

AUTOREFERAT

dr n. med. Magdalena Ratajska

**„Pogłębiona charakterystyka dziedzicznego
raka piersi i jajnika w populacji polskiej”**

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

1. Imię i Nazwisko: Magdalena Ratajska
Nazwisko panieńskie: Perkowska

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

2010 – doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej; Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Częstość występowania i kosegregacja wybranych mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* w rodzinach z agregacją raka piersi” (rozprawa wyróżniona). Promotor: Prof. dr hab. med. Janusz Limon

2000 – magister biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Tytuł pracy: „Wpływ dietylenotriaminy (DETA) i nitroprusydku sodu (NaNP) na częstość wymian chromatyd siostrzanych w chromosomach i kinetykę podziałów limfocytów człowieka w hodowli *in vitro*”. Promotor: Prof. dr hab. med. Janusz Limon

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **od 01.07.2014:** adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- **01.08.2014 – 31.07.2015:** adiunkt w *Centre for Cell Therapy and Regenerative Medicine, University of Western Australia, Australia* (umowa na czas określony: 12 miesięcy)
- **09.03.2010 – 07.07.2013:** młodszy asystent w Laboratorium Genetyki Klinicznej, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne (0.45 etatu)
- **01.04.2004 – 30.06.2014:** specjalista w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- **01.10.2000 – 31.03.2004:** Studia Doktoranckie, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

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

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Pogłębiona charakterystyka dziedzicznego raka piersi i jajnika w populacji polskiej”

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem sześciu oryginalnych prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*, o łącznej punktacji:

IF: 19.438; MNiSW: 150

Wymienione prace powstały po uzyskaniu przeze mnie tytułu doktora.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

1. Ratajska M, Antoszevska E, Piskorz A, Brozek I, Borg A, Kusmierk H, Biernat W, Limon J. Cancer predisposing *BARD1* mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; vol. 131, nr 1, s. 89-97. DOI: 10.1007/s10549-011-1403-8

Punktacja IF (2012): 4,469; MNiSW: 35

Praca cytowana 38 razy wg *WoS*, 43 razy wg *Scopus*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu materiału wraz z danymi klinicznymi i histopatologicznymi (w tym na prowadzeniu stosownej bazy danych). Byłam także odpowiedzialna za dobór i optymalizację metodyki badań, planowanie doświadczeń i wykonanie części analiz na poziomie DNA i RNA (tabela 1, rycina 1, 2 and 4). Ponadto byłam zaangażowana w interpretację otrzymanych wyników. Odpowiadałam za napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na: 60%

2. Klonowska K, Ratajska M, Czubak K, Kuzniacka A, Brozek I, Koczowska M, Sniadecki M, Debniak J, Wydra D, Balut M, Stukan M, Zmienko A, Nowakowska B, Irminger-Finger I, Limon J, Kozłowski P. Analysis of large mutations in *BARD1* in patients with breast and/or ovarian cancer: the Polish population as an example. *Sci. Rep.* 2015; vol. 5, art. ID 10424, s. [1-7]. DOI: 10.1038/srep10424

Punktacja IF (2015): 5,228; MNiSW: 40

Praca cytowana 9 razy wg *WoS*, 10 razy wg *Scopus*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu i przygotowaniu badania. Ponadto byłam odpowiedzialna za zebranie materiału wraz z danymi klinicznymi, izolację DNA, koordynację materiału oraz przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na: 35%

3. Ratajska M, Matusiak M, Kuzniacka A, Wasąg B, Brozek I, Biernat W, Koczkowska M, Debniak J, Sniadecki M, Kozłowski P, Klonowska K, Pilyugin M, Wydra D, Laurent G, Limon J, Irminger-Finger I. Cancer predisposing *BARD1* mutations affect exon skipping and are associated with overexpression of specific *BARD1* isoforms. *Oncol. Rep.* 2015; vol. 34, nr 5, s. 2609-2617. DOI: 10.3892/or.2015.4235

Punktacja IF (2015): **2,486**; MNiSW: **20**

Praca cytowana **5** razy wg *WoS*, **5** razy wg *Scopus*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu materiału wraz z danymi klinicznymi i histopatologicznymi (w tym na prowadzeniu stosownej bazy danych – ryc.1). Byłam także odpowiedzialna za dobór i optymalizację metodyki badań, planowanie doświadczeń i wykonanie części analiz na poziomie RNA (tabela 1, rycina 2). Ponadto byłam zaangażowana w interpretację otrzymanych wyników. Odpowiadałam za napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na: 60%

4. Ratajska M, Krygier M, Stukan M, Kuźniacka A, Koczkowska M, Dudziak M, Śniadecki M, Dębniak J, Wydra D, Brozek I, Biernat W, Borg A, Limon J, Wasąg B. Mutational analysis of *BRCA1/2* in a group of 134 consecutive ovarian cancer patients: novel and recurrent *BRCA1/2* alterations detected by next generation sequencing. *J. Appl. Genet.* 2015; vol. 56, nr 2, s. 193-198. DOI: 10.1007/s13353-014-0254-5

Punktacja IF (2015): **1,929**; MNiSW: **20**

Praca cytowana **12** razy wg *WoS*, **12** razy wg *Scopus*

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu materiału wraz z danymi klinicznymi i histopatologicznymi (w tym na prowadzeniu stosownej bazy danych). Byłam także odpowiedzialna za dobór metodyki badań (wybór odpowiedniego zestawu do analizy mutacji w genach *BRCA1/2*), planowanie doświadczeń i wykonanie analizy mutacji z zastosowaniem techniki NGS oraz za interpretację otrzymanych wyników badań molekularnych (przedstawionych w tabeli 1). Ponadto byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%*

5. Ratajska M, Koczkowska M, Zuk M, Gorczyński A, Kuźniacka A, Stukan M, Biernat W, Limon J, Wasąg B. Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; vol. 8, nr 61, s. 101325-101332. DOI: 10.18632/oncotarget.20722

Punktacja IF (2017): **0** (5-letni IF: **5,415**); MNiSW: **35**

Praca cytowana **0** razy wg *WoS*, **4** razy wg *Scopus*

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, doborze pacjentów do badania, wykonaniu analizy mutacji z zastosowaniem techniki

sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz interpretacji otrzymanych wyników badań molekularnych, które zostały przedstawione szczegółowo w tabeli 1. Ponadto byłam zaangażowana w napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%

6. Koczkowska M, Krawczynska N, Stukan M, Kuzniacka A, Brozek I, Sniadecki M, Debniak J, Wydra D, Biernat W, Kozłowski P, Limon J, Wasag B, Ratajska M. Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers (Basel)*. 2018; vol. 10, nr 11, pii: E442. DOI: 10.3390/cancers10110442.

Punktacja IF (2018): **5,326**; MNiSW: **0**

praca dotychczas niecytowana

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badania, zaplanowaniu doświadczeń, doborze pacjentów do badania, wykonaniu analizy mutacji z zastosowaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz interpretacji otrzymanych wyników badań molekularnych, które zostały przedstawione szczegółowo w tabeli 1 i 2. Ponadto byłam zaangażowana w napisanie wstępnej wersji manuskryptu, edycję i nanoszenie poprawek, przygotowanie tabel (1 i 2), ryciny 3 oraz rycin i tabel z Supplementary data. Nadzorowałam także zbieranie materiału i wykonywanie doświadczeń przez innych współautorów. Mój udział procentowy szacuję na 50%

Oświadczenia współautorów publikacji określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w **załączniku nr 7**.

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

Wprowadzenie

Szacuje się, iż na skutek starzenia się ludzkości, liczba osób chorych na nowotwory będzie nadal wzrastać, a odsetek chorych podwoi się w ciągu następnych 50 lat¹. Ostatnie lata przyniosły rewolucyjne zmiany w naszym rozumieniu onkologii. Odkrycia te doprowadziły do powstania lepszej diagnostyki oraz stratyfikacji pacjentów (w oparciu o wyniki testów molekularnych), jak również do opracowania bardziej skutecznych metod leczenia, w tym terapii celowanych. Aby w pełni wykorzystać ten postęp technologiczny, konieczna jest realizacja kompleksowych projektów naukowych, które przyczynią się do jeszcze głębszego poznania zaburzeń molekularnych leżących u podłoża poszczególnych nowotworów.

Rak piersi jest chorobą złożoną, którą cechuje wysoki poziom zróżnicowania guzów oraz różna odpowiedź na leczenie. Heterogenność raków piersi jest ich cechą charakterystyczną, przy czym zjawisko to występuje zarówno w odniesieniu do różnych guzów jak również w obrębie jednego guza i wynika z kumulacji zmian genetycznych w czasie^{2,3}.

Analiza profilu ekspresji tych guzów umożliwiła wyodrębnienie pięciu podtypów molekularnych, w tym raków luminalnych A, luminalnych B, wykazujących nadekspresję genu dla receptora HER2 (tzw. raki HER2-dodatnie), raków naśladujących nabłonek prawidłowego gruczołu piersiowego (ang. *normal-like tumors*) oraz nowotworów wywodzących się z komórek typu podstawnego (ang. *basal-like tumors*). Wymienione powyżej podtypy biologiczne raka piersi cechują się zróżnicowanym rokowaniem, a tym samym wymagają innego podejścia terapeutycznego⁴.

Rak jajnika, podobnie jak rak piersi, jest uznawany za niejednorodną grupę nowotworów, przy czym 90% z nich stanowią nowotwory nabłonkowe. W obrębie tej grupy guzów wyróżniamy pięć podstawowych podtypów histologicznych (raki surowicze, endometroidalne, śluzowe, jasnokomórkowe i niezróżnicowane), które różnią się zarówno molekularnie, jak i klinicznie⁵.

U pewnej grupy pacjentów występuje rodzinna agregacja zachorowań na raka piersi i/lub jajnika, a wprowadzenie wysokoprzepustowych metod analizy mutacji doprowadziło do przełomowych zmian w zrozumieniu ich biologii⁶. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* leżą u podłoża większości dziedzicznych raków piersi i/lub jajnika, natomiast pozostałe 5-10%

pacjentów jest nosicielami patogennych wariantów w innych genach o umiarkowanej lub niskiej penetracji, jak np. *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2* czy *BARD1*⁷⁻⁹.

W 2000 roku, Górski i wsp. opublikowali wyniki badań, które wskazywały na bardzo wysoką częstość występowania trzech mutacji w genie *BRCAl* (c.5266dup, c.181T>G, c.4034delA), wśród polskich pacjentów z rodzinną agregacją zachorowania na ww. nowotwory. Ta obserwacja przyczyniła się do stworzenia prostego testu diagnostycznego pozwalającego na szybką i efektywną kosztowo diagnostykę genetyczną. W konsekwencji, przez następną dekadę, Polska była rozpoznawana jako kraj z silnym efektem założyciela a tym samym o ograniczonej liczbie mutacji^{10; 11}. Jednak najnowsze dane wskazują, nie tylko na ograniczone znaczenie efektu założyciela, ale także na złożone tło genetyczne dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika w populacji polskiej¹².

Z uwagi na powyższe celem badań, opisanych w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe, była pogłębiona charakterystyka dziedzicznego raka piersi i jajnika w populacji polskiej.

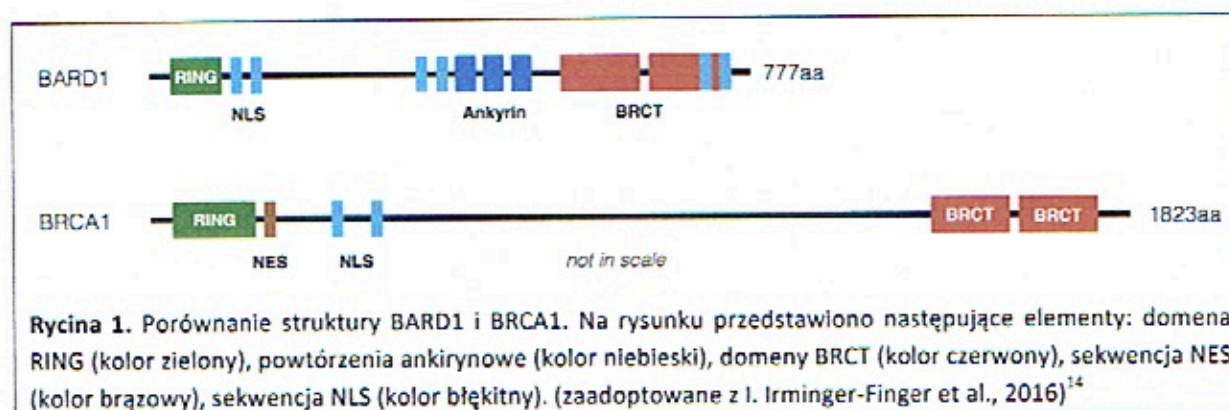
Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań opisanych w prezentowanych publikacjach.

Publikacja nr 1

Ratajska M, Antoszevska E, Piskorz A, Brozek I, Borg A, Kusmierk II, Biernat W, Limon J. Cancer predisposing *BARD1* mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; vol. 131, nr 1, s. 89-97. DOI: 10.1007/s10549-011-1403-8

Szczegółowym celem badań opisanych w pracy nr 1 była ocena znaczenia mutacji genu *BARD1* w predyspozycji do zachorowania na raka piersi i/lub raka jajnika, w rodzinach z wykluczoną mutacją w genach *BRCAl/2*.

Gen *BARD1* (MIM#601593; 2q34-q35) ma 11 eksonów i koduje białko o długości 777 aminokwasów, wykazujące szereg podobieństw strukturalnych i funkcjonalnych do *BRCA1*, w tym wysoce homologiczną domenę RING, zlokalizowaną w N-terminalnej części białka, oraz dwa powtórzenia BRCT znajdujące się w części C- terminalnej¹³ (Ryc. 1).



Tworzenie heterodimeru BARD1-BRCA1, wykazującego m.in. aktywność ligazy E3, odbywa się za pomocą domeny RING, natomiast powtórzenia BRCT, znajdujące się na C-końcu BARD1, są elementem charakterystycznym wielu białek zaangażowanych w naprawę DNA i kontrolę cyklu komórkowego¹⁴. BARD1, poza domeną RING i dwoma powtórzeniami BRCT, posiada w centralnej części trzy powtórzenia ankirynowe (ANK), które oddziałują m.in. z p53, NF- κ B¹⁴. Kombinacja tych trzech elementów jest unikalną cechą BARD1.

Mysie „nokauty *Bard1*” mają fenotyp bardzo zbliżony do „nokautów *Brcal/Brca2*”, myszy z homozygotyczną delecją *Bard1* ginęły w czasie rozwoju embrionalnego (7/8 dzień), a ich komórki charakteryzowały się wysoką niestabilnością genomową¹⁵. Natomiast u myszy z warunkowo wyłączoną ekspresją genu *Brcal* lub *Bard1* w komórkach nabłonkowych gruczołów piersiowych, powstają guzy piersi histologicznie przypominające ludzkie raki potrójnie negatywne (ang. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC)¹⁶. Ponadto wykazano, że heterodimer BARD1-BRCA1, razem z RAD51, lokalizuje się w miejscu uszkodzenia DNA, co wskazuje na jego istotną rolę w procesie naprawy DNA^{17, 18}. To właśnie te bliskie związki pomiędzy BRCA1 i BARD1 sprawiły, iż *BARD1* stał się interesujący jako potencjalny czynnik ryzyka (w przypadku obecności mutacji) dla dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika¹⁹.

20

W celu weryfikacji powyższej hipotezy, zanalizowaliśmy całą sekwencję kodującą genu *BARD1* w grupie 109 rodzin wysokiego ryzyka, u których w ramach wcześniejszych badań wykluczono występowanie mutacji *BRCA1/2*. W ww. grupie zidentyfikowaliśmy trzy potencjalnie patogenne warianty sekwencyjne, w tym wariant zlokalizowany w sekwencji akceptorowej intronu czwartego (c.1315-2A>G), wariant nonsensowny w eksonie ósmym genu *BARD1* (c.1690C>T) oraz mutację milczącą w eksonie 10 (c.1977A>G).

Wariant sekwencyjny c.1315-2A>G został zidentyfikowany w rodzinie z agregacją zachorowań na raka piersi, w której probantka i jej matka zostały zdiagnozowane

odpowiednio w wieku 40 i ~50 lat. Materiał do izolacji RNA pobrano od jednego z synów pacjentki, będącego nosicielem powyższej zmiany. Analiza RNA potwierdziła obecność nieprawidłowego transkryptu z delecją całego eksonu piątego. Zmiana ta, nie powoduje przesunięcia ramki odczytu, prowadzi jednak do uszkodzenia dwóch powtórzeń ANK, co może wpływać negatywnie na oddziaływanie BARD1 z TP53²¹.

Drugi z wykrytych wariantów skutkował przedwczesną terminacją białka (c.1690C>T; p.(Gln564*)) i utratą obu domen BRCT. Mutacja c.1690C>T została zidentyfikowana w rodzinie z agregacją raka piersi i jajnika.

Ostatnia zmiana była zlokalizowana w eksonie 10 (c.1977A>G). Probandka zachorowała na raka jajnika w wieku 36 lat, jej babcia została zdiagnozowana z rakiem piersi, a babcia-cioteczna z nowotworem ginekologicznym (prawdopodobnie wywodzącym się z jajnika). Opisywany wariant nie zmienia sekwencji aminokwasowej białka jednak uszkadza kilka sekwencji ESE (ang. *Exonic splicing enhancer*) istotnych dla prawidłowego procesu składania mRNA. Analiza RNA wykazała nadekspresję transkryptu z delecją eksonów 2-9 (1745pz), nazwanego η BARD1. Wpływ c.1977A>G na proces składania mRNA potwierdził wynik sekwencjonowania krótszego z fragmentów, w którym zaobserwowaliśmy obecność wyłącznie zmutowanego allelu (c.1977-G). Jednakże współwystępowanie obu alleli w dłuższym produkcie jednoznacznie wskazywało na ograniczony efekt wykrytej zmiany na proces składania mRNA. W celu określenia proporcji prawidłowego transkryptu (*BARD1-FL*; ang. *full length BARD1*) w stosunku do izoforny η BARD1 wykonaliśmy reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Uśredniony stosunek ilości obu transkryptów (*BARD1-FL* do η BARD1) wyniósł 3,8.

Naszą publikację poprzedziły jedynie dwa doniesienia na temat pojedynczych, potencjalnie patogennych, wariantów w genie *BARD1*, które zidentyfikowano w rodzinach wysokiego ryzyka^{22; 23}. Przedstawione przez nas wyniki wskazują jednoznacznie na znaczenie mutacji *BARD1* w predyspozycji do zachorowania na raka piersi i/lub jajnika.

Publikacja nr 2

Klonowska K, Ratajska M, Czuba K, Kuzniacka A, Brozek I, Koczkowska M, Sniadecki M, Debniak J, Wydra D, Balut M, Stukan M, Zmienko A, Nowakowska B, Irminger-Finger I, Limon J, Kozłowski P. Analysis of large mutations in *BARD1* in patients with breast and/or ovarian cancer: the Polish population as an example. *Sci. Rep.* 2015; vol. 5, art. ID 10424, s. [1-7]. DOI: 10.1038/srep10424

Szacuje się, że tzw. duże rearanżacje (LRG, ang. *large genomic rearrangements*) mogą

stanowiąc 5-10% wszystkich zmian patogennych, jednak faktyczna częstość i spektrum tych zmian zależy od analizowanego genu i populacji, której badanie dotyczy²⁴⁻²⁷. Dotychczas opisano jedynie dwa przypadki LRG, które wystąpiły w obrębie genu *BARD1*; delecję 1260pz w intronie trzecim oraz delecję całej sekwencji genu *BARD1*, przy czym oba przypadki dotyczyły rodzin silnie obciążonych^{23, 28}.

Z uwagi na niewielką liczbę doniesień dotyczących dużych rearanżacji w genie *BARD1* i brak komercyjnego testu do ich identyfikacji, zaprojektowaliśmy autorski test MLPA składający się z 12 sond zlokalizowanych w sekwencji kodującej *BARD1* (pojedyncze sondy dla eksonów 1 do 3 oraz 5 do 11; oraz dwie sondy w obrębie najdłuższego eksonu czwartego). Ponadto umiejscowiliśmy dwie sondy w sekwencji UTR (5' i 3') oraz trzy sondy kontrolne w chromosomie 1, 17 i 22. W celu sprawdzenia czułości opracowanego testu użyto trzech rodzajów kontroli pozytywnych: zaślepionej próbki z duplikacją fragmentu chromosomu 2 (2q34-37), próbki poddanej trawieniu enzymem restrykcyjnym *HindIII* (która naśladowała delecję heterozygotyczną eksonu 3 i 4), oraz próbki, w której wykorzystano oligonukleotydy maskujące, specyficzne dla miejsc łączenia sond w eksonie 6 i 7.

Łącznie przy zastosowaniu ww. testu zanalizowaliśmy 817 próbek DNA pochodzących od pacjentek z rodzinną agregacją zachorowań na raka piersi i/lub raka jajnika (504 próbki) lub od chorych na raka jajnika (313 pacjentek z nieselekcjonowanym rakiem jajnika). W siedmiu próbkach zaobserwowaliśmy obniżenie sygnału (28-45%) dla sondy zlokalizowanej w eksonie 8 lub eksonie 10, było ono jednak spowodowane zamianą nukleotydową w pobliżu miejsca łączenia się sondy, a nie obecnością LRG (Tab. 1).

Tabela 1. Wykryte zmiany sekwencyjne genu *BARD1*.

nr. badania	ekson	klasyfikacja	zmiana nukleotydowa	zmiana aminokwasowa	odległość od miejsca ligacji sond
#53	8	OC	c.1690C>T	p.(Gln564*)	15 nukleotydów
#4031		BC			
#4163	10	BC/OC	c.1972C>T	p.(Arg658Cys)	10 nukleotydów
#4349		BC			
#4062		BC/OC	c.1977A>G	p.(Arg659=)	5 nukleotydów
#4217		BC/OC			
#4321	BC				

Podsumowując, pomimo że omawiane badanie nie wykazało obecności dużych rearanżacji w genie *BARD1* w badanej grupie pacjentów, nie możemy wykluczyć obecności takich zmian.

Niemniej jednak, brak wykrytych LRG sugeruje, iż stanowią one mniej niż 10% wszystkich wariantów patogennych w *BARD1*. Najistotniejszym osiągnięciem tego projektu, które może zostać wykorzystania w przyszłości, było opracowanie czułego i wiarygodnego testu MLPA.

Publikacja nr 3

Ratajska M, Matusiak M, Kuzniacka A, Wasag B, Brozek I, Biernat W, Koczkowska M, Debniak J, Sniadecki M, Kozłowski P, Klonowska K, Pilyugin M, Wydra D, Laurent G, Limon J, Irminger-Finger I. Cancer predisposing *BARD1* mutations affect exon skipping and are associated with overexpression of specific *BARD1* isoforms. *Oncol. Rep.* 2015; vol. 34, nr 5, s. 2609-2617. DOI: 10.3892/or.2015.4235

Szacuje się, że nawet 94% naszych genów podlega procesowi alternatywnego składania (ang. *alternative splicing; AS*). Kolejne doniesienia naukowe wskazują na istotną rolę AS w onkogenezie (dotyczy to m.in. nadmiernej aktywności proliferacyjnej, angiogenezy, czy ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego)²⁹. Identyfikacja alternatywnych izoform wykazujących właściwości onkogenne jest istotna zarówno dla głębszego zrozumienia mechanizmów oporności jak również w opracowania nowych terapii³⁰⁻³³.

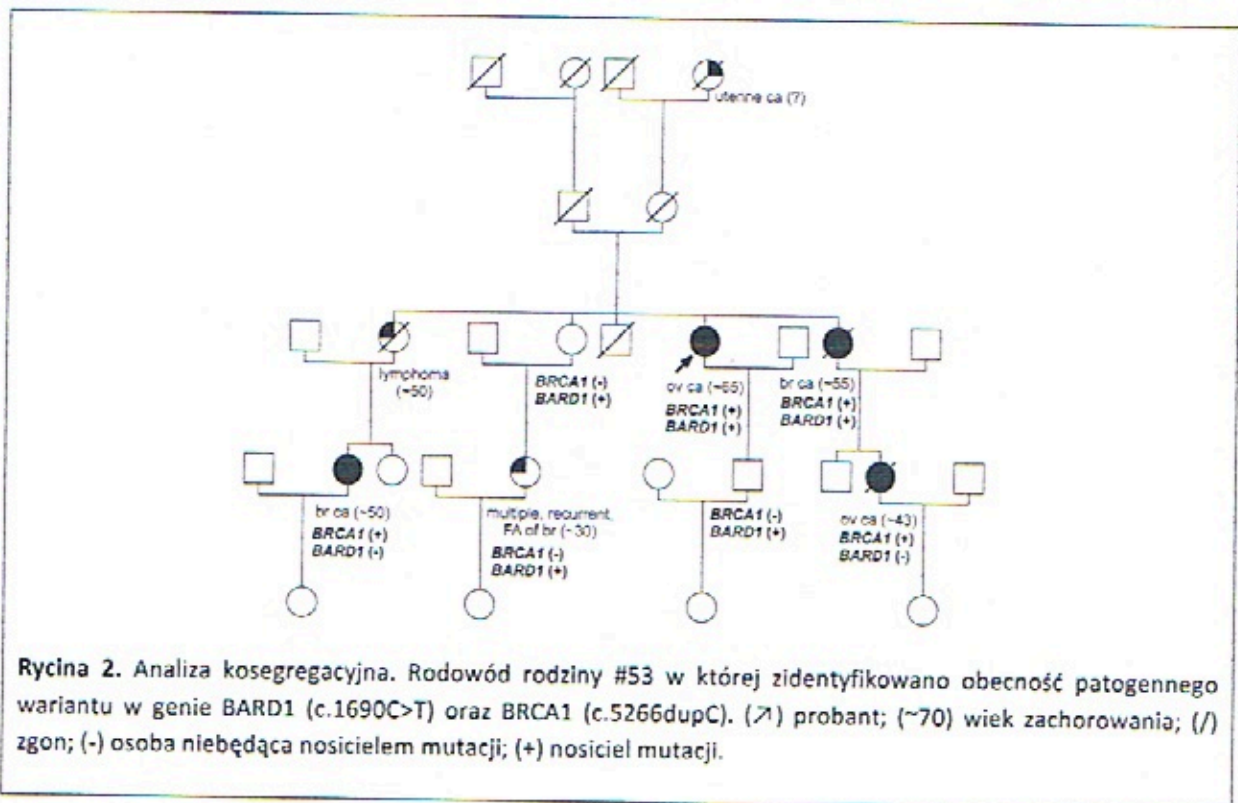
Potencjalne znaczenie alternatywnych izoform genu *BARD1*, nadeksprimowanych w różnych nowotworach, było szeroko dyskutowane w kilku publikacjach³⁴⁻³⁷. Również, doświadczenia z wykorzystaniem interferującego RNA wykazały, iż pełnią one istotną rolę w rozwoju i progresji nowotworu^{34; 35; 37-39}.

Celem niniejszej badania była analiza częstotliwość występowania wybranych wariantów germinalnych *BARD1* u chorych na raka jajnika, jak również określenie ich potencjalnego wpływu na proces składania mRNA. W badanej grupie zidentyfikowaliśmy nosicielkę, opisaną wcześniej, mutacji nonsensowej w eksonie ósmym (c.1690C>T (p.(Gln564*)), pacjentkę z mutacją zmiany sensu w eksonie piątym (c.1361C>T; p.(Pro454Leu)) oraz dwie nosicielki zmian nukleotydowych w eksonie 10 (c.1972C>T; p.(Arg658Cys); c.1977A>G; p.(Arg659=)). Co ciekawe, trzy z czterech zmian powodowały AS i ekspresję alternatywnych transkryptów genu *BARD1*.

Substytucja w eksonie piątym została zidentyfikowana u pacjentki (#109) zdiagnozowanej w wieku 70 lat. Z uwagi na ograniczone informacje dotyczące innych członków rodziny, nie było jasne czy probantka była jedyną chorą w rodzinie. Substytucja c.1361C>T skutkuje zamianą silnie konserwowanego aminokwasu w obrębie powtórzeń ankirynowych, co może sugerować jej potencjalny wpływ na interakcje *BARD1* z innymi białkami. Natomiast

przeprowadzona analiza *in silico* wykazała utratę jednego z elementów regulatorowych ESE (SC35) i tym samym potencjalny wpływ omawianej zmiany na proces składania mRNA. Badanie na poziomie RNA potwierdziło zaburzenie składania mRNA i w konsekwencji utratę eksonu piątego *BARD1*.

Mutacja nonsens w eksonie ósmym (c.1690C>T; p.(Gln564*)) została zidentyfikowana u pacjentki (#53), należącej do rodziny z wysoką agregacją zachorowań na raka piersi i jajnika. Omawiana zmiana wystąpiła wcześniej dwukrotnie wśród naszych pacjentek, a najnowsze, niepublikowane, badania wskazują, iż może być ona stosunkowo częsta w Europie Środkowowschodniej^{40, 41}. Dalsze badania wykazały, że probantka jest również nosicielką mutacji w genie *BRCA1* (c.5266dupC), natomiast analiza kosegregacyjna udowodniła obecność obu wariantów również u innych członków rodziny (Ryc.2). Sekwencjonowanie DNA wyizolowanego z tkanki nowotworowej, pochodzącej od probantki, dowiodło heterozygotyczności obu zmian.



Również w przypadku tej zmiany analiza *in silico* sugerowała możliwe uszkodzenie procesu składania mRNA, które zostało potwierdzone badaniem RT-PCR (r.[1678_1810del];[=]).

Trzeci zidentyfikowany wariant (c.1972C>T) znajdował się w eksonie 10 i powodował zamianę argininy na cysteinę w pozycji p.658. Pomimo wcześniejszych doniesień na temat potencjalnie patogenicznego charakteru ww. zmiany, wariant ten nie zmienia w sposób

widoczny struktury ani funkcji BARD1, jak również jest neutralny dla AS, co naszym zdaniem wskazuje na jego wątpliwą patogenność.

Ostatnia z wykrytych zmian jest zmianą cichą (c.1977A>G) skutkującą nadekspresją izoformy η BARD1 i została dokładnie scharakteryzowana w naszych wcześniejszych publikacjach⁴⁰. Najnowsze, niepublikowane, badanie przeprowadzone na dużej grupie pacjentów z rakiem piersi i/lub jajnika oraz zdrowych kontroli nie wykazało istotnych różnic w częstości omawianego wariantu pomiędzy grupami, co może wskazywać na brak związku c.1977A>G z podwyższonym ryzykiem zachorowania na nowotwór. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wyniki badań RNA (wskazujące podwyższoną ekspresję izoformy η BARD1) oraz związek c.1977A>G z występowaniem znacznej niestabilności telomerowej, nie możemy wykluczyć jej potencjalnego znaczenia w progresji nowotworu⁴². Podobne obserwacje dotyczyły naturalnie występujących izoform genu *BRCA1*, które były silnie ekspresjonowane w tkance nowotworowej⁴³.

Podsumowując, nasze wyniki jednoznacznie wskazują na konieczność wielopoziomowego badania genu *BARD1*, ponieważ analiza molekularna ograniczona do eksperymentów na poziomie DNA może skutkować błędną klasyfikacją wykrytych wariantów.

Publikacja nr 4

Ratajska M, Krygier M, Stukan M, Kuźniacka A, Koczkowska M, Dudziak M, Śniadecki M, Dębniak J, Wydra D, Brozek I, Biernat W, Borg A, Limon J, Wasąg B. Mutational analysis of *BRCA1/2* in a group of 134 consecutive ovarian cancer patients: novel and recurrent *BRCA1/2* alterations detected by next generation sequencing. *J. Appl. Genet.* 2015; vol. 56, nr 2, s. 193-198. DOI: 10.1007/s13353-014-0254-5

Konstrytutywne mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* są związane z wysokim ryzykiem zachorowania na raka piersi i jajnika, jednak częstość występowania i spektrum mutacji (w tym tzw. mutacji założycielskich) znacznie się różni w poszczególnych populacjach^{44,45}.

Pierwsze badania przeprowadzone w populacji polskiej wykazały bardzo wysoka częstość trzech patogennych wariantów w genie *BRCA1* (c.5266dup, c.181T>G, c.4034delA), co wpłynęło na postrzeganie populacji polskiej jako jednorodnej i tym samym z ograniczonym spektrum mutacji^{10,11}.

Dlatego głównym celem tego badania było ponowne określenie częstości i spektrum mutacji genów *BRCA1/2* w grupie 134 kobiet z nieselekcjonowanym rakiem jajnika. Badanie zostało wykonane przy zastosowaniu techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS), a zatem

drugim celem niniejszego projektu było wdrożenie NGS do rutynowej diagnostyki pacjentek z rakiem jajnika.

Łącznie zidentyfikowaliśmy 20 nosicieli patogennych wariantów w genach *BRCA1/2*, w tym 65% (n=13/20) stanowiły mutacje założycielskie i powtarzające się (ang. *recurrent*). Pozostałe siedem zmian (35%) wykryto u pojedynczych pacjentek, z uwagi na lokalizację warianty te nie zostałyby wykryte przy zastosowaniu standardowego panelu diagnostycznego.

Ponadto, analizując dane rodowodowe, zaobserwowaliśmy, że znaczna część nosicieli zgłaszała brak zachorowań u innych członków rodziny. Sugeruje to poważne ograniczenia diagnostyki genetycznej w oparciu o analizę rodowodową.

Podsumowując, w niniejszej publikacji opisujemy zastosowanie (po raz pierwszy) techniki NGS w badaniach przesiewowych *BRCA1/2* w populacji polskiej. Ponadto, z uwagi na obecność silnego, ale ograniczonego, efektu założyciela w naszej populacji, postulujemy konieczność kompleksowej analizy *BRCA1/2* u wszystkich pacjentek z rakiem jajnika. Uważamy, że ograniczenie badań genetycznych do najczęstszych mutacji założycielskich/powtarzających się spowoduje niewykrycie znacznej liczby pacjentek należących do grupy podwyższonego ryzyka.

Publikacja nr 5

Ratajska M, Koczkowska M, Żuk M, Gorczyński A, Kuźniacka A, Stukan M, Biernat W, Limon J, Wasąg B. Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; vol. 8, nr 61, s. 101325-101332. DOI: 10.18632/oncotarget.20722

Rak jajnika jest jednym z najczęstszych nowotworów kobiecych w Europie, rocznie diagnozowanych jest ponad 60 tysięcy nowych przypadków⁴⁶.

U około 15% pacjentek z rakiem jajnika wykrywane są mutacje germinalne w genach *BRCA1/2*, a u pozostałych 3-10% identyfikowane są zmiany somatyczne w tych genach⁴⁷⁻⁵⁰. Pacjentki z dodatnim wynikiem badania w kierunku obecności wariantów patogennych *BRCA1/2* kwalifikują się do terapii celowanej inhibitorami PARP1, dlatego skuteczna i szybka identyfikacja mutacji ma ogromne znaczenie terapeutyczne. Jednocześnie, analiza molekularna w oparciu o utrwalony w formalinie materiał z guza (ang. *Formalin-fixed paraffin-embedded material*; FFPE) może być problematyczna z uwagi na niską jakość DNA i heterogenność nowotworu. Z uwagi na powyższe wyzwania/ograniczenia krążące DNA

guza (ctDNA; ang. *circulating tumor DNA*), które jest materiałem reprezentatywnym dla całego nowotworu, jest atrakcyjnym materiałem diagnostycznym.

W prezentowanej pracy, po raz pierwszy, wykorzystaliśmy ctDNA do analizy germinalnych i somatycznych wariantów *BRCA1/2* w grupie 121 chorych z rakiem jajnika.

Częstość zmian germinalnych i somatycznych w badanej grupie wyniosła odpowiednio 19% (n=25/121) i 6,6% (n=8/121), co jest zgodne z danymi literaturowymi⁴⁷⁻⁵⁰. Zgodnie z oczekiwaniami wszystkie mutacje germinalne zidentyfikowane w ctDNA zostały wykryte w DNA wyizolowanym z limfocytów krwi obwodowej w ramach wcześniejszych badań; wykazują tym samym 100% zgodność tych dwóch analiz⁵¹.

U siedmiu pacjentów zaobserwowaliśmy współwystępowanie dwóch (lub więcej) wariantów patogennych, co potwierdza dużą heterogenność analizowanych próbek. Co ciekawe, pośród naszych chorych zidentyfikowaliśmy cztery pacjentki z somatycznym wariantem p.Cys61Gly, który jest dobrze znaną mutacją założycielską w wielu populacjach, w tym w populacji polskiej. Aby potwierdzić somatyczny charakter wykrytej zmiany, wyizolowaliśmy DNA z tk. nowotworowej (z dwóch różnych skrawków guza), w jednej z analizowanych próbek mutacja była obecna tylko w jednym fragmencie guza, co potwierdza heterogenność badanego materiału. Obecność zmiany nukleotydowej w tej samej pozycji, zarówno w materiale konstytutywnym, jak i tk. nowotworowej może sugerować obecność miejsca szczególnie podatnego na wystąpienie mutacji (ang. *hotspot*). Podobna obserwacja została opublikowana przez Latimana i wsp. (2013), autorzy ci wykazali, iż jedna z najczęstszych mutacji w genie *BRCA1* (c.68_69delAG), której przypisywano aszkenazyjskie pochodzenie, powstała niezależnie, w kilku różnych populacjach⁵².

Podsumowując, w niniejszym badaniu po raz pierwszy wykazaliśmy przydatność ctDNA w identyfikacji zmian zarówno germinalnych jak i somatycznych w rutynowej diagnostyce pacjentek z rakiem jajnika.

Paper No. 6

Koczkowska M, Krawczynska N, Stukan M, Kuzniacka A, Brozek I, Sniadecki M, Debniak J, Wydra D, Biernat W, Kozłowski P, Limon J, Wasag B, Ratajska M. Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers* (Basel). 2018; vol. 10, nr 11, pii: E442. DOI: 10.3390/cancers10110442.

Od identyfikacji dwóch głównych genów, *BRCA1* i *BRCA2*, których mutacje są związane z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka piersi/jajnika minęło wiele lat. W tym czasie

pojawiły się doniesienia na temat innych genów, w tym *ATM*, *BRIP1*, *CHECK2*, *PALB2*, *BARD1*, potencjalnie związanych z predyspozycją do wystąpienia tych nowotworów⁹. Należy jednak zauważyć, iż w przypadku raka jajnika, dane dotyczące ewentualnej predyspozycji do wystąpienia choroby są ograniczone i dotyczą głównie wariantów patogennych w genach kodujących białka odpowiedzialne za naprawę błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair*, *MMR*)⁵³. W związku z powyższym, głównym celem prezentowanej pracy było określenie częstości występowania i spektrum konstytutywnych zmian patogennych w 25 genach, związanych z predyspozycją do zachorowania na różne nowotwory. Badania wykonano na dużej grupie 333 pacjentek z nie selekcionowanym rakiem jajnika.

W grupie pacjentek zakwalifikowanych do projektu, 134 chore miały wykonane badanie w kierunku obecności mutacji *BRCA1* i *BRCA2* w ramach wcześniejszego projektu⁵¹. Ogółem, w genach *BRCA1/2*, zidentyfikowaliśmy 71 mutacji (n=71/333; 21,3%), przy czym zdecydowaną większość stanowiły warianty patogenne zlokalizowane w *BRCA1* (n=60/71; 84,5%); zmiany w genie *BRCA2* to jedynie 15,5% wszystkich mutacji (n=11/71). Nieco ponad połowa (56,3%; n=40/71) wykrytych zmian to tzw. mutacje założycielskie/powtarzające, przy czym najczęściej występujące c.5266dupC i c.3700_3704del, stanowiły odpowiednio 31% i 21,1%.

Analiza 23 genów związanych z predyspozycją do zachorowania na różne nowotwory, w tym raka piersi, pozwoliła na identyfikację 20 pacjentek u których wykryliśmy 16 różnych, potencjalnie patogennych, wariantów sekwencyjnych (6%). Najliczniej reprezentowane były zmiany zlokalizowane w *NBN* (n=6/20; 30%) i *CHEK2* (n=4/20; 20%), przy czym cztery z sześciu kobiet z mutacją w genie *NBN*, było nosicielkami c.657_661del (n=4/6; 67%). Ponadto, zidentyfikowaliśmy dwa warianty patogenne w genach *BLM* i *PALB2*, oraz pojedyncze warianty w *APC*, *ATM*, *BRIP1*, *MRE11A*, *RAD50* i *RAD51C*. W tej grupie pacjentek, cztery były także nosicielkami mutacji w genie *BRCA1*.

W analizowanej kohorcie, opisaliśmy szereg wariantów o nieznanym efekcie biologicznym (ang. *variants of unknown significance*; *VUS*), przy czym najczęstsza była substytucja c.470T>C (p.(Ile157Thr)) w genie *CHEK2* (n=9/333; 2,7%). Także w tej grupie znajdowały się nosicielki mutacji w *BRCA1* (n=2/9). Drugim, najczęstszym, VUS była zamiana nukleotydu c.511A>G (p.(Ile171Val)) w *NBS1*, którą zidentyfikowano u sześciu chorych, w tym u nosicielki mutacji *BRCA1* i nosicielki patogennego wariantu w genie *PALB2*. Dodatkowo, wykryliśmy dwa warianty w genie *NBN* (c.38-3C>G; c.38G>A), które mogłyby

skutkować AS, jednak ze względu na brak RNA nie mogliśmy potwierdzić obecności alternatywnych transkryptów.

Jedna z badanych pacjentek była złożoną heterozygotą w genie *BARD1* (c.1075_1095del; p.(Leu359_Pro365del) oraz c.1977A>G (p. (Arg659=)); oba warianty znajdują się w pozycji *trans*. W rodzinie poza probantką (zdiagnozowaną w wieku 65 lat), rak jajnika wystąpił także u jej siostry (która zmarła z tego powodu w wieku 36 lat). Biorąc pod uwagę pozytywną historię rodzinną oraz fakt, że oba warianty prowadzą do AS i nadekspresji alternatywnych izoform genu *BARD1* (nazwanych odpowiednio γ *BARD1* i η *BARD1*), a w konsekwencji do znacznie niestabilności telomerowej, nie możemy wykluczyć ich potencjalnego wpływu na rozwój i przebieg choroby⁴².

Podsumowując, w omawianej publikacji przedstawiliśmy spektrum i częstość wariantów sekwencyjnych w 25 genach związanych z ryzykiem zachorowania na nowotwory w grupie 333 kobiet z rakiem jajnika. Na podstawie przeprowadzonych badań szacujemy, iż około 26% pacjentek jest nosicielkami mutacji *BRCAl/2* (21%) lub w innych genach (~6%) potencjalnie związanych z tym nowotworem. W świetle wyników badania klinicznego ARIEL3, które wykazało, iż u chorych z obecnością zmian w takich genach jak *RAD51C*, *RAD51D* leczonych inhibitorami PARP, czas wolny od progresji choroby jest znamienne dłuższy w porównaniu do kobiet bez mutacji, postulujemy, że docelowa grupa pacjentek z rakiem jajnika, która powinna być leczona w ten sposób jest bardziej heterogenna niż pierwotnie zakładano^{54, 55}. Ponadto, w naszym badaniu, zidentyfikowaliśmy nosicielki dwóch różnych, potencjalnie patogennych, wariantów. Uważamy, iż współwystępowanie dwóch mutacji może mieć potencjalne znaczenie na przebieg choroby, odpowiedź na leczenie i powinno być uważnie analizowane.

Podsumowanie

Przedstawione prace przyczyniły się do głębszego poznania dziedzicznego raka piersi i raka jajnika, ukazując złożony charakter tych nowotworów.

Na podstawie uzyskanych wyników, potwierdzamy istnienie w Polsce silnego, ale ograniczonego, efektu założyciela, co wymaga zmian w dotychczasowym podejściu diagnostycznym. Ponadto uważamy, iż dalsze analizy wielogenowe są konieczne do lepszego poznania naszej populacji i mogą znacząco przyczynić się do poprawy poradnictwa genetycznego i testów molekularnych oferowanych pacjentkom z rakiem piersi i/lub jajnika. Nasze wyniki pokazują także konieczność wielopoziomowej analizy wariantów

sekwencyjnych, co ograniczy liczbę nieprawidłowo sklasyfikowanych mutacji.

Piśmiennictwo

1. Globocan webpage: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Skibinski, A., and Kuperwasser, C. (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* 34, 5309-5316.
3. Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
4. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8418-8423.
5. Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 460, 237-249.
6. Cancer network webpage: <http://www.cancernetwork.com>.
7. Cancer Genome Atlas Research, N. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615.
8. Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.
9. Walsh, T., Lee, M.K., Casadei, S., Thornton, A.M., Stray, S.M., Pennil, C., Nord, A.S., Mandell, J.B., Swisher, E.M., and King, M.C. (2010). Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12629-12633.
10. Gorski, B., Jakubowska, A., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Grzybowska, E., Mackiewicz, A., Stawicka, M., Bebenek, M., Sorokin, D., et al. (2004). A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *International journal of cancer* 110, 683-686.
11. Brozek, I., Cybulska, C., Ratajska, M., Piatkowska, M., Kluska, A., Balabas, A., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Pamula-Pilat, J., et al. (2011). Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. *Journal of applied genetics* 52, 325-330.
12. Kowalik, A., Siolek, M., Kopczyński, J., Krawiec, K., Kalisz, J., Zieba, S., Kozak-Klonowska, B., Wypiórkiewicz, E., Furmanczyk, J., Nowak-Ozimek, E., et al. (2018). BRCA1 founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution BRCA1/2 next-generation sequencing study. *PloS one* 13, e0201086.
13. Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature genetics* 14, 430-440.
14. Irminger-Finger, I., Ratajska, M., and Pilyugin, M. (2016). New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *The international journal of biochemistry & cell biology* 72, 1-17.
15. McCarthy, E.E., Celebi, J.T., Baer, R., and Ludwig, T. (2003). Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brca1 tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability. *Molecular and cellular biology* 23, 5056-5063.
16. Shakya, R., Szabolcs, M., McCarthy, E., Ospina, E., Basso, K., Nandula, S., Murty, V., Baer, R., and Ludwig, T. (2008). The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the BRCA1/BARD1 heterodimer in tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7040-7045.
17. Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A., and Jasin, M. (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and cellular biology* 24, 9305-9316.
18. Westermarck, U.K., Reyngold, M., Olshen, A.B., Baer, R., Jasin, M., and Moynahan, M.E. (2003). BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks. *Molecular and cellular biology* 23, 7926-7936.
19. Hedenfalk, I.A., Ringner, M., Trent, J.M., and Borg, A. (2002). Gene expression in inherited breast cancer. *Advances in cancer research* 84, 1-34.
20. Walsh, T., and King, M.C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* 11, 103-105.
21. Jefford, C.E., Feki, A., Harb, J., Krause, K.H., and Irminger-Finger, I. (2004). Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity. *Oncogene* 23, 3509-3520.

22. De Brakeleer, S., De Greve, J., Loris, R., Janin, N., Lissens, W., Sermijn, E., and Teugels, E. (2010). Cancer predisposing missense and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families. *Human mutation* 31, E1175-1185.
23. Sabatier, R., Adelaide, J., Finetti, P., Ferrari, A., Huiart, L., Sobol, H., Chaffanet, M., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2010). BARD1 homozygous deletion, a possible alternative to BRCA1 mutation in basal breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 49, 1143-1151.
24. James, P.A., Sawyer, S., Boyle, S., Young, M.A., Kovalenko, S., Doherty, R., McKinley, J., Alsop, K., Beshay, V., Harris, M., et al. (2015). Large genomic rearrangements in the familial breast and ovarian cancer gene BRCA1 are associated with an increased frequency of high risk features. *Familial cancer* 14, 287-295.
25. Rashid, M.U., Muhammad, N., Amin, A., Loya, A., and Hamann, U. (2017). Contribution of BRCA1 large genomic rearrangements to early-onset and familial breast/ovarian cancer in Pakistan. *Breast cancer research and treatment* 161, 191-201.
26. Rudnicka, H., Debnak, T., Cybulski, C., Huzarski, T., Gronwald, J., Lubinski, J., and Gorski, B. (2013). Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Polish high-risk breast and ovarian cancer families. *Molecular biology reports* 40, 6619-6623.
27. Woodward, A.M., Davis, T.A., Silva, A.G., Kirk, J.A., Leary, J.A., and kConFab, I. (2005). Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *Journal of medical genetics* 42, e31.
28. Rouleau, E., Jesson, B., Briaux, A., Nogues, C., Chabaud, V., Demange, L., Sokolowska, J., Coulet, F., Barouk-Simonet, E., Bignon, Y.J., et al. (2012). Rare germline large rearrangements in the BRCA1/2 genes and eight candidate genes in 472 patients with breast cancer predisposition. *Breast cancer research and treatment* 133, 1179-1190.
29. Oltean, S., and Bates, D.O. (2014). Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* 33, 5311-5318.
30. Abubaker, J., Bavi, P., Al-Haqawi, W., Sultana, M., Al-Harbi, S., Al-Sanea, N., Abduljabbar, A., Ashari, L.H., Alhomoud, S., Al-Dayel, F., et al. (2009). Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. *The Journal of pathology* 219, 435-445.
31. Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 809-819.
32. Okumura, N., Yoshida, H., Kitagishi, Y., Nishimura, Y., and Matsuda, S. (2011). Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 413, 395-399.
33. Wang, H., Zhou, M., Shi, B., Zhang, Q., Jiang, H., Sun, Y., Liu, J., Zhou, K., Yao, M., Gu, J., et al. (2011). Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity. *Neoplasia* 13, 461-471.
34. Bosse, K.R., Diskin, S.J., Cole, K.A., Wood, A.C., Schnepf, R.W., Norris, G., Nguyen le, B., Jagannathan, J., Laquaglia, M., Winter, C., et al. (2012). Common variation at BARD1 results in the expression of an oncogenic isoform that influences neuroblastoma susceptibility and oncogenicity. *Cancer research* 72, 2068-2078.
35. Li, L., Ryser, S., Dizin, E., Pils, D., Krainer, M., Jefford, C.E., Bertoni, F., Zeillinger, R., and Irminger-Finger, I. (2007). Oncogenic BARD1 isoforms expressed in gynecological cancers. *Cancer research* 67, 11876-11885.
36. Zhang, Y.Q., Bianco, A., Malkinson, A.M., Leoni, V.P., Frau, G., De Rosa, N., Andre, P.A., Versace, R., Boulvain, M., Laurent, G.J., et al. (2012). BARD1: an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer* 131, 83-94.
37. Zhang, Y.Q., Pilyugin, M., Kuester, D., Leoni, V.P., Li, L., Casula, G., Zorcolo, L., Schneider-Stock, R., Atzori, L., and Irminger-Finger, I. (2012). Expression of oncogenic BARD1 isoforms affects colon cancer progression and correlates with clinical outcome. *British journal of cancer* 107, 675-683.
38. Chen, J., and Weiss, W.A. (2015). Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene* 34, 1-14.
39. Ryser, S., Dizin, E., Jefford, C.E., Delaval, B., Gagos, S., Christodoulidou, A., Krause, K.H., Birnbaum, D., and Irminger-Finger, I. (2009). Distinct roles of BARD1 isoforms in mitosis: full-length BARD1 mediates Aurora B degradation, cancer-associated BARD1beta scaffolds Aurora B and BRCA2. *Cancer research* 69, 1125-1134.
40. Ratajska, M., Antoszewska, E., Piskorz, A., Brozek, I., Borg, A., Kusmierek, H., Biernat, W., and Limon, J. (2012). Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast cancer research and treatment* 131, 89-97.

41. Klonowska, K., Ratajska, M., Czubak, K., Kuzniacka, A., Brozek, I., Koczkowska, M., Sniadecki, M., Debniak, J., Wydra, D., Balut, M., et al. (2015). Analysis of large mutations in BARD1 in patients with breast and/or ovarian cancer: the Polish population as an example. *Scientific reports* 5, 10424.
42. Pilyugin, M., Andre, P.A., Ratajska, M., Kuzniacka, A., Limon, J., Tournier, B.B., Colas, J., Laurent, G., and Irminger-Finger, I. (2017). Antagonizing functions of BARD1 and its alternatively spliced variant BARD1delta in telomere stability. *Oncotarget* 8, 9339-9353.
43. Orban, T.I., and Olah, E. (2003). Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Molecular pathology : MP* 56, 191-197.
44. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
45. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792.
46. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer* 49, 1374-1403.
47. Dougherty, B.A., Lai, Z., Hodgson, D.R., Orr, M.C.M., Hawryluk, M., Sun, J., Yelensky, R., Spencer, S.K., Robertson, J.D., Ho, T.W., et al. (2017). Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in high-grade serous ovarian cancers in the maintenance setting. *Oncotarget* 8, 43653-43661.
48. Hennessy, B.T., Timms, K.M., Carey, M.S., Gutin, A., Meyer, L.A., Flake, D.D., 2nd, Abkevich, V., Potter, J., Pruss, D., Glenn, P., et al. (2010). Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 3570-3576.
49. Pal, T., Permuth-Wey, J., Betts, J.A., Krischer, J.P., Fiorica, J., Arango, H., LaPolla, J., Hoffman, M., Martino, M.A., Wakeley, K., et al. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 104, 2807-2816.
50. Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Cole, D.E., Rosen, B., Bradley, L., Fan, I., Tang, J., Li, S., Zhang, S., Shaw, P.A., et al. (2006). Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 1694-1706.
51. Ratajska, M., Krygier, M., Stukan, M., Kuzniacka, A., Koczkowska, M., Dudziak, M., Sniadecki, M., Debniak, J., Wydra, D., Brozek, I., et al. (2015). Mutational analysis of BRCA1/2 in a group of 134 consecutive ovarian cancer patients. Novel and recurrent BRCA1/2 alterations detected by next generation sequencing. *Journal of applied genetics* 56, 193-198.
52. Laitman, Y., Feng, B.J., Zamir, I.M., Weitzel, J.N., Duncan, P., Port, D., Thirthagiri, E., Teo, S.H., Evans, G., Latif, A., et al. (2013). Haplotype analysis of the 185delAG BRCA1 mutation in ethnically diverse populations. *European journal of human genetics : EJHG* 21, 212-216.
53. Lu, H.M., Li, S., Black, M.H., Lee, S., Hoiness, R., Wu, S., Mu, W., Huether, R., Chen, J., Sridhar, S., et al. (2018). Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA oncology*.
54. Dockery, L.E., Gunderson, C.C., and Moore, K.N. (2017). Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer. *OncoTargets and therapy* 10, 3029-3037.
55. Swisher, E.M., Lin, K.K., Oza, A.M., Scott, C.L., Giordano, H., Sun, J., Konecny, G.E., Coleman, R.L., Tinker, A.V., O'Malley, D.M., et al. (2017). Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 18, 75-87.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Szczegółowy wykaz pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych znajduje się w załączniku nr 2: „Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego

(szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego znajduje się w załączniku nr 5)

- Łączna liczba prac – 28 (po wyłączeniu prac wchodzących w skład osiągnięcia – 22).
- Sumaryczny *Impact Factor* według listy *Journal Citation Reports (JCR)* zgodnie z rokiem opublikowania: 65,76 (po wyłączeniu prac wchodzących w skład osiągnięcia – 46,318).
- Punkty MNiSW: 634 (po wyłączeniu prac wchodzących w skład osiągnięcia – 484).
- Wskaźnik *Impact Factor* prac, których jestem pierwszym autorem – 19,07 (w tym po uzyskaniu stopnia doktora – 8,884).
- Wskaźnik *Impact Factor* prac, których jestem ostatnim autorem – 5,326.
- Liczba komunikatów zjazdowych prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach – 14.
- Liczba cytowań:
 - według *Web of Science (WoS)*: 366 (po wyłączeniu autocytowań: 314);
 - według *Scopus*: 399 (po wyłączeniu autocytowań: 347).
- Indeks Hirscha:
 - według *Web of Science (WoS)*: 10;
 - według *Scopus*: 11

W mojej pracy naukowej można wyróżnić trzy główne obszary tematyczne:

- Predyspozycja do zachorowania na raka piersi i / lub raka jajnika
- Wykorzystanie ctDNA w diagnostyce nowotworowej i monitorowaniu pacjentów
- Charakterystyka nowego podtypu molekularnego raka piersi związanego z nadekspresją genu *AAMDC* (badanie wykonywane we współpracy z zespołem prof. Pilar Blankafort, UWA)

Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Moją działalność naukową rozpoczęłam będąc studentką II-roku na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed i uczęszczając na pracownię indywidualną prowadzoną w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki GUMed. Pod kierunkiem profesora Janusza

Limona otrzymałam kompleksową edukację z zakresu genetyki człowieka. Następnie, w tej samej jednostce, w ramach pracowni magisterskiej wykonałam pracę eksperymentalną zatytułowaną: „Wpływ dietylenotriaminy (DETA) i nitroprusydku sodu (NaNP) na częstość wymiany chromatyd siostrzanych i kinetykę podziałów limfocytów człowieka w hodowli *in vitro*.” Promotorem pracy był prof. Janusz Limon, a uzyskane wyniki zostały opublikowane w *J Appl Genet.* 2001; vol. 42, nr 2, s. 233-235.

Po uzyskaniu stopnia magistra, rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki, GUMed. W 2001 roku otrzymałam sześciomiesięczne stypendium na Uniwersytecie w Lund (Szwecja), gdzie pod opieką prof. Ake Borg'a zajmowałam się analizą mutacji genów *BRCA1/2* w polskich rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika. Po powrocie do Gdańska kontynuowałam współpracę z zespołem prof. Borg'a, która zaowocowała realizacją kilku wspólnych przedsięwzięć, w tym projektu naukowego pt. „Znaczenie wybranych genów o niskiej penetracji w predyspozycji do zachorowania na raka piersi i / lub jajnika” (N 401 164 31 / 3656).

W roku 2004 zrezygnowałam ze studiów doktoranckich w celu podjęcia pracy w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki (stanowisko specjalisty), nadal jednak kontynuowałam moje badania nad dziedzicznym rakiem piersi i jajnika (główna aktywność naukowa). Ponadto byłam zaangażowana w realizację innych projektów naukowych prowadzonych w katedrze, prowadziłam zajęcia dydaktyczne oraz opiekowałam się studentami i magistrantami.

W roku 2010, złożyłam rozprawę doktorską zatytułowaną „Częstość występowania i kosegregacja wybranych mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* w rodzinach z agregacją raka piersi”, która była podsumowaniem moich dotychczasowych badań w tym temacie.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam moje badania nad dziedzicznym rakiem piersi i jajnika, koncentrując się na znaczeniu genów o umiarkowanej i niskiej penetracji w predyspozycji do choroby. Moje badania dotyczyły głównie mutacji *BARD1* jako potencjalnych czynników ryzyka, jednak wkrótce ewoluowały w kierunku analizy alternatywnego składania i znaczenia alternatywnych izoform *BARD1*. Podczas pracy nad genem *BARD1* nawiązałam współpracę z prof. Irmgard Irminger-Finger, z którą zrealizowaliśmy kilka wspólnych projektów. Jednym z najważniejszych osiągnięć tego okresu było wykazanie dużej niestabilności telomerowej u pacjentek z mutacjami *BARD1*.

W ramach współpracy z prof. Rafałem Dziadziuszko zrealizowaliśmy pilotażowe badanie

dotyczące zastosowania ctDNA w diagnostyce chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca; wyniki tego badania zostały zaprezentowane na kilku zjazdach.

Ponadto byłam zaangażowana w realizację kilku projektów naukowych, w tym „MOLTEST”, „MOLTEST BIS” i „MAESTRO”, którego byłam współautorem i głównym badaczem.

W czerwcu 2014r., przed rozpoczęciem mojego 12-miesięcznego kontraktu na Uniwersytecie Zachodniej Australii (UWA), objęłam stanowisko adiunkta w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej, GUMed. Na UWA dołączyłam do zespołu prof. Georg'a Yeoh, gdzie wprowadziłam i zoptymalizowałam metodę FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) do oceny zaburzeń genetycznych, które mogą prowadzić do transformacji nowotworowej komórek progenitorowych wątroby (ang. *liver progenitor cells; LPCs*). Ponadto nawiązałam współpracę z prof. Pilar Blankafort w ramach której pomagałam scharakteryzować aberracje genu *C11orf67/AAMDC* związanego z nowym, agresywnym podtypem raka piersi (manuskrypt wysłany do Nature Metabolism).

Obecnie realizuje projekt dotyczący wykorzystania ctDNA w nieinwazyjnej diagnostyce raka jajnika. Działanie to jest finansowane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki – „Miniatura”, a zakończenie badań jest planowane na wrzesień 2019r. Głównym celem ww. projektu jest identyfikacja wariantów sekwencyjnych w innych genach, które mogą być związane nie tylko z predyspozycją ale także przebiegiem choroby. Jednocześnie prowadzę badania dotyczące roli *BARD1* w patogenezie potrójnie negatywnego raka piersi. Moje odkrycie dotyczące obecności rearanżacji *BARD1* w części guzów TNBC dało początek współpracy z prof. Rodney'em Scott'em (University of Newcastle, Australia); w najbliższym czasie planowane jest złożenie wspólnego wniosku grantowego.

Szczegółowa lista projektów badawczych i publikacji znajduje się w Załączniku nr 2.

Osiągnięcia dydaktyczne

Praca ze studentami zawsze była istotną częścią mojej pracy. W ramach moich obowiązków prowadzę koło naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki. W ramach ww. koła studenci realizują indywidualne mini-projekty, co pozwala im rozwijać ich zainteresowanie genetyką, poszerza wiedzę i uczy analitycznego myślenia. Działanie to jest częścią strategii „Evidence based learning” którą rozwijam od kilku lat.

W ubiegłym roku akademickim przeprowadziłam cykl wykładów z genetyki dla szczególnie utalentowanej młodzieży (program „Zdolni z Pomorza” pod patronatem Marszałka Woj.

Pomorskiego). Ponadto opiekuje się magistrantami, doktorantami, jak również jestem zaangażowana w prowadzenia zajęć w ramach kursu specjalizacyjnego z genetyki guzów litych dla diagnostów laboratoryjnych. Ponadto, brałam czynny udział w przygotowaniu programów nauczania z Genetyki i Biologii medycznej na kierunkach polsko- i anglojęzycznych.

Szczegółowa lista moich osiągnięć dydaktycznych znajduje się w Załączniku nr 2.

Pogórze, 08 kwietnia 2019

Robert Magdaleno