspresję markerów epitelialnych i nabywają ekspresję markerów mezenchymalnych^{7,8}. Wydaje się zatem, że nie tylko liczba, ale i fenotyp CTCs może być istotny z klinicznego punktu widzenia. Studiując to zagadnienie (cel 1) zauważyłam, że EMT w warunkach patologicznych pozwala komórkom epitelialnym nie tylko na nabycie zdolności do migracji i przez to możliwość tworzenia odległych przerzutów, ale także wiele innych cech, które mogą ułatwiać komórkom przejście przez etapy kaskady metastatycznej. W tym kontekście w **Publikacji 1** szeroko opisałam proces EMT i jego znaczenie w progresji raka piersi – możliwe ścieżki indukcji EMT i konsekwencje nabywania cech mezenchymalnych przez CTCs, w tym udział procesu EMT w rozsiewie komórek nowotworowych, kooperacji z innymi komórkami w procesie przerzutowania, ucieczce spod kontroli układu odpornościowego, czy możliwości indukcji fenotypu macierzystego. W pierwszej kolejności chciałam sprawdzić na próbkach klinicznych zachodzenie zjawisk łączonych z procesem EMT w raku piersi, jest to istotny etap badań translacyjnych, pozwalający ocenić czy i w jakich przypadkach procesy obserwowane w modelach *in vitro* czy modelach zwierzęcych są reprezentowane w materiale od pacjentów. W tym kontekście w **Publikacji 2** analizowałam związek pomiędzy obecnością fenotypu komórek macierzystych w komórkach nowotworowych a aktywacją procesu EMT u chorych na raka piersi (cel 2a). Charakteryzacja objęła komórki nowotworowe obecne na różnych stadiach procesu przerzutowania – w guzie pierwotnym, w przerzutach do węzłów chłonnych oraz we krwi (jako CTCs). Ocenione zostało także znaczenie kliniczne fenotypu EMT (cel 2b), które okazało się mieć najistotniejsze znaczenie w CTCs – obecność mezenchymalnych CTCs związana była z krótszym przeżyciem chorych. Obserwując, że fenotyp EMT CTCs ma duże znaczenie dla progresji raka piersi u chorych z nieprzerzutowym nowotworem opracowałam technikę preamplifikacji wybranych transkryptów z CTCs w celu umożliwienia ich lepszej charakteryzacji pod kątem EMT; był to cel **Publikacji 3** (cel 3). Pokazałam w niej, że dołączenie dodatkowych markerów epitelialnych i mezenchymalnych pozwala lepiej zidentyfikować aktywację procesu EMT i wykrycie we frakcji CTCs fenotypu epitelialno-mezenchymalnego. Fenotyp ten w analizie przeżycia nie wykazywał jednak takiej samej agresywności jak fenotyp mezenchymalny. Oba fenotypy (epitelialno-mezenchymalny i mezenchymalny) natomiast były związane z ponad dwukrotnym ryzykiem zajęcia węzłów chłonnych. Badania te wskazują na negatywny wpływ mezenchymalnych cech CTCs na progresję raka piersi i konieczność selekcji odpowiednich metod i markerów do selekcji szerokiego spektrum fenotypów CTCs, aby prawidłowo określić charakterystykę całej puli CTCs w próbkach krwi od chorych. Wybór markerów i metod powinien być zatem podyktowany oceną skuteczności odzysku CTCs w próbce wybraną metodą oraz markerem do detekcji CTCs. Ponieważ temat płynnej biopsji jest szeroko badany i opracowywane są nowe narzędzia do izolacji CTCs, porównanie poszczególnych metod pod kątem ich zdolności do wykrycia CTCs o fenotypie epitelialnym i mezenchymalnych pozwoliłoby wytyczyć kierunki badań translacyjnych skierowanych na wykorzystanie CTCs do monitorowania przebiegu leczenia czy prognozowania choroby. To właśnie porównanie metod do izolacji CTCs (także tych mezenchymalnych) w warunkach symulacji próbki klinicznej (dodanie znanej liczby komórek nowotworowych do krwi) oraz danych uzyskanych z faktycznych próbek klinicznych od chorych na raka piersi było celem **Publikacji 6** (cel 6a i 6b). Głównym wynikiem pracy było pokazanie, że epitelialne i mezenchymalne CTCs mogą być efektywnie izolowane wybranymi metodami, podczas gdy inne technologie preferencyjne wychwytyją tylko jeden z fenotypów CTCs. W przypadku próbek klinicznych ważnym spostrzeżeniem było pokazanie, że markery najczęściej wykorzystywane do detekcji mezenchymalnych CTCs – czynniki transkrypcyjne indukujące EMT, jak TWIST1, SNAIL, ZEB1, charakteryzują się najniższym stopniem detekcji mezenchymalnych CTCs.

W **Publikacja 4** rozpoczęłam analizę zagadnienia związanego z dynamiką procesu EMT w podtypach molekularnych raka piersi (cel 4) – luminalnego, opisywanego jako wysoce epitelialny i potrójnie ujemnego raka piersi, który jest opisywany jako bardziej mezenchymalny. Wyniki pokazały, że status aktywacji procesu EMT ulega zmianie w dużo większym stopniu w nowotworach luminalnych – może być włączany lub wyłączany w zależności od lokalizacji (guz pierwotny vs przerzut do węzła chłonnego) i stopnia zaawansowania (obecność lub brak przerzutów do węzłów chłonnych). W nowotworach potrójnie ujemnych natomiast mezenchymalność związana jest ze zwiększonym tempem podziałów komórkowych. Wynika te stanowią podstawę do prowadzonych obecnie prac badawczych mających na celu określenie zmian indukowanych w procesie EMT w luminalnych A, luminalnych B i bazalnych rakach piersi.

Obserwując w **Publikacji 4**, że obecne są różnice w aktywacji procesu EMT w zależności od miejsca wzrostu guza (pierwotna zmiana lub przerzut do węzła chłonnego), wartościowym było sprawdzenie jak różni się mikrośrodowisko w tych kompartmentach (cel 5), z naciskiem na porównanie immunotranskryptomu (**Publikacja 5**) jako że węzły chłonne są strukturami układu odpornościowego. Wyniki tej pracy pokazały wyższy poziom ekspresji składników układu dopełniacza w guzie pierwotnym, co może mieć znaczenie także w kontekście regulacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej.

4.3.2. Opis prac wchodzących w skład cyklu monotematycznego (osiągnięcia habilitacyjnego)

Publikacja 1

Markiewicz A, Żaczek AJ. *The Landscape of Circulating Tumor Cell Research in the Context of Epithelial-Mesenchymal Transition.* Pathobiology 84(5), 2017.

Wykorzystanie krążących komórek nowotworowych do oceny rokowania i monitorowania przebiegu raka piersi jest intensywnie badane, w aspekcie klinicznym najczęściej z wykorzystaniem techniki CellSearch, która wykrywa komórki nowotworowe na podstawie markerów epitelialnych – EpCAM i CK8/18/19. Doniesienia naukowe pokazują, że fenotyp CTCs jest jednak znacznie bardziej heterogenny, gdyż powstające w wyniku aktywacji procesu EMT komórki nowotworowe mogą nie być wykrywane z zastosowaniem metody CellSearch⁷. Poza opisem klinicznego znaczenia komórek o fenotypie mezenchymalnym w raku piersi, możliwości jego hamowania, pytanie jakie stawiałam sobie w tym czasie dotyczyło tego, o czym w kontekście biologicznym może informować nas obecność krążących komórek nowotworowych o fenotypie mezenchymalnym? Szczegółowa analiza literatury wykazała, że:

- mezenchymalny fenotyp CTCs może wynikać z obecności heterotypowych klastrów CTCs z innymi typami komórek, zdolnych do wydzielania induktorów EMT (np. fibroblastów) czy płytek krwi. Fibroblasty (obecne w stromie nowotworu) mogą tworzyć klastry z komórkami nowotworowymi i ułatwiać im przetrwanie we krwi i zasiedlaniu nowej niszy w miejscu odległym. Płytki krwi natomiast mogą wspomagać intra- i ekstrawazację CTCs, chronić CTCs przed apoptozą, zniszczeniem przez układ odpornościowy czy stresem wynikającym z naprężeń w trakcie przemieszczania się CTCs przez naczynia krwionośne. W CTCs występującymi z płytkami zaobserwowano mezenchymalny fenotyp CTCs i wzmożoną sygnalizację of TGFβ czy PDGF, które są induktorami EMT.
- fenotyp mezenchymalny CTCs może być związany z aktywacją fenotypu komórek macierzystych, które napędzają wzrost nowotworu i zwiększają opornością komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Ponadto, komórki o fenotypie mezenchymalnym i z

ekspresją markerów CSCs lepiej aktywują fibroblasty, które modyfikują zrąb przygotowując go jednocześnie do kolonizacji przez komórki nowotworowe.

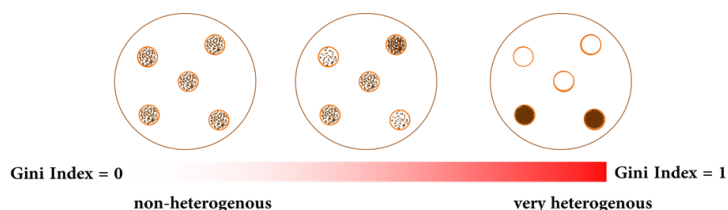
- komórki nowotworowe ulegające EMT mogą mieć obniżoną ekspresję markerów charakterystycznych dla danego nowotworu przez co mogą stawać się mniej „rozpoznawalne” przez komórki układu odpornościowego. Ponadto w raku płuca (który również jest pochodzenia nabłonkowego) EMT może powodować obniżenie prezentacji wszystkich antygenów na powierzchni komórki. W trakcie EMT może jednak wzrastać zdolność komórek do produkcji sygnałów hamujących komórki układu odpornościowego.

Wnioski jakie wyciągnęłam z tej pracy były w dużej mierze przesłanką do napisania grantu badawczego SONATA („Poszukiwanie przyczyn agresywności komórek nowotworowych poza guzem pierwotnym – molekularna charakterystyka pojedynczych krążących komórek nowotworowych u chorych na raka piersi”; NCN 2016/21/D/NZ3/02629), który uzyskał finansowanie z Narodowego Centrum Nauki i w którym badam na poziomie pojedynczych komórek fenotypy epitelialno-mezenchymalne CTCs od chorych na raka piersi, aktywację procesów pozwalających na ucieczkę spod kontroli układu odpornościowego (zarówno w CTCs od pacjentek chorych na raka piersi jak i w modelu mysim raka piersi) czy tworzenie klastrów pomiędzy CTCs a fibroblastami krążącymi we krwi u chorych na raka piersi.

Publikacja 2

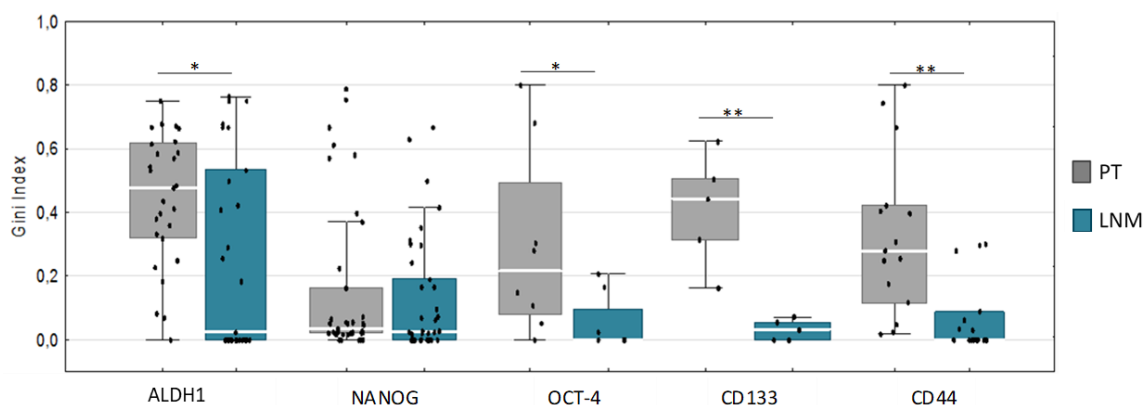
Markiewicz A, Nagel A, Szade J, Majewska H, Skokowski J, Seroczyńska B, Stokowy T, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Zaczek AJ. *Aggressive phenotype of cells disseminated via hematogenous and lymphatic route in breast cancer patients*. *Translational Oncology*, Vol 11 (3), 2018.

Badania nad wzrost nowotworów i tworzeniem przerzutów nowotworowych pokazały, że podobnie jak w zdrowych tkankach, w nowotworach można zaobserwować obecność komórek nowotworowych mających właściwości komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells*, CSCs) ^{9,10}. W raku piersi za markery komórek macierzystych uznaje się m.in. ALDH1, CD133, OCT-4, NANOG, czy CD44, które mogą identyfikować populację komórek o podwyższonej zdolności do tworzenia przerzutów ¹⁰. Nie jest jednak wiadome na ile dynamiczny jest proces powstawania CSC w nowotworach i w jaki sposób zmienia się w trakcie przerzutowania. Ponadto, samo pochodzenie nowotworowych CSCs nie zostało do końca wyjaśnione. Badania funkcjonalne wykazały, że proces EMT może indukować fenotyp macierzysty w komórkach pochodzących z gruczoły piersiowego ¹¹; także w próbkach od pacjentów z rakiem piersi zidentyfikowano komórki wykazujące jednocześnie fenotyp macierzysty i mezenchymalny ¹¹. Bazując na tych faktach celem Publikacji nr 2 było określenie, czy jest związek między ekspresją markerów przemiany epitelialno-mezenchymalnej a markerami komórek macierzystych w komórkach nowotworowych analizowanych na różnych stadiach progresji choroby – w lokalizacji pierwotnej (guz pierwotny, ang. *primary tumour*, PT), w zajętych węzłach chłonnych (ang. *lymph node metastases*, LNM) i krążących we krwi komórkach nowotworowych (ang. *circulating tumour cells*, CTCs). Ponieważ proces EMT może być aktywowany w różnym stopniu w danym czasie i lokalizacji, jego aktywność może przekładać się na zróżnicowaną ekspresję markerów macierzystości (ALDH1, NANOG, OCT-3, CD133, CD44). Aby to zbadać, opracowałam kryteria oceny heterogenności ekspresji markerów macierzystości na podstawie zmian w poziomie ekspresji tych markerów w kilku lokalizacjach w obrębie guzów i przerzutów do węzłów chłonnych. Wykorzystując tzw. indeks Ginniego (ang. *Ginni Index*, GI), oceniłam na ile homogenne (niski GI) lub heterogenne (wysoki GI) są nowotwory pod kątem danego markera macierzystości (**Rycina 1**).



Rycina 1. Wykorzystanie Indexu Ginniego do ocena heterogenności ekspresji markerów komórek macierzystych w guzach pierwotnych raka piersi i jego przerzutach do węzłów chłonnych.

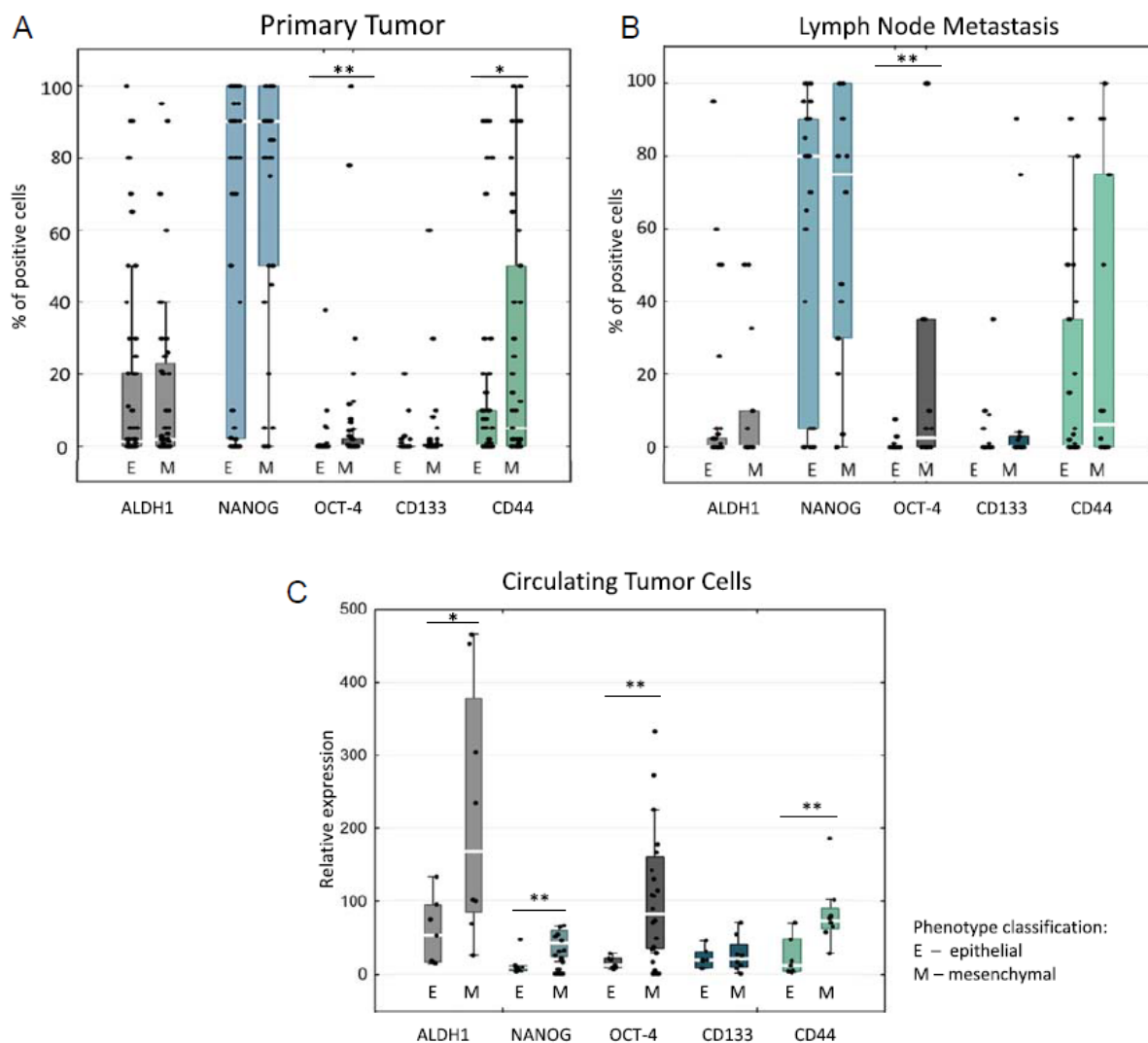
Wyniki pokazały, że o ile średni poziom ekspresji markerów komórek macierzystych w guzie pierwotnym i przerzucie jest podobny (poza ALDH1, którego poziom był niższy w LNM) o tyle heterogenność ekspresji markerów macierzystości znacznie maleje w przerzutach (w porównaniu do guzów pierwotnych, co zaobserwowano dla ALDH1, OCT-4, CD133 i CD44; **Rycina 2**). Oznacza to, że w trakcie przerzutowania dochodzi albo do selekcji klonów o określonym poziomie markerów macierzystości, albo w węzle chłonny komórkę nowotworowe utrzymują ekspresję markerów macierzystości na podobnym poziomie w całym obszarze (oba mechanizmy nie wykluczają się), co może wynikać z wpływu środowiska w jakim tworzą przerzut.



Rycina 2. Heterogenność ekspresji markerów macierzystości oceniana indeksem Ginniego w guzach pierwotnych i przerzutach do węzłów chłonnych od chorych na raka piersi.

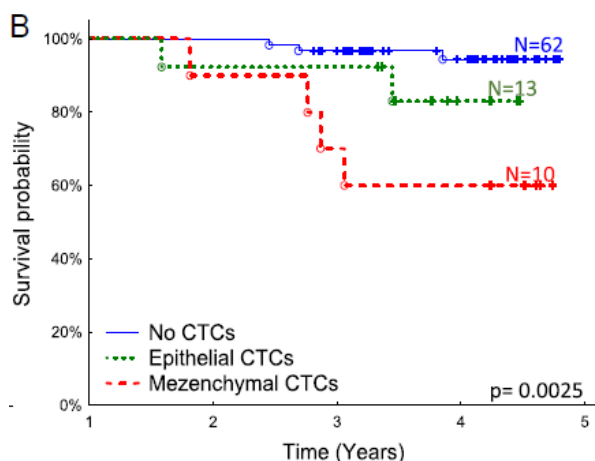
Następnie po oznaczeniu fenotypu EMT guzów pierwotnych i przerzutów do węzłów chłonnych (immunohistochemicznie oceniając utratę E-kadheryny, ekspresję wimentyny i N-kadheryny w komórkach nowotworowych) podzieliłam próbki na epitelialne (ekspresja E-kadheryny, brak ekspresji N-kadheryny i wimentyny) lub mezenchymalne (utrata E-kadheryny lub nabycie wimentyny lub N-kadheryny w co najmniej 10% komórek nowotworowych). W krążących komórkach nowotworowych fenotyp EMT oceniłam techniką PCR w czasie rzeczywistym w oparciu o nadekspresję wimentyny. Analizy pokazały, że fenotyp mezenchymalny charakteryzował się zwiększoną ekspresją markerów macierzystości na każdym z analizowanych etapów kaskady metastatycznej (OCT-4, CD44 w guzach pierwotnych; OCT-4 w przerzutach do węzłów chłonnych; ALDH1, NANOG, OCT-4, CD44 w CTC; **Rycina 3**), co może wskazywać na stosunkowo stabilne powiązanie między EMT a macierzystością w różnych środowiskach. Zaobserwowałam również, że nowotwory o fenotypie mezenchymalnym mają wyższy współczynnik podziału (Ki-67), co pośrednio może wskazywać na zaangażowanie puli komórek nowotworowych o fenotypie macierzystym w proliferację nowotworu. Możliwe jest zatem, że nawet

tymczasowa aktywacja procesu EMT w tkankach zmienionych nowotworowo może przejściowo zwiększyć tempo podziałów komórek nowotworowych.



Rycina 3. Poziom markerów macierzystości w guzach pierwotnych (A), przerzutach do węzłów chłonnych (B) i krążących komórkach nowotworowych (C) w podziale na fenotyp epitelialno-mezenchymalny próbki – epitelialny (E) lub mezenchymalny (M).

Następnie korelując dane kliniczno-patologiczne pacjentów z ekspresją genów związanych z fenotypem macierzystym zaobserwowałam, że wyższa ekspresja CD133 i CD44 w guzie pierwotnym i przerzucie do węzła chłonnego związana jest z większym stopniem złośliwości histologicznej (stopień G3 obejmuje nowotwory o większym odróżnicowaniu komórek nowotworowych od ich pierwotnego fenotypu) czy brakiem receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR). W przypadku wyników otrzymanych z frakcji CTCs podwyższona ekspresja CD44 występowała w większych nowotworach (cecha T2-4). W kontekście przeżycia chorych, to status epitelialno-mezenchymalny CTCs (a nie guzów pierwotnych czy przerzutów) był związany z gorszą prognozą. U chorych z wykrytymi CTCs o fenotypie mezenchymalnym odsetek chorych przeżywających 5-letni okres wyniósł 60% w porównaniu do 82% u chorych z epitelialnymi CTCs (**Rycina 4**). W analizie wieloczynnikowej mezenchymalny fenotyp CTC był niezależnym czynnikiem rokowniczym związanym z 5.63-krotnym ryzykiem zgonu (95% CI 1.23-25.86, $p=0.026$; w porównaniu do chorych z epitelialnym CTCs lub brakiem CTCs).



Rycina 4. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na raka piersi w zależności od obecności i fenotypu wykrytych krążących komórek nowotworowych.

Publikacja 3

Markiewicz A, Topa J, Nagel A, Skokowski J, Seroczynska B, Stokowy T, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ. *Spectrum of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in circulating tumour cells from early breast cancer patients.* *Cancers* 11 (1), 59, 2019.

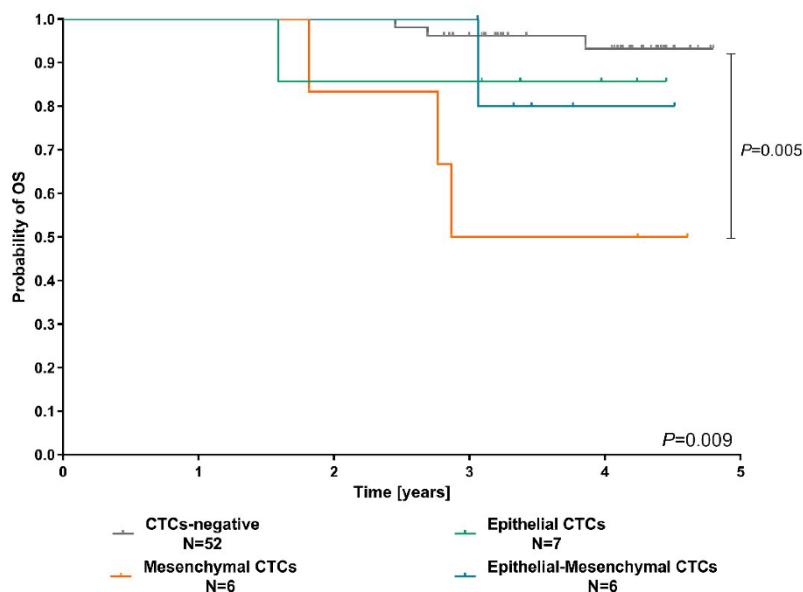
Badania naukowe nad procesem EMT pokazywały, że przebywanie komórek nowotworowych w stanie częściowej przemiany EMT (tzw. *partial EMT*) może się wiązać z największą plastycznością komórek i możliwie największą zdolnością do tworzenia przerzutów, gdyż jest związana z dużymi zdolnościami adaptacyjnymi ważnymi w procesie tworzenia przerzutów¹². Obserwując w Publikacji 2, że mezenchymalny fenotyp CTCs jest związany z gorszą prognozą, narzucało się pytanie, czy stosując większą liczbę markerów mogących lepiej identyfikować fenotyp (częściowej przemiany) EMT możliwa jest bardziej czuła i precyzyjna identyfikacja agresywnych CTCs. Ponieważ w Pracy nr 2 wykorzystany był materiał bezpośrednio izolowany z CTCs, którego ilość pozwalała na zmierzenie ekspresji jedynie kilkunastu markerów, fenotyp CTCs określony był tylko na podstawie dwóch markerów – cytokeratyny 19 (*CK19*, marker epitelialny) i wimentyny (*VIM*, marker mezenchymalny), a przy tak ustalonym panelu zaobserwowano tylko jedną próbkę z fenotypem mieszanym epitelialno-mezenchymalnym. Dlatego też w **Publikacji 3** wykonałam preamplifikację dodatkowych markerów EMT - E-kadheryny (*CDH1*), N-kadheryny (*CDH2*), plastyny-3 (*PLS-3*), które mogły być użyteczne do identyfikacji komórek nowotworowych izolowanych z krwi obwodowej. Dodatkowo amplifikowany był marker formowania klastrów CTCs – plakoglobina (kodowaną przez gen *JUP*), jako że doniesienia naukowe wskazywały na około 50-krotnie większy potencjał do przerzutowania klastrów komórek nowotworowych niż pojedynczych komórek¹³. Wykorzystując taki rozszerzony klasyfikator genowy do oceny epitelialności/mezenchymalności, próbki CTCs podzielono na trzy klasy fenotypowe:

- epitelialną (*CK19* + i/lub *CDH1*+ i *VIM*-, *CDH2*-, *PLS3*-),
- mezenchymalną (*CK19*- i *CDH1*- oraz *VIM*+ albo *CDH2*+ albo *PLS3*+)
- epitelialno-mezenchymalną (w której co najmniej jeden z markerów epitelialnych *CK19* lub *CDH1* ulegał ekspresji razem z markerem mezenchymalnym – *VIM* lub *CDH2* lub *PLS3*)

Co interesujące, w próbkach o fenotypie epitelialno-mezenchymalnym nie obserwowano obniżenia markerów epitelialnych (a nawet wzrost ekspresji markera epitelialnego *CDH1*), ale wzrost markerów

mezenchymalnych (*CDH2* i *PLS3*). Obserwacja ta wskazuje, że w próbkach CTCs w których doszło do indukcji procesu EMT podwyższona jest ekspresję markerów mezenchymalnych, ale ekspresji markerów epitelialnych może być zachowana na podobnym poziomie. Może to mieć istotne znaczenia przy wyborze metod izolacji CTCs do identyfikacji różnych fenotypów EMT - wskazuje bowiem, że fenotypy pośrednie (epitelialno-mezenchymalne) powinny być wychwytywane z porównywalną czułością jak fenotyp epitelialny, jeżeli do izolacji CTCs stosuje się metody opierające się na epitelialnych markerach do selekcji/detekcji (np. CellSearch). Dalsza hierarchiczna klasteryzacja danych bez nadzoru wykonana na podstawie ekspresji genów analizowanych w próbkach CTCs (markery EMT, markery komórek macierzystych, markery inwazji i przerzutowania, marker formowania klastrów) wykazała obecność dwóch głównych klastrów – pierwszy klaster zawierał głównie próbki o fenotypie mezenchymalnym, drugi klaster grupował próbki epitelialne, próbki epitelialno-mezenchymalne rozłożone były pomiędzy epitelialną i mezenchymalną grupą (w Publikacji 3 Rycina 5). Poziom ekspresji markerów inwazji i przerzutowania (*CXCR4* i *uPAR*) czy genów macierzystości (*CD44*, *NANOG*, *OCT-4*, *ALDH1*, *CD133*) w próbkach o fenotypie epitelialno-mezenchymalnym najczęściej był pośredni pomiędzy fenotypem epitelialnym i mezenchymalnym (poza niektórymi wyjątkami, jak *ALDH1* czy *JUP*, choć wynik nie był istotny statystycznie). Wynik ten nie potwierdza hipotezy, że epitelialno-mezenchymalny fenotyp jest najbardziej agresywny, z drugiej strony w przeprowadzonym badaniu nie można było stwierdzić, czy fenotyp epitelialno-mezenchymalny wynika z obecności komórek o odrębnych fenotypach - epitelialnym i mezenchymalnym wymieszanych ze sobą (i mierzy uśredniony poziom ekspresji genów) czy faktycznego hybrydowego fenotypu CTCs. Badania tego zagadnienia podjęłam w obecnie wykonywanym grantie SONATA 11 NCN (nr 2016/21/D/NZ3/02629). Dalsze badania prowadzone przeze mnie w granice SONATA na poziomie pojedynczych komórek mogą pomóc w znalezieniu odpowiedzi na to pytanie.

Rozpatrując zależności pomiędzy fenotypem CTCs a parametrami kliniczno-patologicznymi można zaobserwować, że u chorych z CTCs o fenotypie epitelialno-mezenchymalnym i mezenchymalnym większy był rozmiar guza (T2-4) i częściej zajęte były węzły chłonne (względne ryzyko zajęcia węzłów chłonnych podwyższone 2,17-krotnie, 95%CI 1.32–3.56; $p=0,023$); wystąpił także trend w stronę większego stopnia złośliwości histologicznej (G3). W analizie wieloczynnikowej tylko fenotyp mezenchymalny CTCs związany był z podwyższonym ryzykiem zgonu (HR = 7.73, 95%CI 1,06-50.41, $p=0,04$, **Rycina 5**).



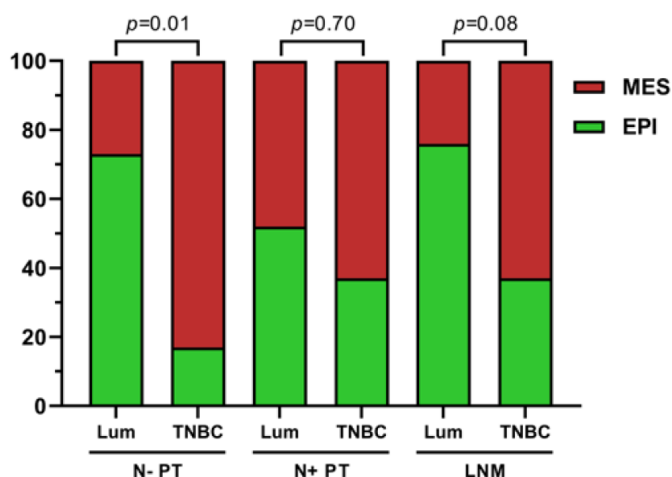
Rycina 5. Znaczenie rokownicze (prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia) u chorych na raka piersi w zależności od statusu CTCs (brak, fenotyp epithelialny, epithelialno-mezenchymalny, mezenchymalny). Statystycznie istotną różnicę odnotowano pomiędzy chorymi bez CTC a chorymi z mezenchymalnymi CTCs.

Publikacja 4

Markiewicz A*, Topa J, Popeda M, Szade J, Skokowski J, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ*.

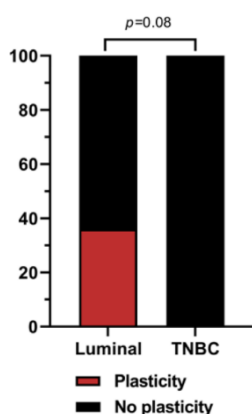
Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression – the impact of molecular subtype and stromal composition. Acta Biochimica Polonica, Vol. 68 No. 3, 2021.

Proces EMT może być regulowany przez czynniki wydzielane przez zrąb nowotworu, z drugiej jednak strony komórki nowotworowe mogą mieć wewnątrznie regulowany stopień ekspresji markerów epithelialnych i mezenchymalnych, co przekłada się na ich różny stopień mezenchymalności. I tak też raki piersi o podtypie bazalnym/potrójnie ujemnym są z natury bardziej mezenchymalne niż raki luminalne. Raki luminalne charakteryzują się wyższą ekspresją receptorów hormonów steroidowych (jak receptor estrogenowy i/lub progesteronowy), natomiast raki o fenotypie potrójnie ujemnym (ang. *triple negative breast cancer*, TNBC) nie wykazują ekspresji receptorów hormonów steroidowych oraz receptora HER2¹⁴. W **Publikacji 4** testowałam hipotezę dotyczącą plastyczności fenotypu epithelialno-mezenchymalnego w komórkach raka piersi o podtypie luminalnym i TNBC analizowanym na różnych etapach rozsiewu – w guzie pierwotnym oraz w przerzutach do węzłów chłonnych, czyli dwóch różnych niszach w których nowotwory doprowadziły do rozwoju ognisk nowotworowych. Ponadto zebrane próbki guzów pierwotnych zostały podzielone na stadia progresji – i) bez zajęcia (N-) oraz ii) z zajęciem regionalnych węzłów chłonnych (N+). Co ciekawe, o ile w guzach pierwotnych u chorych bez przerzutów zaobserwowałam różnice w aktywacji procesu EMT pomiędzy rakami TNBC i luminalnymi (raki TNBC były bardziej mezenchymalne – 83% niż raki o fenotypie luminalnym – 27%, $p=0,01$) o tyle w guzach, które skolonizowały już węzły chłonne takich różnic nie było (guzy luminalne miały podobny stopień mezenchymalności – 48% jak guzy potrójnie ujemne 63%, $p=0.70$) (**Rycina 6**). Różnice te wskazują, że w różnych podtypach molekularnych raka piersi proces EMT może być różnie aktywowany w zależności od stadium progresji nowotworu – guzy luminalne aktywują proces EMT w trakcie progresji (wzrost aktywacji EMT o 21% w guzach N+ w porównaniu do guzów N-, $p=0,06$).



Rycina 6. Aktywacja procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej w guzach pierwotnych (PT) chorych bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N-) i z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (N+) oraz w samych węzłach chłonnych (LNM). Analiza wykonana w podziale na podtypy molekularne raka piersi – luminalny (Lum) i potrójnie ujemny rak piersi (TNBC). EPI – fenotyp epitelialny raka, MES – stwierdzona obecność komórek nowotworowych o fenotypie mezenchymalnym.

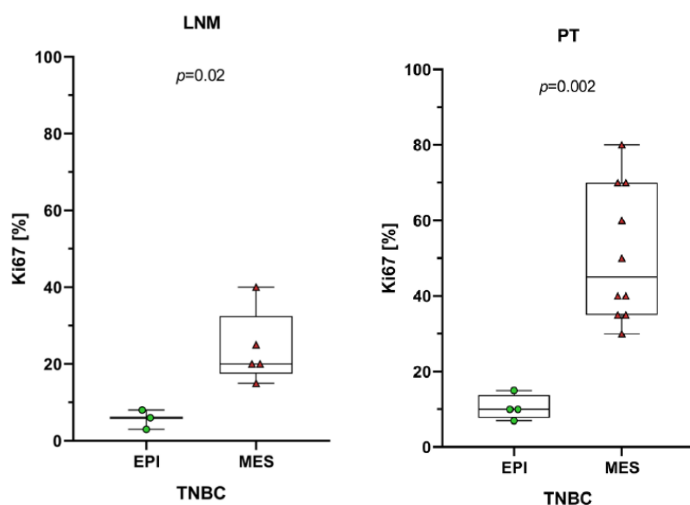
Ponadto, porównując fenotyp EMT sparowanych guzów pierwotnych (od chorych N+) z przerzutami do węzłów chłonnych, zaobserwowałam, że w guzach luminalnych rozbieżność fenotypów EMT (nazwana w pracy plastycznością EMT) pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutem dotyczyła 36% przypadków; w nowotworach TNBC nie zaobserwowano żadnych rozbieżności (brak plastyczności EMT) (**Rycina 7**). W przypadku raków luminalnych stopień mezenchymalności przerzutów do węzłów chłonnych obniżył się do poziomu obserwowanego w guzach pierwotnych w stadium N-. Sugeruje to, że guzy potrójnie ujemne są mniej plastyczne pod względem EMT, choć wyjściowo charakteryzują się większym stopniem mezenchymalności; natomiast guzy luminalne w sposób bardziej dynamiczny i zależny także od lokalizacji są w stanie włączyć bądź wyłączyć proces EMT.



Rycina 7. Plastyczność fenotypu epitelialno-mezenchymalnego pomiędzy sparowanymi guzami pierwotnymi a przerzutami do węzła chłonnego u chorych z rakiem piersi o podtypie luminalnym i potrójnie ujemnym (TNBC).

Kolejną ważną obserwacją było odkrycie związku pomiędzy tempem podziałów komórkowych (oznaczanych poprzez barwienie Ki-67) a fenotypem EMT (**Rycina 8**). W guzach i przerzutach TNBC z aktywacją EMT (mających fenotyp mezenchymalny) zaobserwowano wzrost odsetka komórek dzielących się (45% w guzach i 20% w przerzutach) w porównaniu do raków bez aktywacji EMT (mających fenotyp epitelialny). Dotychczas uważano, że to epitelialny fenotyp jest bardziej proliferującym, natomiast fenotyp mezenchymalny związany jest z obniżeniem proliferacji i natężeniem migracji

komórek nowotworowych. Wyniki opisane w niniejszej publikacji pokazują, że w przypadku raków TNBC ta zależność nie jest zachowana.



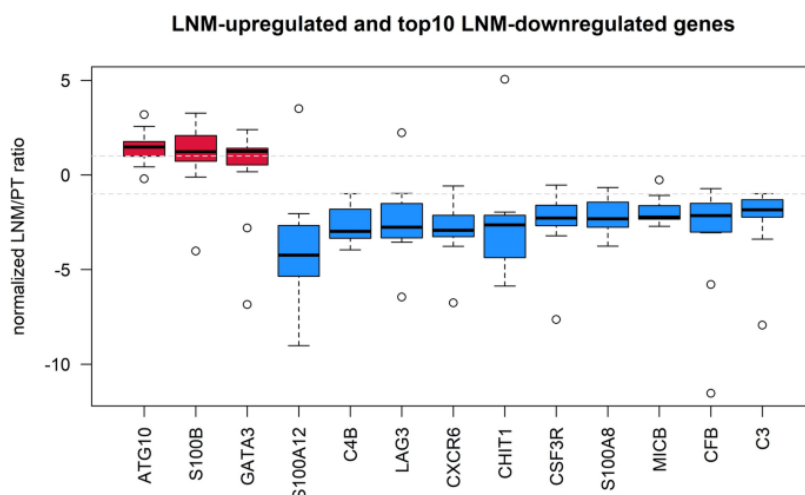
Rycina 8. Tempo podziałów komórek nowotworowych wg. indeksu Ki-67 ocenianego w guzach pierwotnych (PT) i przerzutach do węzłów chłonnych (LNM) od chorych z potrójnie ujemnym rakiem piersi (TNBC).

W obecnie prowadzonych badaniach na modelu mysim raka piersi TNBC analizowana jest możliwość odwracania fenotypu mezenchymalnego poprzez stosowanie inhibitorów podawanych dootrzewnowo (projekt SONATA NCN 2016/21/D/NZ3/02629, którego jestem kierownikiem).

Publikacja 5

Popeda M, **Markiewicz A**, Stokowy T, Szade J, Niemira M, Kretowski A, Bednarz-Knoll N, Zaczek AJ. Reduced expression of innate immunity-related genes in lymph node metastases of luminal breast cancer patients. *Scientific Reports*, 11, 5097, 2021

Wyniki przedstawione w **Publikacji 4** pokazały, że w przypadku raków luminalnych, w przerzutach do węzłów chłonnych obserwuje się zmniejszenie stopnia aktywacji EMT w porównaniu do sparowanych guzów pierwotnych. Ponieważ mikrośrodowisko gruczołu piersiowego i węzła chłonnego znacznie się od siebie różni, zmiany fenotypu EMT mogą również wynikać z różnego wpływu mikrośrodowiska. W związku z tym, że węzeł chłonny to struktura limfatyczna bogata w komórki układu odpornościowego w **Publikacji 5** profilowany był immunotranskryptom – panel 730 genów ocenianych technologią NanoString (nCounter PanCancer Immune Profiling Panel). Wyniki analizy ekspresji genów w przerzutach do węzłów chłonnych i sparowanych guzach pierwotnych były dodatkowo normalizowane w stosunku do poziomu ekspresji genów w zdrowym gruczole piersiowym i niezajętym węźle chłonnym, co pozwoliło dokładniej ocenić zmiany ekspresji genów pomiędzy kompartmentami. Wyniki pokazały, że w przerzutach do węzłów chłonnych dochodzi do obniżenia ekspresji genów związanych z układem dopełniacza (np. geny C4B, CFB, C3, **Rycina 9**).



Rycina 9. Geny ulegające różnicowej ekspresji pomiędzy sparowanymi guzami pierwotnymi a przerzutami do węzłów chłonnych (znormalizowane w stosunku do ekspresji genów w zdrowej piersi i niezajętym węźle chłonnym). Geny nadeksprymowane (kolor czerwony) i ulegające obniżonej ekspresji (kolor niebieski) w przerzucie do węzła chłonnego w stosunku do guza pierwotnego.

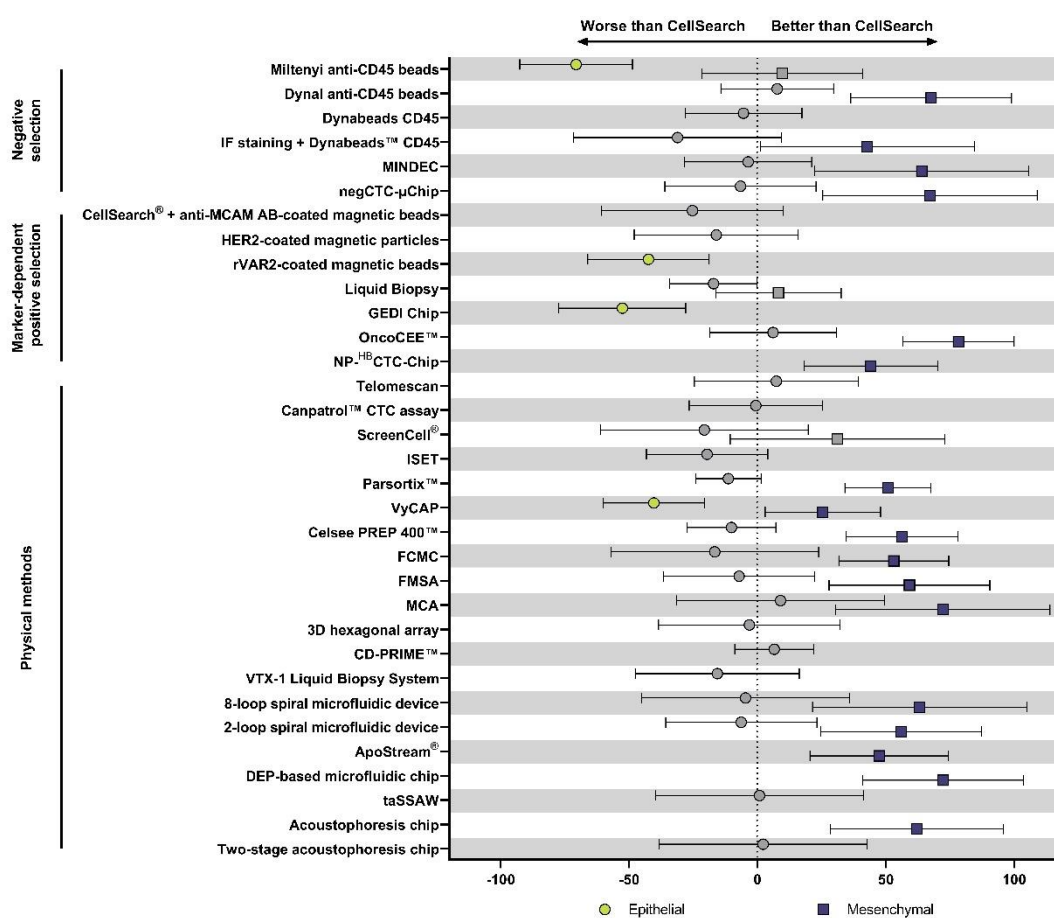
Klasycznie, układ dopełniacza stanowi część wrodzonego układu odpornościowego, ale jego rola w progresji nowotworów może być różna, pro- lub antynowotworowa¹⁵. I tak białka układu dopełniacza mogą rozluźniać ścisłe połączenia pomiędzy komórkami nabłonka¹⁶ umożliwiając przejście komórek układu odpornościowego do miejsca infekcji. To zależne od dopełniacza rozluźnienie połączeń między komórkami epitelialnym może przyczyniać się także do podwyższonej zdolności do migracji komórek nowotworowych¹⁷. W raku jajnika pokazane zostało, że czynnik transkrypcyjny indukujący EMT, TWIST1, może stymulować ekspresję genu C3 układu dopełniacza w komórkach nowotworowych, a samo białko C3 może także obniżyć ekspresję E-kadheryny (jednego z głównych markerów EMT)¹⁷. Zatem biorąc pod uwagę fakt, że w rakach luminalnych, które wykształciły przerzuty do węzłów chłonnych (stadium N+) ekspresja składników układu dopełniacza jest wyższa w guzie pierwotnym (**Publikacja 5**) i że guzy pierwotne mają mniejszy stopień epitelialności niż przerzuty do węzłów chłonnych (wyniki z **Publikacji 4, Rycina 6**), można przypuszczać, że układ dopełniacz (możliwie aktywowany przez same komórki nowotworowe) wpływa na fenotyp epitelialno-mezenchymalny komórek raka piersi w guzie pierwotnym. Wynik ten wskazuje na złożoność ścieżek indukcji EMT, a także pokazuje nowe kierunki badawcze wykorzystujące inhibitory np. białka C3 do modulowania aktywacji EMT w raku piersi.

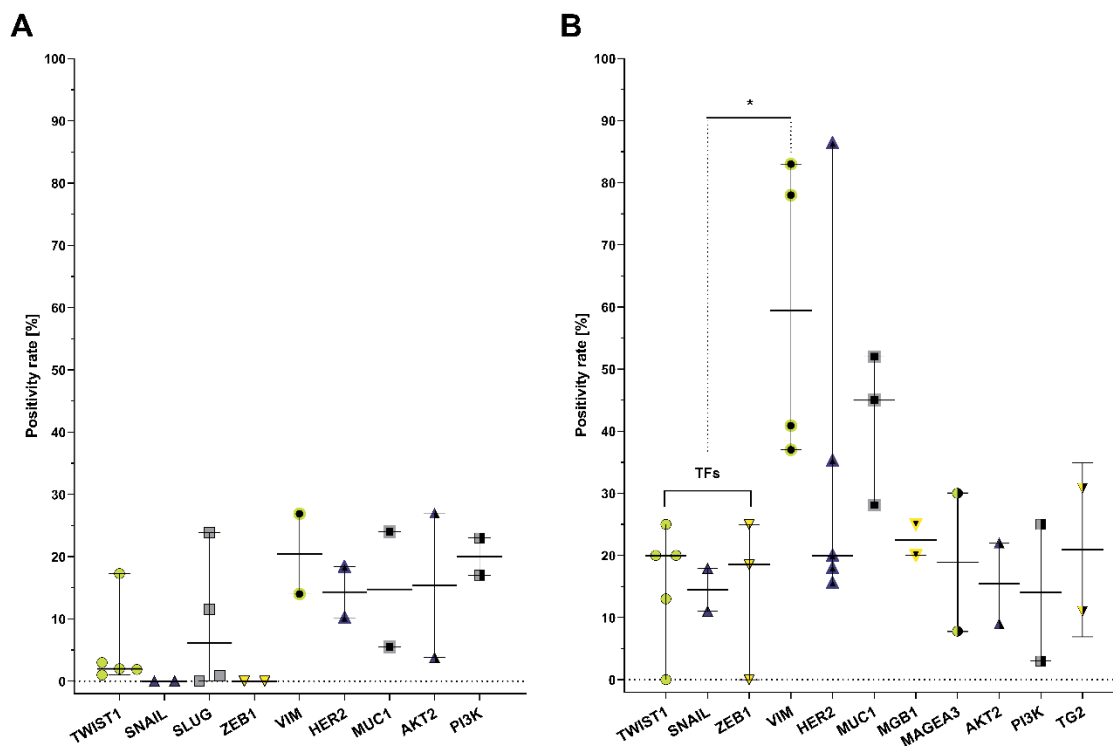
Publikacja 6

Topa J, Grešner P, Żaczek AJ, **Markiewicz A.** *Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features—an unreachable target?* Cellular and Molecular Life Sciences 79 (2), 2022.

Mimo, że **Publikacja 6** jest pracą przeglądową, to zebrane w niej dane pozwoliły na wykonanie i zaprezentowanie analiz statystycznych i wyciągnięcie dodatkowych wniosków na temat metod i markerów do izolacji oraz detekcji CTCs o różnym fenotypie epitelialnym i mezenchymalnym. Zebrane zostały dane z 41 prac oryginalnych testujących stopień odzysku komórek nowotworowych w układach modelowych (tzw. testy typu „spike-in”, jakimi są linie komórkowe dodane do próbek krwi) oraz 31 prac oryginalnych przedstawiających wyniki izolacji CTCs od chorych na raka piersi.

Od kiedy zintensyfikowano badania nad procesem EMT w kontekście rozszewu nowotworu i możliwych zmiany fenotypu CTCs, powstało wiele nowych metod do izolacji i detekcji CTCs. Metody te są oceniane pod kątem stopnia odzysku komórek nowotworowych o fenotypie epitelialnym i mezenchymalnym z próbek krwi (symulacja próbki krwi zawierającej CTCs, są to doświadczenie tzw. „spike-in”). W doświadczeniach typu „spike-in” sprawdza się ile komórek rakowych dodanych do próbki krwi udało się odzyskać z wykorzystaniem danej metody, co pozwala ocenić skuteczność tej metody do izolacji CTCs. Oryginalnym podejściem w tej pracy było wykorzystanie sygnatury wielogenowej EMT opartej o profilowanie transkryptomyczne linii komórkowych raka piersi do określenie stopnia epitelialności/mezenchymalności (EMT score¹⁸) tych linii. Dzięki temu można było określić jak w doświadczeniach typu „spike-in” dana metoda izoluje komórki nowotworowe w zależności od ich stopnia epitelialności/mezenchymalności. W przypadku analiz typu „spike-in” z literatury wybierane były możliwie takie metody izolacji, które testowały zarówno odzysk komórek epitelialnych jak i mezenchymalnych, aby można było porównać stopień odzysku obydwu fenotypów. Jako metodę referencyjną wybrałam CellSearch, jedyną zatwierdzoną przez FDA metodą izolacji CTCs. Wyniki pokazały, że to właśnie CellSearch w najgorszym stopniu izoluje CTCs o fenotypie mezenchymalnym (stopień odzysku około 25%, a dla komórek epitelialnych blisko 90%). Analiza zestawiająca wyniki 32 metod do izolacji CTCs pokazała, że większość przeanalizowanych metod lepiej niż CellSearch izoluje mezenchymalne CTCs, ale nie różni się w sposób istotny statystycznie w izolacji epitelialnych CTCs; wyjątek stanowiły tu metody Miltenyi anti-CD45 beads, rVAR2-coated beads, GEDI chip i VyCAP, które izolowały epitelialne CTCs z mniejszą wydajnością (**Rycina 10**).





Rycina 12. Procent pozytywności pod względem obecności CTCs wykrywanych z wykorzystaniem różnych markerów. * = 0.049.

Ponieważ różne markery były stosowane w połączeniu z różnymi metodami selekcji trudno jest dokładnie ocenić indywidualny wpływ metody selekcji i markera detekcji na obserwowany stopień pozytywności próbek. Wykorzystując metodę regresji najmniejszych kwadratów (ang. *partial least square*, PLS), która ocenia procent pozytywności CTCs u pacjentów jako funkcję markera detekcji i metody selekcji CTCs, obliczony został współczynnik regresji (β) pozwalający na ilościową ocenę wpływu (lub jego braku) markera i metody izolacji CTCs na możliwość wykrycia CTCs (% pozytywności próbek z CTCs). Analiza została wykonana osobno dla pacjentów w stadium M0 i M1. Jako metodę referencyjną wybrałam negatywną selekcję a jako marker referencyjny SNAIL ze względu na ich najniższy procent pozytywności w grupie M0. Analiza pokazała że w przypadku chorych w stadium M0 pozytywna epitelialna selekcja skutkowała wyższym procentem pozytywności a PI3K był statystycznie lepszym markerem do detekcji CTCs. W przypadku chorych ze stadium M1, wimentyna (VIM) była istotnie lepsza niż czynnik transkrypcyjny SNAIL. Co ciekawe czynniki transkrypcyjne EMT są najczęściej stosowanymi markerami do detekcji EMT w CTCs; dzięki przeprowadzonej analizie pokazałam, że to właśnie te czynniki mogą być najmniej czułe przy detekcji CTCs o fenotypie mezenchymalnym.

Podsumowując, w **Publikacji 6** pokazałam jakie metody mogą być najbardziej skuteczne do izolacji zarówno epitelialnych jak i mezenchymalnych CTCs (na podstawie testów typu „spike-in”), większość z nich nie była jednak wykorzystywana do analizy próbek klinicznych od chorych na raka piersi. Testami typu „spike-in” nie można także zaadresować użyteczności indywidualnych markerów do izolacji CTCs od chorych. Dlatego analiza próbek klinicznych dotyczyła także markerów wykorzystywanych do detekcji CTCs – w tym przypadku najmniej skuteczne wydają się być czynniki transkrypcyjne indukujące EMT (zwłaszcza SNAIL w grupie M1), najbardziej czułe natomiast wimentyna (w grupie M1).

4.3.3. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane wyniki i wnioski wyciągnięte z prac wchodzących w skład cyklu stanowiącego osiągnięcie habilitacyjne pozwalają na wyszczególnienie najważniejszych osiągnięć odpowiadających celom:

1. Przedstawienie, że aktywacja procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) jest wykrywana w krążących komórkach nowotworowych (ang. *circulating tumour cells*, CTCs) i może być związana z nabywaniem dodatkowych cech przez komórki nowotworowe, jak np. fenotyp macierzysty, oporność na działanie chemioterapeutyków, ucieczka spod kontroli układu odpornościowego.

2a. Wykazanie, że aktywacja procesu EMT w próbkach klinicznych od chorych na raka piersi w stadium nieprzerzutowym jest wykrywana na wszystkich ocenianych etapach kaskady metastatycznej – w guzach pierwotnych, przerzutach do regionalnych węzłów chłonnych i CTCs. Dodatkowo, fenotyp mezenchymalny związany jest z podwyższoną ekspresją markerów komórek macierzystych w guzach pierwotnych, przerzutach do węzłów chłonnych oraz CTCs.

2b. Wykazanie, że wartość rokownicza związana z wykrywaniem markerów EMT jest najwyższa w przypadku analizy CTCs. Obecność CTCs wykazujących fenotyp mezenchymalny była związana z podwyższonym ryzykiem zajęcia węzłów chłonnych i krótszym całkowitym przeżyciem chorych.

3. Dowiedzenie, że fenotyp epitelialno-mezenchymalny CTCs wykrywany przy pomocy panelu markerów (cytokeratyny 19, EpCAM, wimentyna, N-kadheryna, plastyna 3) jest związany z podwyższonym ryzykiem zajęcia węzłów chłonnych, ale nie obniżonym całkowitym przeżyciem chorych (jak to ma miejsce w przypadku fenotypu mezenchymalnego CTC).

4. Dowiedzenie, że aktywacja EMT może być zależna od podtypu molekularnego raka piersi (wyższy w guzach potrójnie ujemnych) a także od stopnia zaawansowania choroby (guzy luminalne u chorych z zajętej węzłami chłonnymi aktywują EMT z podobną częstością jak należące do podtypu molekularnego guzy potrójnie ujemne). Ponadto, wykazano, że zdolność do aktywacji i podtrzymania EMT może być różna w różnych podtypach molekularnych – raki potrójnie ujemne są mniej plastyczne pod kątem zmian w statusie EMT w porównaniu do raków luminalnych, które mogą bardziej dynamicznie zmieniać status EMT. W przypadku raków potrójnie ujemnych aktywacja EMT wiąże się także z wyższym tempem podziałów komórek nowotworowych (w guzie pierwotnym i przerzucie do węzła chłonnego). Pokazuje to dalsze funkcjonalne konsekwencje wynikające z nabycia fenotypu mezenchymalnego przez komórki nowotworowe na różnych etapach kaskady metastatycznej.

5. Wykazanie, że w podtypie luminalnym raka piersi, w przerzutach do węzłów chłonnych jest obniżona ekspresja genów układu dopełniacza (w stosunku do guzów pierwotnych). Ponieważ guzy pierwotne o podtypie luminalnym mają wyższy stopień aktywacji EMT niż przerzuty do węzłów chłonnych sugeruje to możliwą rolę układu dopełniacza w regulacji procesu EMT w komórkach guza pierwotnego.

6a. Udowodnienie, że w modelach symulujących izolację CTCs z próbek klinicznych metody fizyczne mają najwyższy współczynnik odzysku CTCs, zarówno o fenotypie epitelialnym jak i mezenchymalnym.

6b. Udowodnienie, że czynniki transkrypcyjne indukujące EMT - TWIST1, SNAIL, ZEB1 są mniej czułymi markerami do detekcji mezenchymalnych CTCs niż wimentyna. Dotyczyło to zwłaszcza chorych na raka piersi w stadium przerzutowym.

Wyniki badań opisanych w osiągnięciu habilitacyjnym stanowiły podstawę do planowania prac doświadczalnych w prowadzonych grantach SONATA 11 i OPUS-LAP, których celem jest m.in. lepsze zrozumienie konsekwencji aktywacji procesu przemiany epithelialno-mezenchymalnej w raku piersi i wykorzystanie tych informacji do prognozowania przebiegu oraz leczenia raka piersi.

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

Badania naukowe prowadzone przeze mnie w zagranicznej instytucji naukowej

a) dwa pobyty naukowe w Zakładzie Medycyny Eksperymentalnej i Procedur Terapeutycznych na Uniwersytecie w Ratyzbnie (Niemcy) dotyczące analizy progresji czerniaka z wykorzystaniem technologii opartych o analizy pojedynczych komórek. Mój udział w badaniach zaowocował opublikowaniem dwóch prac:

[Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma.](#)

Werner-Klein M, Scheitler S, Hoffmann M, Hodak I, Dietz K, Lehnert P, Naimer V, Polzer B, Treitschke S, Werno C, **Markiewicz A**, Weidele K, Czyz Z, Hohenleutner U, Hafner C, Haferkamp S, Berneburg M, Rümmele P, Ulmer A & Klein CA

Nature Communications, Vol 9: 595 (2018); DOI: [10.1038/s41467-017-02674-y](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02674-y)

IF=11.878; Pkt. MEiN=45

[Microfluidic enrichment, isolation and characterization of disseminated melanoma cells from lymph node samples.](#)

Weidele K, Stojanović N, Feliciello G, **Markiewicz A**, Scheitler S, Alberter B, Renner P, Haferkamp S, Klein CA, Polzer B

International Journal of Cancer, 145, 232–241, 2019 <https://doi.org/10.1002/ijc.32092> ;

IF=5,145; Pkt. MEiN=140

Kolejny manuskrypt jest w recenzji w czasopiśmie Nature (numer submisji: 2022-08-13717).

Badania naukowe prowadzone przeze mnie przy współpracy z innymi (w tym zagranicznymi) instytucjami naukowymi

b) projekt OPUS-LAP (program polsko-niemieckiej bilateralnej współpracy pomiędzy Narodowym Centrum Nauki i niemieckim Deutsche Forschungsgemeinschaft) prowadzony przy współpracy z dr Zbigniewem Czyżem i prof. Christophem Kleinem z Zakładu Medycyny Eksperymentalnej i Procedur Terapeutycznych na Uniwersytecie w Ratyzbnie (Niemcy). W ramach tego projektu badamy progresję agresywnych podtypów raka piersi w trakcie leczenia chirurgicznego i systemowego w oparciu o analizy genomowe pojedynczych CTCs i wolnego krążącego DNA nowotworowego (ang. *circulating tumour*

DNA; ctDNA) z wykorzystaniem optymalizowanej do zastosowania w pojedynczych komórkach metodologii MSK-IMPACT oraz głębokiego sekwencjonowania.

Grant badawczy OPUS-LAP pt. „Genomiczne profilowanie krążących markerów i sparowanych guzów pierwotnych od chorych na raka piersi” (2020/39/I/NZ5/03434) na lata 2022-2025, którego jestem kierownikiem po stronie polskiej.

c) współpraca z dr Mohitem Kumar Jolly z Indian Institute of Science (najlepszej uczelni w Indiach) oraz z dr Michałem Bieńkowskim z Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dotycząca analizy heterogenności EMT w podtypach molekularnych raka piersi. Wyniki pierwszych analiz przedstawiłam na konferencji EMBO „Defining and defeating metastasis”, 19-22.06.2022, Heidelberg, Niemcy:

1. Bulk transcription-based EMT signatures suffer from stromal interference and mask the subtype-specific patterns of EMT program in breast cancer

Bieńkowski M, Popeda M, Pillai M, Chakraborty P, Kumar Jolly M, Myszczyński K, Artichowicz W, Jungnickel C, **Markiewicz A**

2. EMT plasticity during luminal and triple-negative breast cancer dissemination with EMT-related changes in proliferation rate and stromal composition

Popeda M, Bieńkowski M, Topa J, Chakraborty P, Kumar Jolly M, Szade J, Skokowski J, Weñicka-Jaśkiewicz M, Żaczek AJ, **Markiewicz A**

oraz na konferencji EACR “The invisible phase of metastasis”, 6-7.12.2022, on-line:

Stromal content is the main confounder in the breast cancer molecular subtype-specific epithelial-mesenchymal transition program.

Bieńkowski M, Popeda M, Pillai M, Chakraborty P, Kumar Jolly M, Myszczyński K, Artichowicz W, Jungnickel C, **Markiewicz A**

d) współpraca z prof. Jian Liu z Institute of Functional Nano & Soft Materials (FUNSOM), Soochow University, Chiny. W przygotowanym wniosku grantowym (NCBiR – WPC/33/HESCAP/2018 – „Highly efficient enrichment, single-cell analysis and drug screening of single circulating tumour cells for personalized medicine” kierowanym przez prof. Annę Żaczek) jestem koordynatorem 2 z 5 pakietów pracy związanych z transkryptomicznym profilowaniem krążących komórek nowotworowych od chorych na raka piersi w celu wyłonienia nowych celów molekularnych w leczeniu raka piersi (w stadium nieprzerzutowym i przerzutowym) w oparciu o krążące komórki nowotworowe. W trakcie prowadzonych działań walidowana była także metoda izolacji krążących komórek nowotworowych z wykorzystaniem technologii immunogenetycznej i metody filtracji do izolacji CTCs z próbek krwi opracowana przez partnera z Chin. Ze względu na perspektywny charakter badań i konieczność ciągłego zbierania materiału od chorych publikacje naukowe są dopiero w przygotowaniu. Jeden z manuskryptów będący efektem współpracy został wysłany do recenzji do czasopisma *Small Methods*:

Single-cell enzymatic screening for epithelial mesenchymal transition with an ultrasensitive superwetting droplet-array microchip. Liu J, Xiao X; Miao X, Liu S, Duan S, Cao Q, Wu R, Tao C, Zhao J, Qu Q; **Markiewicz A**, Peng R, Chen Y, Zaczek A

e) współpraca z dr hab. inż. Tomaszem Stokowym (Department of Clinical Science, University of Bergen, Norwegia) z którym wspólnie pracowałam nad wykorzystaniem odpowiednich narzędzi statystycznych do optymalnej analizy oceny heterogenności nowotworów oraz różnych subpopulacji

krążących komórek nowotworowych wyizolowanych od chorych na raka piersi. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch pracach, które weszły w skład cyklu habilitacyjnego:

Aggressive phenotype of cells disseminated via hematogenous and lymphatic route in breast cancer patients. **Markiewicz A**, Nagel A, Szade J, Majewska H, Skokowski J, Seroczyńska B, Stokowy T, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ. *Translational Oncology*, Vol 11 (3), 2018

IF=3,138; Pkt. MEiN=30

Spectrum of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in circulating tumour cells from early breast cancer patients. **Markiewicz A**, Topa J, Nagel A, Skokowski J, Seroczynska B, Stokowy T, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ. *Cancers* 11 (1), 59, 2019

IF=6,126; Pkt. MEiN=140

f) współpraca z dr Marcinem Braunem z Zakładu Patologii Uniwersytetu Medycznego dotycząca zastosowania krążących komórek nowotworowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych. Wspólnie napisaliśmy pracę przeglądową w której opisaliśmy znacznie molekularnego profilowania/subtypowania krążących komórek u chorych na raka piersi.

Profiling of Invasive Breast Carcinoma Circulating Tumour Cells—Are We Ready for the ‘Liquid’ Revolution? Braun M[#], **Markiewicz A**^{*#}, Kordek R, Sądej R, Romańska H*.

Cancers 11 (2), 143, 2019

*autor korespondencyjny

#równy wkład autorów

IF= 6,126; Pkt. MEiN=140

g) współpraca z prof. Natalią Marek-Trzonkowską z Międzynarodowego Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi Uniwersytetu Gdańskiego dotycząca wpływu aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej na interakcję nowotworów z układem odpornościowym oraz wpływ induktorów przemiany epitelialno-mezenchymalnej na remodelowanie niszy nowotworu.

Autoimmunity and cancer—two sides of the same coin. Justyna Sakowska, Łukasz Arcimowicz, Martyna Sakowska J, Arcimowicz Ł, Jankowiak M, Papak I, **Markiewicz A**, Dziubek K, Kurkowiak M, Kote S, Kaźmierczak-Siedlecka K, Połom K, Marek-Trzonkowska N, Trzonkowski P.

Frontiers in Immunology, 2022 May 13;13:793234. doi: 10.3389/fimmu.2022.793234. eCollection 2022.

IF=8,787; Pkt. MEiN=140

h) współpraca z dr hab. inż. Christianem Jungnickel z Katedry Technologii Kolidów i Lipidów Politechniki Gdańskiej dotycząca analiz statystycznych danych medycznych w kontekście możliwości wykorzystania kwasów żółciowych do diagnostyki zaburzeń w funkcjonowaniu dróg żółciowych.

Importance of Bile Composition for Diagnosis of Biliary Obstructions. Krupa Ł, Staroń R, Dulko D, Łozińska N, Mackie AR, Rigby NM, Macierzanka A, **Markiewicz A**, Jungnickel C.

Molecules 2021, 26(23), 7279; <https://doi.org/10.3390/molecules26237279>

IF=4,927; Pkt. MEiN=140

i) współpraca z dr Mariolą Iliszko z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dotycząca oceny liczby kopii genu *ESR1* oznaczonej techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w archiwalnych skrawkach guzów pierwotnych od chorych na raka piersi. Współpraca w ramach prowadzonego przeze mnie grantu („Amplifikacja genu i pozajądrowa forma

receptora estrogenowego w raku piersi – znaczenie kliniczne i biologiczne”; MNiSW IP 2014 028473).
Wyniki badań zostały opublikowane w pracy:

Clinical and biological significance of ESR1 gene alteration and estrogen receptors isoforms expression in breast cancer patients. Nagel A, Szade J, Iliszko M, Elzanowska J, Welnicka-Jaskiewicz M, Skokowski J, Stasiłojc G, Bigda J, Sadej R, Zaczek A, **Markiewicz A***

International Journal of Molecular Sciences 20 (8), 1881, 2019

*Autor korespondencyjny

IF=4,556; Pkt. MEiN=140

j) współpraca z dr Jeleną Zurkovic z grupy prof. Christopha Thiele z LIMES-Institute na Uniwersytecie w Bonn (Niemcy) dotycząca badań nad procesem aktywacji procesu przemiany epitelialno-mezenchymalnej w mysim modelu raka piersi (w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2016/21/D/NZ3/02629). W ramach współpracy obecnie badane są zmiany lipidomu u myszy traktowanych systemowym inhibitorem przemiany epitelialno-mezenchymalnej.

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

A. Osiągnięcia dydaktyczne

1. Przedmioty nauczane w ramach pensum dydaktycznego

Od czasu zatrudnienia na stanowisku adiunkta w Zakładzie Onkologii Translacyjnej byłam zaangażowana w przygotowanie materiałów dydaktycznych i prowadziłam na Wydziale Lekarskim, kierunku Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przedmiot **Biologia Molekularna** (w j. polskim) i **Molecular Biology** (dla studentów w języku angielskim). Na kierunku Biotechnologia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii od 2017 roku prowadzę autorski przedmiot **Introduction to Experimental Medicine** (dla studentów II roku studiów II stopnia (magisterskich)).

Przed zatrudnieniem na stanowisku adiunkta prowadziłam przedmiot **Biologia komórki** dla studentów I roku studiów licencjackich na kierunku Biotechnologia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed oraz opisane powyżej przedmioty **Biologia Molekularna** (w j. polskim) i **Molecular Biology** (dla studentów w języku angielskim) na kierunku Lekarskim na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

2. Opieka nad dyplomantami oraz kształcenie kadr:

Promotor pomocniczy dwóch przewodów doktorskich:

- zakończony (obrona z wyróżnieniem w 2022 r.) – **dr Anna Nagel**, tytuł pracy doktorskiej „Wpływ mikrośrodowiska guza na komórki nowotworowe raka piersi w kontekście zmian w obrębie receptora estrogenowego” – praca w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne
- w trakcie (planowana obrona pod koniec 2023 r.) – **mgr Justyna Topa**, tytuł pracy doktorskiej „Kliniczne i biologiczne znaczenie krążących komórek nowotworowych o różnych fenotypach epitelialno-mezenchymalnych u chorych na raka piersi”.

Ponadto, pod moją opieką są dwie doktorantki w Międzyuczelnianej Szkole Doktorskiej Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

- mgr Agnieszka Stankiewicz, 2 rok studiów doktoranckich, u której zostałam powołana na promotora pomocniczego w dniu 26.05.2022 r. przez Radę Dyscypliny
- mgr Zuzanna Kulik, 1 rok studiów doktoranckich, która złożyła wniosek do Rady Dyscypliny o powołanie mnie na promotora pomocniczego

Opiekun 4 prac magisterskich na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed:

- Magdalena Śliwińska (2022)
- Agata Leśniewska (2022)
- Wiktoria Martysiewicz (2021)
- Julia Smentoch (2018)

Opiekun 4 prac licencjackich na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed:

- Agnieszka Bąk (2021)
- Anna Humięcka (2019)
- Natalia Musiał (2018)
- Agata Leśniewska (2018)

Obecnie pod moją opieką jest jedna studentka (Aniela Kosobucka, 3 rok studiów licencjackich).

Opiekun projektów naukowych wykonywanych przez studentów:

- Markus Fleischmann (2016), "Establishment of a qPCR Assay to validate Microarray Gene Expression Data" - Internship at the Chair of Experimental Medicine and Therapy Research, University Hospital Regensburg.

Recenzent 4 prac magisterskich:

- Mikołaj Klimczuk (2022) na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed
- Paulina Jurkowska (2022) na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed
- Jonanna Chorzępa (2020) na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed
- Justyna Łuczak (2018) na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed

B. Osiągnięcia organizacyjne:

- Członkini Zespołu ds. Strategii Rozwoju Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed na lata 2022-2028,
- Członkini Rady Wydziału Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed na lata 2020-2024,
- **Członkini Rady Młodych Naukowców VI kadencji na okres 1.03.2018-1.03.2020 r. (wraz z przedłużeniem do 31.12.2020)** – organu doradczego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego,
- Członkini komitetu organizacyjnego konferencji „51st Meeting of the Polish Biochemical Society /3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018”, 18-21.09.2019, Gdańsk,
- Organizacja spotkania i udział w panelu dyskusyjnym w ramach spotkania “Współpraca Międzynarodowa w Biologii Molekularnej”, Gdańsk, 14.06.2019. Wydarzenie organizowane przez

- Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Europejską Konferencję Biologii Molekularnej (EMBC)
- Mentor w Programie „Poszerzamy Horyzonty” organizowanym przez Centrum Informacji i Planowania Kariery Zawodowej WUP w Gdańsk oraz Biuro Karier Uniwersytetu Gdańskiego, 2016-2017, Gdańsk

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

- Przewodniczenie jednej sesji naukowej (Cancer Biology) w ramach międzynarodowej konferencji „ScanBalt Forum”, która w roku 2019 była zorientowana na biologię molekularną i immunologię nowotworów; 24-25.09.2019, Gdańsk, Polska
<https://scanbalt.org/scanbalt-news/molecular-biology-and-immunology-of-cancer-r-d-perspectives-scanbalt-forum-2019-gdansk/>
- Polska Agencja Prasowa – Nauka w Polsce – „Badania pomogą w ustalaniu skuteczniejszej terapii chorych na raka piersi”, 18.12.2021
<https://naukawpolsce.pl/aktualnosci/news%2C90603%2Cbadania-pomoga-w-ustalaniu-skuteczniejszej-terapii-chorych-na-raka-piersi>
- Medycyna Praktyczna – „1 na 25 milionów”, 30.08.2021
<https://www.mp.pl/pacjent/onkologia/wywiady/278366,jedna-na-25-mln>
- Program Nauka to Ludzie - materiał informujący o prowadzonych przez mnie badaniach naukowych
<https://naukatoludzie.gumed.edu.pl/analiza-krazacych-komorek-nowotworowych/>
- Gazeta Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego NR 2 (362), LUTY 2021 , ISSN 2657-4640; wywiad „Fascynuje mnie to, co niewiadome”
https://gazeta.gumed.edu.pl/attachment/attachment/74707/GazetaGUMed_2021_luty.pdf
- „Co to jest komórka i gdzie żyje?” – 26.10.2022, organizacja i prowadzenie warsztatów oraz pokazu naukowego dla grup przedszkolnych, Gdańsk

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**Stypendia naukowe:**

- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców, 2021-2024
- Stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, 21.05.2016 r, Warszawa, Polska
- Stypendium „L’Oréal dla Kobiet i Nauki” we współpracy między L’Oreal Polska, Polskim Komitetem ds. Unesco oraz Ministerstwem Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 28.11.2014 r, Warszawa
- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2012/2013, 7.12.2012 r, Warszawa,
- Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2011/2012, 2012/2013 i 2013/2014 – Uniwersytet Gdański, Gdańsk,
- Stypendium naukowe na rok akademicki 2010/2011, 2011/2012 i 2013/2014 – Uniwersytet Gdański, Gdańsk,
- Stypendium Marszałka Województwa Pomorskiego „Innodoktorant”, grudzień 2010 r, Gdańsk, Polska

Nagrody:

- Nagroda Komitetu Biotechnologii PAN im. Profesora Waława Szybalskiego, grudzień 2020 r.
- Nagroda specjalna rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za publikację naukową, 2022 r.
- Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad markerami prognostycznymi związanymi z fenotypem macierzystym i mezenchymalnym w raku piersi, 15.12.2016 r.
- Nagroda zespołowa II stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad znaczeniem klinicznym amplifikacji wybranych genów w raku piersi, 16.12.2014 r, Gdańsk
- Nagroda zespołowa III stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad znaczeniem rokowniczym markerów molekularnych w raku piersi, 13.12.2013 r, Gdańsk
- Nagroda indywidualna Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2011/2012, III stopnia, 18.12.2012 r, Gdańsk,

Nagrody konferencyjne:

- Stypendium konferencyjne na udział w 17th European Cancer Congress, przyznane przez European Society for Medical Oncology (ESMO), 27.09-1.10.2013 r, Amsterdam, Holandia
- Nagroda Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej za wystąpienie ustne na XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, 29-31.08.2013 r, Sopot
- Laureatka konkursu na najlepszą prezentację wyników prac badawczych podczas Sesji Sprawozdawczej Studium Medycyny Molekularnej, październik 2010, Warszawa,
- Wyróżnienie plakatu naukowego na XIII Kongresie Naukowo-Edukacyjnym Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, 2-4.09.2010 r., Sopot,
- Bioinnovation International Summit 2017, 19-20.10.2018, Gdańsk – nagroda za najlepsze doniesienie ustne
- Stypendium fundacji Susan G Komen for the Cure na udział w konferencji IMPAKT 2010 i kursie dla młodych onkologów, 5.05.2010 r, Bruksela, Belgia

Szkolenia dydaktyczne:

- „Inspiring and Motivating Individuals” (14h) – University of Michigan, kurs on-line dostępny przez platformę Coursera, 2022
- „Applying design principles to schematic figures” (7h), kurs w formie zdalnej EMBO, 2021
- „Dydaktyka akademicka” 24.11.2014-15.12.2014, Kolegium Kształcenia Podyplomowego, Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzowanie manuskryptów naukowych:

Recenzowałam 24 manuskrypty naukowe dla czasopism międzynarodowych takich jak International Journal of Cancer, Clinical and Translational Medicine, Molecular and Cellular Biochemistry, Scientific Reports, Cancers, Cells, Molecular Cancer Therapeutics, Computational and Structural Biotechnology Journal, Frontiers in Cell and Developmental Biology oraz innych.

.....
(podpis wnioskodawcy)

Bibliografia:

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. Jan 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708
2. Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Hallmark in Metastasis Formation Linking Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells. *Pathobiology*. 2012;79(4):195-208. doi:10.1159/000337106
3. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. Aug 2004;351(8):781-91. doi:10.1056/NEJMoa040766
4. Bidard FC, Jacot W, Kiavue N, et al. Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. Jan 01 2021;7(1):34-41. doi:10.1001/jamaoncol.2020.5660
5. Braun M, Markiewicz A, Kordek R, Sądej R, Romańska H. Profiling of Invasive Breast Carcinoma Circulating Tumour Cells-Are We Ready for the 'Liquid' Revolution? *Cancers (Basel)*. Jan 25 2019;11(2)doi:10.3390/cancers11020143
6. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat*. 2017;40(7-8):404-408. doi:10.1159/000478018
7. Topa J, Grešner P, Zaczek AJ, Markiewicz A. Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features-an unreachable target? *Cell Mol Life Sci*. Jan 20 2022;79(2):81. doi:10.1007/s00018-021-04064-6
8. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. Nov 2009;139(5):871-90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
9. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. Nov 2001;414(6859):105-11. doi:10.1038/35102167
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 2003;100(7):3983-8. doi:0530291100 [pii] 10.1073/pnas.0530291100
11. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. May 2008;133(4):704-15. doi:S0092-8674(08)00444-3 [pii] 10.1016/j.cell.2008.03.027
12. Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *EMBO J*. Sep 15 2021;40(18):e108647. doi:10.15252/embj.2021108647
13. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *Cell*. Aug 28 2014;158(5):1110-22. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. Aug 2011;22(8):1736-47. doi:mdr304 [pii] 10.1093/annonc/mdr304
15. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*. Mar 01 2017;127(3):780-789. doi:10.1172/JCI90962
16. Conyers G, Milks L, Conklyn M, Showell H, Cramer E. A factor in serum lowers resistance and opens tight junctions of MDCK cells. *Am J Physiol*. Oct 1990;259(4 Pt 1):C577-85. doi:10.1152/ajpcell.1990.259.4.C577
17. Cho MS, Rupaimoole R, Choi HJ, et al. Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Immunol*. Feb 01 2016;196(3):1412-8. doi:10.4049/jimmunol.1501886

18. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med.* Oct 2014;6(10):1279-93. doi:10.15252/emmm.201404208