

mgr Iga Anna Kołodziejczak-Guglas

**“Analizy molekularne odróżnicowania onkogenego przy
użyciu zestawów danych proteogenomicznych otrzymanych
z 12 typów nowotworów”**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Maciej Wiznerowicz

Międzynarodowy Instytut Onkologii Molekularnej w Poznaniu



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Słowa kluczowe w j. polskim:

nowotwory, macierzystość, białka, proteomika, biomarkery

Słowa kluczowe w j. angielskim:

tumors, stemness, proteins, proteomics, biomarkers

Nazwa i numer projektu badawczego:

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach programu “Konsorcjum Kliniczne Analiz Proteomiki Raka (*Clinical Proteomics Tumor Analysis Consortium, CPTAC*” we współpracy naukowej Międzynarodowego Instytutu Onkologii Molekularnej (*International Institute for Molecular Oncology, IIMO*) w Poznaniu i Narodowego Instytutu Raka (*National Cancer Institute, NCI*) przy Narodowych Instytutach Zdrowia (*National Institutes of Health, NIH*) w Stanach Zjednoczonych. Numer projektu badawczego: NCI/NIH HHSN261201600005I.



National Institutes
of Health



Stypendium współfinansowane przez Europejski Fundusz Społeczny w ramach programu PO WER (Program Operacyjny Wiedza, Edukacja, Rozwój) w ramach projektu „Program Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w medycynie spersonalizowanej”. NCBiR/EU.
Termin realizacji: 01.10.2018 – 30.09.2022 r.



Fundusze
Europejskie



Rzeczpospolita
Polska

Unia Europejska
Europejskie Fundusze
Strukturalne i Inwestycyjne



Serdecznie dziękuję Promotorowi – Panu Profesorowi dr hab. n. med. Maciejowi Wiznerowiczowi za niezliczone pokłady cierpliwości oraz nieocenione wsparcie merytoryczne i zaangażowanie podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Bardzo dziękuję także Pani Profesor dr hab. n. med. Małgorzacie Wierzbickiej, Panu Profesorowi dr hab. n. med. Andrzejowi Antczakowi i Doktorowi n. med. Pawłowi Kurzawie za pomoc w realizacji badań, drogocenne wskazówki i wsparcie merytoryczne.

Dziękuję również koleżankom i kolegom z projektu CPTAC za owocną współpracę i wsparcie.

W szczególności pragnę podziękować mojemu mężowi - Kacprowi, rodzinie i najbliższym przyjaciołom za okazane zrozumienie, wsparcie i dobre słowo w trudnych chwilach.

Spis treści	
Spis treści.....	5
Spis rycin.....	8
Spis tabel.....	10
Wykaz stosowanych skrótów.....	11
Streszczenie w j. polskim.....	19
Streszczenie w j. angielskim.....	21
Rozdział I Wstęp.....	22
1.1 Misja Konsorcjum Klinicznych Analiz Proteomiki Raka.....	22
1.2 Proteomika.....	24
1.3 Macierzystość nowotworów.....	26
1.4 Charakterystyka nowotworów uwzględnionych w rozprawie doktorskiej.....	31
1.4.1 Rak piersi (BR).....	31
1.4.2 Jasnokomórkowy rak nerki (CCRCC).....	33
1.4.3 Rak endometrialny trzonu macicy (UCEC).....	35
1.4.4 Glejak wielopostaciowy (GBM).....	37
1.4.5 Pediatryczne guzy mózgu (PBT).....	39
1.4.6 Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi (HNSCC).....	41
1.4.7 Gruczolakorak płuc (LUAD).....	43
1.4.8 Rak płaskonabłonkowy płuc (LSCC).....	45
1.4.9 Gruczolakorak przewodu trzustkowego (PDA).....	46
1.4.10 Rak jajnika (OV).....	47
1.4.11 Rak jelita grubego (CRC).....	49
1.4.12 Rak żołądka o wczesnym początku (EOGC).....	51
Rozdział II Założenia i cel pracy.....	54
Rozdział III Materiały i metody.....	55
3.1 Próbki pozyskane od pacjentów.....	55
3.2 Dane kliniczne i molekularne próbek.....	55
3.3 Dane proteogenomiczne.....	56
3.4 Wskaźnik macierzystości powstały w oparciu o ekspresję białek (PROTsi).....	56
3.5 Stratyfikacja typów guzów CPTAC, ich podtypów oraz prawidłowej tkanki sąsiadującej według PROTsi.....	57
3.6 Korelacja ekspresji genów i białek z PROTsi w próbkach nowotworowych.....	57

3.7 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z danymi fosforylacjami.....	58
3.8 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z ekspresją miRNA.....	58
3.9 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością ze zmiennością liczby kopii (CNV).....	59
3.10 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z metylacją DNA.....	59
3.11 Korelacja zidentyfikowanych białek z danymi klinicznymi (OS, PFS).....	59
3.12 Adnotacje dotyczące przynależności zidentyfikowanych białek do rodzin funkcjonalnych.....	60
3.13 Weryfikacja białek związanych z macierzystością w bazie danych aktualnie istniejących białkowych celów lekowych.....	60
3.14 Kategoryzacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością.....	60
3.15 Kryteria wyboru markerów białkowych do walidacji za pomocą IHC.....	61
3.16 Kohorty walidacyjne IHC.....	62
3.17 Immunohistochemia.....	65
3.18 Ewaluacja preparatów IHC.....	67
3.19 Analiza wartości prognostycznej markerów białkowych związanych z macierzystością.....	70
3.20 Analiza połączeń leków (ang. <i>Drug Connectivity Analysis</i>) dla 7 typów nowotworów.....	70
Rozdział IV Wyniki.....	72
4.1 Ocena odróżnicowania onkogenego w analizowanych typach nowotworów.....	72
4.2 Korelacja PROTsi z modyfikacjami potranslacyjnymi - fosforylacją białek.....	73
4.3 Identyfikacja białek związanych z macierzystością i ich korelacja z danymi proteogenomicznymi i klinicznymi.....	75
4.4 Kategoryzacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością.....	83
4.5 Walidacja wyselekcjonowanych markerów białkowych związanych z macierzystością za pomocą immunohistochemii.....	88
4.6 Identyfikacja potencjalnych inhibitorów macierzystości nowotworów.....	92
Rozdział V Dyskusja.....	97

Rozdział VI Wnioski.....	117
Rozdział VII Ograniczenia badania.....	119
Bibliografia.....	120
Opinia Komisji Bioetycznej.....	142

Spis rycin

Rycina 1.1. Liczba zachorowań na nowotwory na całym świecie w 2020 r. według bazy danych GLOBOCAN 2020.....	22
Rycina 1.2. Cechy charakterystyczne raka (ang. <i>Hallmarks of cancer</i>). <i>Źródło: Hanahan D., Cancer Discovery 2022.....</i>	29
Rycina 3.1. Schemat procesu opracowania PROTsi.....	57
Rycina 4.1. Stratyfikacja próbek nowotworowych (T) i próbek tkanek prawidłowych (NAT) za pomocą PROTsi.....	72
Rycina 4.2. Stratyfikacja podtypów molekularnych nowotworów oraz typów histologicznych PBT za pomocą PROTsi.....	73
Rycina 4.3. Stratyfikacja stopnia zaawansowania histologicznego nowotworów przez PROTsi.....	73
Rycina 4.4. Mapy cieplne przedstawiające korelację białek z fosforylacją w 8 typach nowotworów.....	75
Rycina 4.5. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów CCRCC.....	77
Rycina 4.6. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów GBM.....	78
Rycina 4.7. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów HNSCC.....	79
Rycina 4.8. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów LSCC.....	80
Rycina 4.9. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów LUAD.....	81
Rycina 4.10. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów PDA.....	82
Rycina 4.11. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów UCEC.....	83
Rycina 4.12. Kategoryzacja zidentyfikowanych białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością, wspólnych dla analizowanych typów nowotworów.....	84
Rycina 4.13. Kategoryzacja zidentyfikowanych białek negatywnie skorelowanych z macierzystością, wspólnych dla analizowanych typów nowotworów.....	86
Rycina 4.14. Proces walidacji markerów białkowych związanych z macierzystością za pomocą immunohistochemii.....	89

Rycina 4.15. Wzory ekspresji białek związanych z macierzystością określone za pomocą immunohistochemii w guzach pierwotnych CCRCC i HNSCC.....	90
Rycina 4.16. Ocena wartości prognostycznej zidentyfikowanych i zwalidowanych markerów białkowych związanych z macierzystością.....	92
Rycina 4.17. Perturbageny potencjalnie hamujące macierzystość nowotworów.....	93
Rycina 4.18. Cele lekowe dla zidentyfikowanych perturbagenów mających zdolność do hamowania ścieżek związanych z macierzystością nowotworów.....	94
Rycina 4.19. Mechanizmy działania zidentyfikowanych perturbagenów hamujących ścieżki związane z macierzystością nowotworów.....	96

Spis tabel

Tabela 3.1. Charakterystyka kohorty walidacyjnej CCRCC.....	63
Tabela 3.2. Charakterystyka kohorty walidacyjnej HNSCC.....	65
Tabela 3.3. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych do analizy IHC.....	67
Tabela 3.4. Ocena patomorfologiczna preparatów CCRCC wykonana według metodologii H-score.....	68
Tabela 3.5. Ocena patomorfologiczna preparatów HNSCC wykonana według metodologii H-score.....	69
Tabela 4.1. Zidentyfikowane białka pozytywnie skorelowane z macierzystością, specyficzne dla poszczególnych typów nowotworów.....	85
Tabela 4.2. Zidentyfikowane białka negatywnie skorelowane z macierzystością, specyficzne dla poszczególnych typów nowotworów.....	87

Wykaz stosowanych skrótów

ADSSL1	-	ang. <i>Adenylosuccinate synthase 1</i> , syntaza adenylbursztynianu 1
AKT	-	ang. <i>AKT serine/threonine kinase 1</i> , kinaza serynowo-treoninowa AKT1
ALK	-	ang. <i>ALK receptor tyrosine kinase</i> , receptor kinazy tyrozynowej ALK
APC	-	ang. <i>APC regulator of WNT signaling pathway</i> , APC regulator ścieżki sygnałowej WNT
APOBEC	-	ang. <i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide</i> , enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B, polipeptyd katalityczny
ARID1A	-	ang. <i>AT-rich interaction domain 1A</i> , gen supresorowy ARID1A
ATM	-	ang. <i>ATM serine/threonine kinase</i> , kinaza serynowo-treoninowa ATM
ATRT	-	ang. <i>Atypical teratoid rhabdoid tumor</i> , atypowy teratoidalny guz rabdoidalny
AWG	-	ang. <i>Analysis Working Group</i> , grupa robocza ds. analiz CPTAC
BR	-	ang. <i>Breast cancer</i> , rak piersi
BRAF	-	ang. <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> , protoonkogen B-Raf, kinaza serynowo-treoninowa
BRCA1	-	ang. <i>BRCA1 DNA repair associated</i> , BRCA1 związany z naprawą DNA
BRCA2	-	ang. <i>BRCA2 DNA repair associated</i> , BRCA2 związany z naprawą DNA
CCND1	-	ang. <i>Cyclin D1</i> , cyklin D1
CCRCC	-	ang. <i>Clear cell renal cell carcinoma</i> , jasnokomórkowy rak nerki
CD8	-	ang. <i>T-cell surface glycoprotein CD8</i> , glikoproteina powierzchniowa CD8 komórek T
CDH1	-	ang. <i>Cadherin 1</i> , e-kadheryna
CDK	-	ang. <i>Cyclin dependent kinase</i> , kinaza zależna od cyklin
CDKN2A	-	ang. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> , inhibitor 2A kinazy zależnej od cyklin
CIMP	-	ang. <i>CpG Islands Methylator Phenotype</i> , fenotyp metylatora wysp CpG

circRNA	-	ang. <i>Circular RNA</i> , koliste RNA
CNH	-	ang. <i>Copy number high</i> , wysoki poziom liczby kopii
CNL	-	ang. <i>Copy number low</i> , niski poziom liczby kopii
CNV	-	ang. <i>Copy number variation</i> , zmienność liczby kopii
CPTAC	-	ang. <i>Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium</i> , Konsorcjum Analiz Klinicznych Proteomiki Raka
CR	-	ang. <i>Craniopharyngioma</i> , czaszkogardlak
CRC	-	ang. <i>Colorectal cancer</i> , rak jelita grubego
CSCs	-	ang. <i>Cancer stem cells</i> , nowotworowe komórki macierzyste
CTLA4	-	ang. <i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i> , białko 4 związane z cytotoksycznymi limfocytami T
CTNNB1	-	ang. <i>Catenin beta 1</i> , beta-kenina
DCTPP1	-	ang. <i>dCTP pyrophosphatase 1</i> , pirofosfataza dCTP 1
DDX5	-	ang. <i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i> , prawdopodobna zależna od ATP helikaza RNA DDX5
DHRS11	-	ang. <i>Dehydrogenase/reductase 11</i> , dehydrogenaza/reduktaza 11
DHX9	-	ang. <i>ATP-dependent RNA helicase A</i> , helikaza RNA A zależna od ATP
DIPG	-	ang. <i>Diffuse intrinsic pontine glioma</i> , rozlany glejak śródmózgowia
DNA	-	ang. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , kwas deoksyrybonukleinowy
DYSF	-	ang. <i>Dysferlin</i> , dysferlina
EGF	-	ang. <i>Epidermal growth factor</i> , naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR	-	ang. <i>Epidermal growth factor receptor</i> , receptor naskórkowego czynnika wzrostu
EMT	-	ang. <i>Epithelial - mesenchymal transition</i> , przejście epithelialno-mezenchymalne
EOC	-	ang. <i>Epithelial ovarian carcinoma</i> , nabłonkowy rak jajnika
EOGC	-	ang. <i>Early-onset gastric cancer</i> , rak żołądka o wczesnym początku
EP	-	ang. <i>Ependymoma</i> , wyściółczak
ER	-	ang. <i>Estrogen receptor</i> , receptor estrogenu
ESC	-	ang. <i>Embryonic stem cells</i> , embrionalne komórki macierzyste
ESRP2	-	ang. <i>Epithelial Splicing Regulatory Protein 2</i> , nabłonkowe białko regulatorowe splicingu 2
FDA	-	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Agencja ds. Żywności i leków

FFPE	-	ang. <i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i> , utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie
FGF	-	ang. <i>Fibroblast growth factor</i> , czynnik wzrostu fibroblastów
FGFR	-	ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i> , receptor czynnika wzrostu fibroblastów
FIGO	-	ang. <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> , Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa
GATA3	-	ang. <i>GATA binding protein 3</i> , białko 3 wiążące GATA
GBM	-	ang. <i>Glioblastoma multiforme</i> , glejak wielopostaciowy
H2B	-	ang. <i>Histone H2B</i> , histon H2B
HEATR1	-	ang. <i>HEAT repeat containing protein 1</i> , białko 1 zawierające powtórzenia HEAT
HER2	-	ang. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> , receptor 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
HGG	-	ang. <i>High grade glioma</i> , glejak o wysokim stopniu zaawansowania
HGOC	-	ang. <i>High grade ovarian carcinoma</i> , rak jajnika o wysokim stopniu zaawansowania
HIF1	-	ang. <i>Hypoxia Inducible Factor 1</i> , czynnik indukujący hipoksję 1
HipSci	-	ang. <i>Human Induced Pluripotent Stem Cells Initiative</i> , Konsorcjum Inicjatywy na rzecz Ludzkich Indukowanych Pluripotencjalnych Komórek Macierzystych
HNSCC	-	ang. <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> , płaskonabłonkowy rak głowy i szyi
HPV	-	ang. <i>Herpes Papilloma Virus</i> , wirus brodawczaka ludzkiego
HR	-	ang. <i>Hazard ratio</i> , współczynnik ryzyka
IARC	-	ang. <i>International Agency for Research on Cancer</i> , Międzynarodowa Agencja Badań Nad Rakiem
ICPC	-	ang. <i>International Cancer Proteogenome Consortium</i> , Międzynarodowe Konsorcjum Proteogenomu Raka
IDH	-	ang. <i>Isocitrate dehydrogenase (NADP(+))</i> , dehydrogenaza izocyjanianowa (NADP(+))
IDO1	-	ang. <i>Indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i> , 2,3-dioksygenaza indoloaminowa 1
IHC	-	ang. <i>Immunohistochemistry</i> , immunohistochemia

iPSC	-	ang. <i>Induced pluripotent stem cells</i> , indukowane pluripotentne komórki macierzyste
KEAP1	-	ang. <i>Kelch like ECH associated protein 1</i> , Kelch-podobne białko 1 związane z ECH
KLC3	-	ang. <i>Kinesin light chain 3</i> , łańcuch lekki kinezyiny 3
KRAS	-	ang. <i>KRAS proto-oncogene</i> , protoonkogen KRAS
LATS1	-	ang. <i>Serine/threonine-protein kinase LATS1</i> , kinaza serynowo-treoninowa LATS1
LC-MS	-	ang. <i>Liquid chromatography mass spectrometry</i> , chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas
LC-MS/MS	-	ang. <i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> , chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
LGG	-	ang. <i>Low grade glioma</i> , glejak o niskim stopniu zaawansowania
LGOC	-	ang. <i>Low grade ovarian carcinoma</i> , rak jajnika o niskim stopniu zaawansowania
lncRNA	-	ang. <i>Long non-coding RNA</i> , długie niekodujące RNA
LSCC	-	ang. <i>Lung squamous cell carcinoma</i> , płaskonabłonkowy rak płuc
LUAD	-	ang. <i>Lung adenocarcinoma</i> , gruczolakorak płuc
MAPK	-	ang. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> , kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MB	-	ang. <i>Medulloblastoma</i> , rdzeniak zarodkowy
MET	-	ang. <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i> , protoonkogen MET, receptorowa kinaza tyrozynowa
MGMT	-	ang. <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> , metylotransferaza DNA O-6-metyloguaniny
miRNA	-	ang. <i>MicroRNA</i> , mikroRNA
ML	-	ang. <i>Machine learning</i> , uczenie maszynowe
MLH1	-	ang. <i>MutL homolog 1</i> , homolog 1 genu <i>MutL E. coli</i>
MMR	-	ang. <i>DNA mismatch repair</i> , system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów
mRNA	-	ang. <i>Messenger RNA</i> , matrycowy RNA
mRNAsi	-	ang. <i>mRNA expression-based stemness index</i> , wskaźnik macierzystości oparty o ekspresję mRNA

MCM	-	ang. <i>Minichromosome maintenance proteins</i> , białka z rodziny MCM
MSH2	-	ang. <i>MutS homolog 2</i> , homolog 2 genu <i>MutS E. coli</i> , składnik systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów
MSH6	-	ang. <i>MutS homolog 6</i> , homolog 6 genu <i>MutS E. coli</i> , składnik systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów
MSI	-	ang. <i>Microsatellite instability</i> , niestabilność mikrosatelitarna
mTOR	-	ang. <i>Mammalian target of rapamycin kinase</i> , ssaczy cel rapamycyny, kinaza treoninowo-serynowa
MYC	-	ang. <i>MYC proto-oncogene</i> , protoonkogen MYC
NAT	-	ang. Normal adjacent tissue, prawidłowa tkanka sąsiadująca
NCI	-	ang. <i>National Cancer Institute</i> , Narodowy Instytut Raka
NF1	-	ang. <i>Neurofibromin 1</i> , neurofibromina 1
NGS	-	ang. <i>Next-generation sequencing</i> , sekwencjonowanie nowej generacji
NMF	-	ang. <i>Non-negative matrix factorization</i> , faktoryzacja macierzy nieujemnej
NSCLC	-	ang. <i>Non-small cell lung carcinoma</i> , drobnokomórkowy rak płuc
NOL11	-	ang. <i>Nucleolar protein 11</i> , białko jąderkowe 11
OCLR	-	ang. <i>One-class logistic regression</i> , jednoklasowa regresja logistyczna
OS	-	ang. <i>Overall survival</i> , przeżycie całkowite
OV	-	ang. <i>Ovarian cancer</i> , rak jajnika
PALB2	-	ang. <i>Partner and localizer of BRCA2</i> , partner i lokalizator BRCA2
PAK1	-	ang. <i>p21 (RAC1) activated kinase 1</i> , kinaza 1 aktywowana p21 (RAC1)
PAK2	-	ang. <i>p21 (RAC1) activated kinase 2</i> , kinaza 2 aktywowana p21 (RAC1)
PARP	-	ang. <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i> , polimeraza poli(ADP-rybozy)
PBT	-	ang. <i>Pediatric brain tumors</i> , pediatryczne guzy mózgu
PCBC	-	ang. <i>Progenitor Cell Biology Consortium</i> , Konsorcjum Biologii Komórek Progenitorowych
PD-1	-	ang. <i>Programmed cell death protein 1</i> , białko 1 programowanej śmierci komórki

PD-L1	-	ang. <i>Programmed cell death 1 ligand 1</i> , ligand 1 programowanej śmierci komórki 1
PDA	-	ang. <i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , gruczolakorak trzustki
PFS	-	ang. <i>Progression free survival</i> , przeżycie wolne od progresji choroby
PI3K-AKT	-	ang. <i>PI3K-AKT signaling pathway</i> , ścieżka sygnałowa PI3K-AKT
PIK3CA	-	ang. <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> , 3-kinaza fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu podjednostka katalityczna alfa
PMS2	-	ang. <i>PMS1 homolog 2</i> , składnik systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów
POLE	-	ang. <i>DNA polymerase epsilon</i> , polimeraza DNA epsilon
PR	-	ang. <i>Progesterone receptor</i> , receptor progesteronu
PROTsi	-	ang. <i>Protein expression-based stemness index</i> , wskaźnik macierzystości oparty o ekspresję białek
PTEN	-	ang. <i>Phosphatase and tensin homolog</i> , homolog fosfatazy i tensyny
PTM	-	ang. <i>Post-translational modification</i> , modyfikacja potranslacyjna białek
QKI	-	ang. <i>KH domain-containing RNA-binding protein QKI</i> , białko QKI wiążące RNA i zawierające domenę KH
REX1	-	ang. <i>REX1 transcription factor</i> , czynnik transkrypcyjny REX1
RHOA	-	ang. <i>Ras Homolog Family Member A</i> , członek rodziny homologów Ras A
RIPK3	-	ang. <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i> , kinaza serynowo-treoninowa 3 oddziałująca z receptorem
RNA	-	ang. <i>Ribonucleic acid</i> , kwas rybonukleinowy
RNAseq	-	ang. <i>RNA sequencing</i> , sekwencjonowanie RNA
ROS1	-	ang. <i>ROS proto-oncogene 1</i> , receptor tyrosine kinase, ROS protoonkogen 1, receptorowa kinaza tyrozynowa
RUVBL1	-	ang. <i>RuvB-like 1</i> , białko RuvB-podobne 1
RUVBL2	-	ang. <i>RuvB-like 2</i> , białko RuvB-podobne 2
SLC27A2	-	ang. <i>SLC27A2 solute carrier family 27 member 2</i> , syntaza bardzo długołańcuchowych acylo-CoA

SLK	-	ang. <i>STE20-like serine/threonine-protein kinase</i> , STE-20-podobna kinaza serynowo-treoninowa
SMAD4	-	ang. <i>SMAD Family Member 4</i> , członek rodziny SMAD 4
SMC2	-	ang. <i>Structural maintenance of chromosomes protein 2</i> , białko SMC2
SMC4	-	ang. <i>Structural maintenance of chromosomes protein 4</i> , białko SMC4
SNRNP200	-	ang. <i>Small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200</i> , mała jądrowa rybonukleoproteina U5 podjednostka 200
SOS1	-	ang. <i>SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1</i> , czynnik wymiany nukleotydów guaninowych 1 SOS Ras/Rac
SOX2	-	ang. <i>SRY-Box Transcription Factor 2</i> , czynnik transkrypcyjny SOX2
SRRM2	-	ang. <i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i> , serynowo-argininowe powtarzalne białko macierzy 2
STAT3	-	ang. <i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i> , transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 3
STK11	-	ang. <i>Serine/threonine kinase 11</i> , kinaza serynowo-treoninowa 11
TBC1D17	-	ang. <i>TBC1 domain family member 17</i> , 17 członek rodziny domen TBC1
TCGA	-	ang. <i>The Cancer Genome Atlas</i> , Atlas Genomu Raka
TGF- β	-	ang. <i>Transforming growth factor beta</i> , transformujący czynnik wzrostu beta
TNBC	-	ang. <i>Triple-negative breast cancer</i> , potrójnie negatywny rak piersi
TNIK	-	ang. <i>TRAF2 and NCK-interacting protein kinase</i> , kinaza oddziałująca z TRAF2 i NCK
TP53	-	ang. <i>Tumor Protein P53</i> , gen kodujący białko p53
UCEC	-	ang. <i>Uterine corpus endometrial carcinoma</i> , rak endometrialny trzonu macicy
UCHL1	-	ang. <i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1</i> , C-końcowa hydrolaza L1 ubikwityny
UHRF1	-	ang. <i>E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1</i> , białko UHRF1 - ligaza E3 ubikwityny

- UTP15 - ang. *U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog*,
homolog 15 U3 małego jąderkowego białka związanego z RNA
- VEGF - ang. *Vascular endothelial growth factor A*,
naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A
- WHO - ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia
- WNT - ang. *WNT signaling pathway*, ścieżka sygnałowa WNT

Streszczenie w j. polskim

W ciągu ostatniej dekady pojawiło się coraz więcej dowodów wskazujących na to, że progresja i oporność terapeutyczna w nowotworach są silnie związane z nabywaniem fenotypu macierzystości przez komórki nowotworowe. Chociaż dziedzina onkologii wciąż się rozwija, nadal istnieje pilna potrzeba odkrycia nowych biomarkerów i celów lekowych dla spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej. Wcześniejsze badania łączące genomikę z molekularnymi mechanizmami rozwoju nowotworów wskazują na wciąż istniejącą lukę w wiedzy. W celu przewyższenia istniejących ograniczeń, niniejsza praca łączy koncept macierzystości nowotworów z proteomiką, która dodaje nową warstwę molekularnego wglądu w mechanizmy napędzające progresję raka. W tym badaniu zastosowano nowy, oparty na ekspresji białek indeks macierzystości (PROTsi) do oceny stopnia odróżnicowania onkogennego, który jest związany z cechami histopatologicznymi guza i wynikami klinicznymi pacjentów z nowotworami. Analizowane dane próbek guzów zostały zebrane dla Klinicznego Konsorcjum Analiz Proteomiki Raka (*Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium, CPTAC*) z dwunastu typów guzów pierwotnych: raka piersi, raka jasnokomórkowego nerki, raka endometrium, glejaka wielopostaciowego, dziecięcych guzów mózgu, raka głowy i szyi, gruczolakoraka płuc, raka płaskonabłonkowego płuc, gruczolakoraka trzustki, gruczolakoraka okrężnicy, raka jajnika i raka żołądka o wczesnym początku. Integracja indeksu macierzystości opracowanego przy użyciu danych proteomicznych z ekspresją genów, metylacją DNA, ekspresją mikroRNA, zmianami liczby kopii i modyfikacjami potranslacyjnymi białek zidentyfikowała wyraźną asocjację proteogenomiki z macierzystością i wskazała, że białka odgrywają rolę aktywnych węzłów ścieżek sygnalizacyjnych i sieci transkrypcyjnych napędzających agresywność pierwotnych guzów, które powodują progresję nowotworu i oporność na istniejące terapie. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem macierzystości a ekspresją białek doprowadziła do identyfikacji potencjalnych celów farmakologicznych dla terapii przeciwnowotworowej zarówno specyficznych dla danego guza, jak i wspólnych dla różnych typów nowotworów. Ponadto, zidentyfikowane białka związane z macierzystością mają wartość predykcyjną dla wyników klinicznych we wszystkich analizowanych typach guzów. Ostatecznie, zestaw białek związanych z macierzystością został zwalidowany za pomocą immunohistochemii w niezależnych próbkach, aby potwierdzić związek z wynikami klinicznymi pacjentów. Walidacja przeprowadzona dla próbek jasnokomórkowego raka nerki oraz raka płaskonabłonkowego głowy i szyi wskazała, że PROTsi jest skutecznym narzędziem do selekcji białek o wartości

predykcyjnej, co jest niezbędnym krokiem do dopasowania terapii przeciwnowotworowej oraz do klinicznego rozwoju skutecznych leków dla pacjentów z nowotworami.

Streszczenie w j. angielskim

“Molecular analyses of oncogenic differentiation using proteogenomic data sets obtained from 12 tumor types”

Over the past decade there has been growing evidence indicating that progression and therapeutic resistance in cancer have been strongly associated with the acquisition of a stemness phenotype by cancer cells. Although the oncology field continues to evolve, there is still an urgent need to discover new biomarkers and drug targets for personalized anti-cancer therapy. Previous studies linking genomics with the molecular mechanisms of cancer development point to a knowledge gap that still exists. To overcome the existing limitations, this study links cancer stemness concept with proteomics that adds a new layer of molecular insight into mechanisms driving cancer progression. In this study, a new protein expression-based stemness index (PROTsi) was applied to assess the degree of oncogenic dedifferentiation that is associated with tumor histopathology features and clinical outcome in tumor samples. The data for analyzed tumor samples were collected for the Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) from twelve types of primary tumors: breast cancer, clear cell renal cell carcinoma, endometrial cancer, glioblastoma multiforme, pediatric brain tumors, head and neck cancer, lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, pancreatic ductal carcinoma, colorectal cancer, ovarian cancer, early-onset gastric carcinoma. Integration of the stemness index computed using proteomic data with gene expression, DNA methylation, microRNA, copy number alteration and protein post-translational modification identified coherent proteogenomic stemness association and indicated that proteins play a role of active nodes of signaling pathways and transcriptional networks that drive aggressiveness of the primary tumors that cause cancer progression and resistance to existing therapies. The correlation between the stemness index and protein expression led to the identification of potential drug targets for anti-cancer therapy both tumor-specific and shared among different tumor types. Moreover, the identified stemness-associated proteins carry a predictive value of clinical outcome across analyzed tumor types. Eventually, a set of stemness-associated protein targets were validated by immunohistochemistry in independent samples to confirm the association with patients' clinical outcome. The validation carried out for clear cell renal cell carcinoma and head and neck squamous cell carcinoma samples indicated that PROTsi is an effective tool for predictive protein target selection that is an essential step to tailor the anti-cancer therapy and for clinical development of effective cures for cancer patients.

Rozdział I

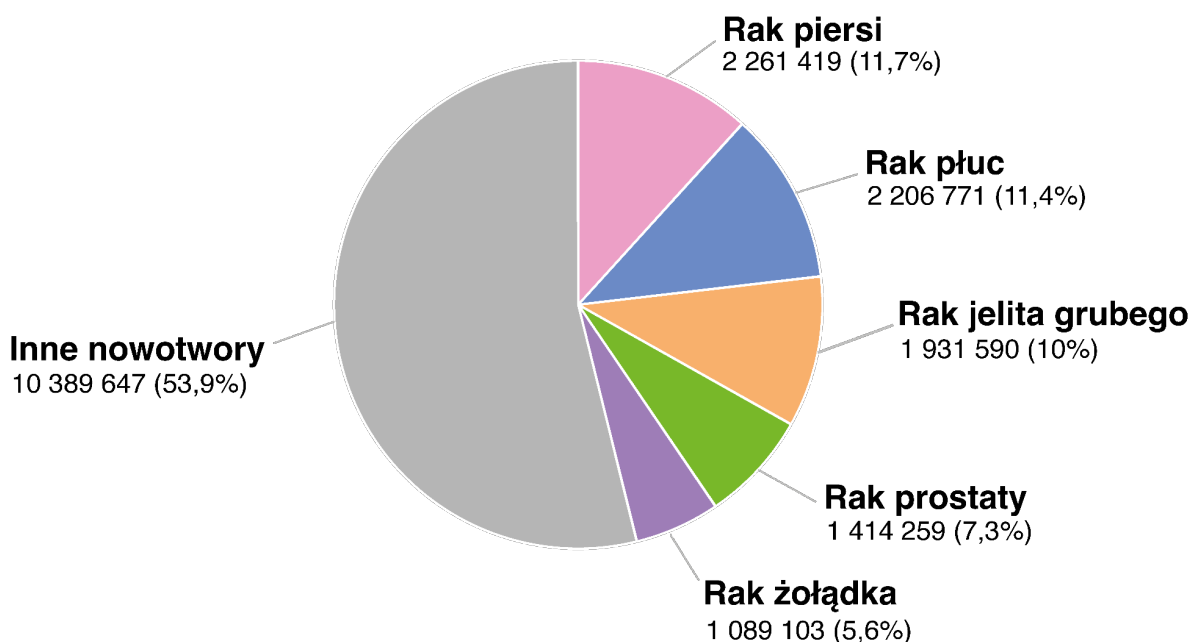
Wstęp

1.1 Misja Konsorcjum Klinicznych Analiz Proteomiki Raka

W erze dynamicznego rozwoju cywilizacyjnego i niezwykłego postępu w różnych dziedzinach, narasta niepokój, gdy dochodzi do konfrontacji z coraz bardziej przygnębiającymi statystykami dotyczącymi głównej przyczyny śmiertelności we współczesnym społeczeństwie - nowotworów.

Według bazy danych GLOBOCAN 2020 udostępniającej szacunki dotyczące globalnego obciążenia chorobami nowotworowymi w ramach Globalnego Obserwatorium Nowotworów Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), w 2020 roku na raka zachorowało niemal 20 milionów ludzi na całym świecie (Rycina 1.1.), natomiast u 10 milionów ludzi choroba nowotworowa doprowadziła do zgonu (1).

Liczba zachorowań na nowotwory w 2020 r. wg GLOBOCAN 2020



Łącznie: 19 292 789 zachorowań w 2020 r.

Rycina 1.1. Liczba zachorowań na nowotwory na całym świecie w 2020 r. według bazy danych GLOBOCAN 2020

Z kolei skupiając się na danych dotyczących nowotworów w Polsce, Krajowy Rejestr Nowotworów podaje, iż w 2020 r. na nowotwory zachorowało prawie 148 tysięcy Polaków, a z ich przyczyny zmarło 100 tysięcy osób, podczas gdy 10 lat wcześniej liczba zachorowań wynosiła niemal 146 tysięcy, a zgony odnotowano w liczbie blisko 93 tysięcy (2). Dane statystyczne zatem wyraźnie wskazują na to, że na przestrzeni lat na nowotwory w Polsce choruje coraz więcej osób, a liczba zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi również wzrasta.

Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom współczesnego świata zmagającego się z chorobami nowotworowymi, Narodowy Instytut Raka (ang. *National Cancer Institute*, NCI) w Stanach Zjednoczonych powołał w 2011 r. Konsorcjum Analiz Klinicznych Proteomiki Raka (ang. *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium*, CPTAC) w celu zrozumienia molekularnych podstaw powstawania i progresji nowotworów oraz odkrycia nowych biomarkerów nowotworowych za pomocą wielkoskalowych analiz proteomów i genomów, czyli proteogenomiki (3). NCI starało się wykorzystać wyniki sekwencjonowania guzów u pacjentów pozyskane w ramach programu zwanego Atlasem Genomu Raka (ang. *The Cancer Genome Atlas*, TCGA) i rozszerzyć go o dane proteomiczne ze względu na to, iż proteomika odkrywa sekwencję i ilość białek, w tym identyfikację i ilościowe oznaczenie modyfikacji potranslacyjnych (ang. *Post-translational modifications*, PTMs), które mogą być krytyczne dla szlaków i sieci sygnalizacji komórkowej zaangażowanych w nowotworzenie. Program CPTAC był pierwszym międzynarodowym projektem, którego pierwotny wysiłek skupił się na zintegrowanej analizie proteogenomicznej raka jelita grubego, raka piersi i raka jajnika, co umożliwiło odkrycie nowych aspektów dotyczących tych typów nowotworów, takich jak identyfikacja podtypów opartych na proteomie oraz mutacji kierujących poprzez analizę korelacji zmian liczby kopii i ilości białek oraz zrozumienie istotnych dla nowotworu ścieżek sygnałowych poprzez analizę modyfikacji potranslacyjnych (4–6).

Zagłębiając się w proteogenomikę nowotworów, CPTAC kontynuuje charakterystykę kolejnych typów raka, przyczyniając się do rozwoju spersonalizowanej onkologii, której celem jest przyspieszenie i zwiększenie trafności i skuteczności diagnostyki oraz odpowiedni dobór terapii do leczenia pacjentów (7). Cel ten udaje się osiągnąć dzięki skoordynowanym wysiłkom ośrodków rekrutujących pacjentów do programu CPTAC, ośrodków charakteryzacji proteomu, ośrodków badań translacyjnych w dziedzinie proteogenomiki oraz ośrodków analizy danych proteogenomicznych (8). Ponadto, Międzynarodowe Konsorcjum Proteogenomu Raka

(ang. *International Cancer Proteogenome Consortium*, ICPC) jako partner CPTAC ułatwia współpracę ponad 10 krajów w zakresie badania powszechnie diagnozowanych nowotworów w ich unikalnych populacjach w celu poprawy precyzyjnej onkologii i dzielenia się zebranych danymi z naukowcami i lekarzami na całym świecie, udostępniając wraz z CPTAC dane proteogenomiczne, kliniczne i obrazowe jako publiczne zasoby (9).

1.2 Proteomika

Proteomika, będąca dziedziną badającą białka, obejmuje identyfikację, kwantyfikację (ilościowe oznaczenie) i modyfikację potranslacyjną białek wraz z innymi istotnymi informacjami dotyczącymi białek w tkance, komórce bądź płynie biologicznym (10). Proteom natomiast stanowi cały zbiór białek produkowanych lub modyfikowanych przez organizm lub system. Termin proteom po raz pierwszy został opisany i zdefiniowany w 1994 roku przez Marca Wilkinsa (11). Proteomika opiera się na przełomowych innowacjach w bioinformatyce i chromatografii cieczowej związanej z spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC-MS), która obecnie przechodzi liczne modyfikacje (np. chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas, LC-MS/MS) w zależności od potrzeb detekcyjnych i analitycznych oraz dostępności nowych technologii (12–14).

Z uwagi na to, iż proteomika doskonale uzupełnia wiedzę pozyskaną z analiz genomicznych, warto przyjrzeć się kilku aspektom, które podkreślają wartość proteomiki w badaniach i jasno wskazują na jej niewątpliwe zalety.

Przede wszystkim, proteomika dostarcza informacji funkcjonalnych. Białka są odpowiedzialne za wykonywanie większości funkcji komórkowych, takich jak aktywność enzymatyczna, sygnalizacja i organizacja strukturalna. Proteomika zatem umożliwia naukowcom badanie funkcjonalnych aspektów białek, w tym ich aktywności, modyfikacji i interakcji, co zapewnia wgląd w rzeczywiste mechanizmy leżące u podstaw procesów biologicznych - zarówno fizjologicznych, jak i patofizjologicznych (15,16). Z kolei genomika skupia się na informacji o kodzie genetycznym (17), ale niekoniecznie ujawnia funkcjonalne role samych genów lub wytwarzanych przez nie białek, co następuje w przypadku proteomiki (18).

Co więcej, poziomy ekspresji białek nie zawsze korelują z poziomami ekspresji genów (19,20). Podczas gdy genomika skupia się na badaniu sekwencji DNA i ekspresji genów, proteomika zajmuje się badaniem białek, które są funkcjonalnymi cząsteczkami

w komórkach. Białka są syntetyzowane z genów, ale na ich poziom i aktywność wpływają różne modyfikacje potranslacyjne, interakcje białko-białko i inne czynniki (21). Dlatego proteomika zapewnia bardziej bezpośredni i dokładny pomiar stanu funkcjonalnego komórek lub tkanek w porównaniu do genomiki, ponieważ dostarcza informacji o rzeczywistych białkach, które wykonują liczne zadania w komórce (22).

Dodatkowo, proteomika pozwala naukowcom badać interakcje międzybiałkowe, które są krytyczne dla wielu procesów komórkowych. Białka często funkcjonują w kompleksach lub wchodzi w interakcje z innymi białkami, aby wykonywać swoje funkcje biologiczne. Badanie interakcji białko-białko może zapewnić wgląd w mechanizmy molekularne leżące u podstaw procesów komórkowych i pomóc zrozumieć złożoność sieci komórkowych (23,24). Z drugiej strony, genomika zwykle dostarcza informacji o poszczególnych genach, ale niekoniecznie o ich interakcjach z innymi genami lub białkami, choć nadal wykorzystuje się genomikę do przewidywania interakcji gen - białko i białko - białko (25,26). Niemniej jednak, korzystając z nowoczesnych technologii umożliwiających badanie interakcji między białkami w oparciu o proteomikę, otrzymuje się znacznie dokładniejsze i bardziej rzetelne dane (27).

Kolejnym niezwykle istotnym aspektem dotyczącym proteomiki jest jej zastosowanie kliniczne. Proteomika ma szeroki zakres zastosowań w badaniach klinicznych i diagnostyce. Profilowanie proteomiczne próbek pacjentów, takich jak krew lub tkanki, jest szeroko stosowanym narzędziem do identyfikacji biomarkerów białkowych w celu diagnozy choroby, prognozy i monitorowania odpowiedzi na leczenie (28). Proteomika jest wykorzystywana w badaniach nad nowotworami, chorobami układu krążenia, chorobami neurodegeneracyjnymi i innymi schorzeniami oraz wykazuje obiecujący potencjał w rozwoju medycyny spersonalizowanej i poprawie opieki nad pacjentami (29–34).

Wspominając o proteomicie pod kątem opracowywania nowych biomarkerów, należy też podkreślić jej kluczową rolę w odkrywaniu i rozwoju substancji leczniczych. Techniki proteomiczne, a zwłaszcza proteomika oparta na spektrometrii mas, mogą być wykorzystywane do identyfikacji i walidacji celów (targetów) dla leków, badania interakcji lek-białko oraz oceny skuteczności leków w badaniach przedklinicznych i klinicznych (35,36). Proteomika pomaga również odkrywać mechanizmy oporności na leki, a co za tym idzie, ułatwia rozwój spersonalizowanych terapii (37–39). Proteomika zatem dostarcza bezpośrednio informacji o potencjalnych celach lub mechanizmach działania leków, podczas gdy genomika daje jedynie wgląd w genetyczne podłoże chorób.

Należy pamiętać, że zarówno proteomika, jak i genomika są komplementarne i mają swoje mocne strony i ograniczenia. Wybór pomiędzy proteomiką a genomiką zależy od konkretnego pytania badawczego lub zastosowania, a często zintegrowane podejście łączące obie dziedziny może zapewnić bardziej wszechstronne zrozumienie procesów biologicznych.

Kładąc szczególny nacisk na analizy proteomiczne, które - jak wcześniej wspomniano - doskonale wspomagają analizy genomiczne, w ramach programu CPTAC wykorzystuje się zintegrowane podejście, czyli analizę proteogenomiczną. Do tej pory, w ramach programu CPTAC wykonano wielkoskalowe analizy proteogenomiczne m.in. dla raka piersi (37), raka nerki (40), raka endometrium (41), glejaka wielopostaciowego (42), pediatrycznych guzów mózgu (43), raka głowy i szyi (44), gruczolakoraka płuc (38), raka płaskonabłonkowego płuc (45), gruczolakoraka okrężnicy (46), raka jajnika (47), gruczolakoraka trzustki (48), raka żołądka we wczesnym stadium (49) czy też raka wątroby związanego z HBV (50). Dane proteogenomiczne uzyskane dla części wymienionych powyżej typów nowotworów zostały wykorzystane w niniejszej pracy i zostaną omówione w dalszych rozdziałach rozprawy doktorskiej.

1.3 Macierzystość nowotworów

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że macierzystość/ odróżnicowanie onkogenne odgrywa kluczową rolę w procesie powstawania i progresji nowotworów (51–53). Połączenie analiz proteomicznych z macierzystością nowotworów może dostarczyć wgląd w do tej pory nieodkryte mechanizmy molekularne leżące u podstaw progresji nowotworowej poprzez identyfikację i ilościowe oznaczenie białek, które ulegają różnej ekspresji lub są modyfikowane potranslacyjnie w komórkach macierzystych nowotworu w porównaniu z komórkami nowotworowymi niebędącymi komórkami macierzystymi nowotworu lub komórkami prawidłowymi. Porównując proteomy komórek macierzystych raka i komórek raka o niższym poziomie macierzystości, możliwa jest identyfikacja specyficznych białek i ścieżek sygnałowych, które są związane z macierzystością i progresją nowotworów (54,55).

Macierzystość odnosi się do unikalnych cech i właściwości wykazywanych przez komórki macierzyste, które umożliwiają im samoodnawianie i różnicowanie się w różne typy komórek w organizmie. Komórki macierzyste to niezróżnicowane komórki, które mają potencjał, aby rozwinąć się w wyspecjalizowane typy komórek, takie jak między innymi neurony, komórki mięśniowe i komórki krwi (56). Komórki macierzyste znane są

ze swojej zdolności do regeneracji i naprawy uszkodzonych tkanek, co czyni je między innymi tematem zainteresowania w medycynie regeneracyjnej i szeroko pojętych badaniach biomedycznych (57–59). Wyróżnia się następujące cechy związane z macierzystością:

- zdolność do samoodnawiania - komórki macierzyste mogą się dzielić i wytwarzać identyczne kopie samych siebie, co pozwala na długotrwałe utrzymanie ich puli i zachowanie niezróżnicowanego stanu,
- różnicowanie - komórki macierzyste mogą różnicować się w wyspecjalizowane typy komórek o odrębnych funkcjach i cechach, dając początek różnym tkankom i narządom w organizmie,
- pluripotencja i multipotencja - komórki macierzyste mogą różnicować się w wiele typów komórek (pluripotencja) lub ograniczone typy komórek (multipotencja) w zależności od ich etapu rozwojowego i linii komórkowej,
- uśpienie - komórki macierzyste mogą pozostawać w stanie uśpienia do momentu aktywacji, co pozwala im na utrzymywanie się w tkankach i reagowanie na urazy lub inne czynniki stresowe,
- ekspresja markerów macierzystości - komórki macierzyste często charakteryzuje ekspresja specyficznych markerów molekularnych, takich jak Oct4, Sox2 i Nanog, które są związane z ich niezróżnicowanym stanem i zdolnością do samoodnawiania (60–65).

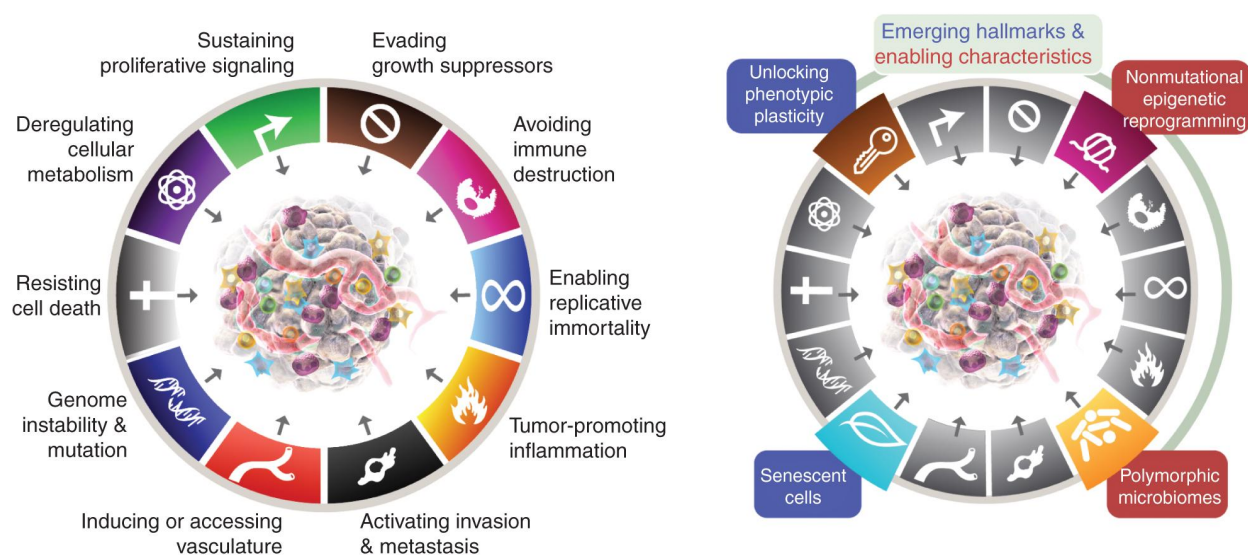
Podczas gdy dorosłe komórki macierzyste wykazują powyższe właściwości uczestnicząc w podtrzymywaniu homeostazy tkanek, nowotworowe komórki macierzyste (ang. *Cancer stem cells*, CSCs) zachowują się jak ich złośliwe odpowiedniki. Komórki nowotworowe rozwijają wszystkie cechy macierzystości i, w przeciwieństwie do fizjologicznej roli komórek macierzystych, podtrzymują progresję choroby nowotworowej (66). Cechy macierzystości wspólne dla prawidłowych komórek macierzystych i macierzystych komórek nowotworowych stanowią podstawę rozwoju i przetrwania nowotworu, od potencjału samoodnawiania i różnicowania do organizacji mikrośrodowiska nowotworu wspierającego macierzystość (67–69). Nowotworowe komórki macierzyste tworzą niewielkie populacje w obrębie nowotworu. Mając właściwości macierzyste, utrzymują progresję nowotworu poprzez zwiększoną zdolność do samoodnowy, klonowania, wzrostu, przerzutów czy też replifikacji. Co więcej,

wykazują one niezwykle zdolności organizacyjne, ponieważ mogą wpływać na sąsiadujące komórki, aby te dostarczały odpowiednich składników odżywczych i współpracowały w ucieczce przed układem odpornościowym, tworząc środowisko korzystne dla wzrostu guza. Macierzyste komórki nowotworowe dają początek heterogennym populacjom komórek, często o wysokim potencjale plastyczności, wysokiej odporności na czynniki stresogenne w mikrośrodku guza (takie jak niski poziom tlenu lub brak składników odżywczych) lub na indukcję śmierci komórek przez chemioterapeutyki, a także mające zdolność uśpienia jako powszechnej odpowiedzi na niekorzystne warunki (70,71).

Progresja nowotworu polega na stopniowej utracie zróżnicowanego fenotypu i prawidłowej architektury tkanek przy jednoczesnym nabywaniu cech progenitorowych, przypominających komórki macierzyste (51). Stopniowa utrata zdolności różnicowania i nabywanie cech komórek macierzystych są ważnymi czynnikami odpowiedzialnymi za progresję nowotworów (72). Z roku na rok odkrywanych jest coraz więcej cech genomowych, epigenomowych, transkryptomicznych i proteomicznych, które wykazują istotny związek z macierzystością nowotworów. Te cechy molekularne są powiązane przyczynowo z określonymi onkogennymi ścieżkami sygnalizacyjnymi, które regulują sieci transkrypcyjne podtrzymujące wzrost i proliferację komórek nowotworowych. Deregulacja transkrypcyjna i epigenetyczna komórek nowotworowych często prowadzi do onkogenego odróżnicowania i nabycia cech macierzystości poprzez zmianę podstawowych szlaków sygnałowych regulujących fenotypy prawidłowych komórek macierzystych (51). Połączenie koncepcji macierzystości nowotworów z proteomiką, na którym to skupia się niniejsza praca, umożliwi rozwój naszego zrozumienia mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za cechy macierzystości nowotworów poprzez dostarczanie wiedzy na temat ekspresji, modyfikacji, interakcji i funkcji białek w komórkach macierzystych nowotworów. Wiedza ta może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na komórki macierzyste nowotworów, które mogą potencjalnie poprawić wyniki leczenia nowotworów.

W 2000 roku Hanahan i Weinberg zaproponowali sześć cech charakterystycznych raka (ang. *Hallmarks of cancer*) będących zdolnościami biologicznymi nabytymi podczas wieloetapowego rozwoju ludzkich guzów, które w 2011 roku zostały uzupełnione i kompleksowo omówione (52,73), a następnie w 2022 roku zostały rozszerzone do ośmiu zdolności i dwóch zdolności wspomagających (53). Aktualnie, Hanahan wyróżnia następujące cechy charakterystyczne raka: nabyte zdolności do podtrzymywania proliferacyjnej sygnalizacji, unikanie supresorów wzrostu, opieranie się śmierci

komórkowej, umożliwianie replikacyjnej nieśmiertelności, indukowania i dostępu do naczyń krwionośnych, aktywowanie inwazji i przerzutów, przeprogramowywanie metabolizmu komórkowego i unikanie destrukcji immunologicznej oraz deregulacja metabolizmu komórkowego i unikanie zniszczenia immunologicznego (Rycina 1.2. po lewej). W swoim najnowszym opracowaniu, Hanahan zaproponował dodatkowe cechy charakterystyczne dla raka, czyli odblokowanie plastyczności fenotypowej, niemutacyjne epigenetyczne przeprogramowanie, polimorficzne mikrobiomy i senescencja (starzenie się) komórek (Rycina 1.2. po prawej) (53).



Rycina 1.2. Cechy charakterystyczne raka (Hallmarks of cancer). Źródło: Hanahan D, *Cancer Discovery* 2022 (53)

Macierzystość nowotworów wiąże się z kilkoma wyżej wymienionymi cechami charakterystycznymi dla raka, w tym:

- trwałą proliferacją - komórki macierzyste nowotworów mogą stale dzielić się i dawać początek nowym komórkom nowotworowym, co prowadzi do trwałego wzrostu guza,
- unikaniem apoptozy - komórki macierzyste raka mogą opierać się zaprogramowanej śmierci komórki, co pozwala im przetrwać i kontynuować podziały,

- angiogenezą - komórki macierzyste nowotworu mogą wydzielać czynniki, które promują wzrost nowych naczyń krwionośnych, umożliwiając guzowi otrzymywanie niezbędnych składników odżywczych i tlenu,
- inwazją - komórki macierzyste nowotworu mogą migrować i dokonywać inwazji na otaczające tkanki, umożliwiając wzrost i rozprzestrzenianie się guza,
- tworzeniem przerzutów - komórki macierzyste raka mogą przemieszczać się do odległych miejsc i tworzyć nowe guzy, prowadząc w ten sposób do przerzutów (74–76).

Ponadto, nowotworowe komórki macierzyste charakteryzują się opornością na terapię, co stanowi kolejną cechę charakterystyczną raka. Mogą one przetrwać konwencjonalne leczenie takie jak chemioterapia i radioterapia, głównie dzięki swoim właściwościom podobnym do komórek macierzystych, takim jak samoodnawianie i różnicowanie (74,77). Stąd też, aktualnie opracowywanie i rozwój terapii przeciwnowotworowych koncentrują się na macierzystych komórkach nowotworowych, a rozszerzenie analiz o proteomikę pozwala zrozumieć i wykorzystać mechanizmy molekularne leżące u podstaw macierzystości nowotworów poprzez dostarczanie wiedzy na temat ekspresji, modyfikacji, interakcji i funkcji białek w komórkach macierzystych nowotworów.

Zaproponowany w 2016 roku przez Sokolov i wsp. innowacyjny algorytm OCLR (ang. *One-class logistic regression*, jednoklasowa regresja logistyczna) identyfikujący specyficzne typy komórek w heterogenicznych populacjach komórek został wykorzystany w pracy Malta i wsp. do stworzenia równie innowacyjnego indeksu macierzystości (mRNAsi) w celu oceny stopnia odróżnicowania onkogenne próbek nowotworowych (51,78). Indeks macierzystości dostarcza informacji o tym, w jakim stopniu komórki nowotworowe przypominają komórki macierzyste. Opiera się on na założeniu, że istnieje podobieństwo między komórkami nowotworowymi a komórkami macierzystymi. Wartości indeksu macierzystości wahają się od 0 do 1, gdzie 0 oznacza niskie podobieństwo komórek nowotworowych do komórek macierzystych, natomiast 1 - wysokie podobieństwo. W celu opracowania mRNAsi, algorytm OCLR został wytrenowany za pomocą uczenia maszynowego (ang. *Machine learning*, ML) na próbkach z zestawu danych Konsorcjum Biologii Komórek Progenitorowych (ang. *Progenitor Cell Biology Consortium*, PCBC), tj. na embrionalnych komórkach macierzystych

i pluripotencjalnych komórkach macierzystych wraz z ich zróżnicowanymi prekursorami ekto-, mezo- i endodermalnymi (51,79,80). Zastosowanie algorytmu OCLR do danych ekspresji mRNA (danych transkryptomowych) komórek macierzystych skutkowało wygenerowaniem sygnatury, którą następnie wykorzystano do indeksowania próbek TCGA, po uprzednim obliczeniu korelacji Spearmana pomiędzy wektorem wagowym modelu a profilem ekspresji każdej nowej próbki. Stratyfikacja próbek nowotworowych w 33 typach raka za pomocą mRNAsi wykazała, że wyższe wartości wskaźnika macierzystości wiązały się z procesami biologicznymi aktywnymi w komórkach macierzystych nowotworu oraz z większym odróżnicowaniem guza, co znalazło odzwierciedlenie w stopniu histopatologicznym. Wyższe wartości wskaźnika macierzystości korelowały także z gorszym skutkiem klinicznym (przeżyciem całkowitym - OS oraz przeżyciem wolnym od progresji choroby - PFS) u pacjentów nowotworowych. Co więcej, komórki guzów, które prowadziły do przerzutów były bardziej zróżnicowane fenotypowo, co prawdopodobnie przyczyniało się do ich agresywności (51).

Z kolei w projekcie, którego częścią jest niniejsza rozprawa doktorska, i który jednocześnie jest kontynuacją prac nad indeksem macierzystości, skupiono się na danych proteomicznych, które posłużyły do opracowania nowego indeksu macierzystości opartego o ekspresję białek - PROTsi (ang. *Protein expression-based stemness index*). Proces ten został omówiony w sekcji Materiały i Metody.

1.4 Charakterystyka nowotworów uwzględnionych w rozprawie doktorskiej

1.4.1 Rak piersi (BR)

Rak piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu na świecie (Rycina 1.1.). Występuje zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, jednak to głównie kobiety cierpią na ten typ raka (1). Każdego roku u około 2 milionów kobiet diagnozuje się raka piersi, a choroba ta jest przyczyną ponad pół miliona zgonów rocznie na całym świecie (1).

Rak piersi jest chorobą heterogenną, zarówno pod kątem klinicznym, jak i genetycznym. Najpowszechniej klasyfikuje się raka piersi na podstawie wyników badań immunohistochemicznych oceniających ekspresję receptora estrogenowego (ER), receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) i receptora progesteronowego (PR), przy czym około 75% przypadków jest ER-dodatnich (ER+). Z perspektywy IHC, wyróżnia się także podtyp potrójnie ujemny (ang. *Triple-negative breast cancer*, TNBC), czyli niewykazujący ekspresji żadnego z powyższych receptorów (81). Przeprowadzone w 2000 roku pionierskie badanie Perou i wsp. wykazało, że raka

piersi można podzielić na cztery wewnętrzne podtypy molekularne na podstawie profilowania ekspresji genów: luminalny A, luminalny B, HER2 dodatni (HER2+) i podstawnokomórkowy (basal)(82,83).

Z kolei klasyfikacja na podstawie ekspresji genów utożsamia immunohistochemiczny podtyp TNBC z podtypem podstawnokomórkowym. Wcześniejsze badania donosiły jednak, że zgodność między TNBC a podstawnokomórkowym rakiem piersi wynosi 80% (84). W przeciwieństwie do podtypu TNBC, podtyp podstawnokomórkowy charakteryzuje się ekspresją innych białek, takich jak cytokeratyny 5, 6 i 17 (85). Odpowiednia i skuteczna klasyfikacja molekularna jest tym bardziej niezbędna, gdyż umożliwia dokonanie kategoryzacji pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z terapii celowanej, takiej jak immunoterapia, hormonoterapia czy terapia anti-HER2 (86,87). Intensywne badania nad rakiem piersi umożliwiły poznanie genów o różnej ekspresji, długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA) oraz białek wiążących RNA dla każdego podtypu raka piersi: RASDF7 dla luminalnego A, DCTPP1 dla luminalnego B, DHRS11, KLC3, NAG3 i TMEM98 dla HER2+ oraz ABDHD14A i ADSSL1 dla TNBC (88). Analiza sekwencjonowania nowej generacji (ang. *New Generation Sequencing*, NGS) pierwotnych guzów piersi wykazała, że bardzo niewiele genów związanych z nowotworem jest zmutowanych z dużą częstotliwością, zmienionych w ponad 10% wszystkich podtypów raka piersi, a mianowicie *GATA3*, *TP53* i *PIK3CA*, przy czym zaobserwowano istotną heterogenność między nowotworową. Mutacje *TP53* były częstsze w TNBC, podczas gdy mutacje *PIK3CA* występowały częściej w guzach luminalnych/HER2- i HER2+ (89). Ponadto, pewne aberracje genetyczne są związane z określonymi podtypami raka piersi, jak mutacje *CDH1* w guzach podtypu luminalnego A, *CCND1*, *FGF3*, *FGF19* i zwiększenie liczby kopii *FGFR1* w raku piersi związanym z receptorem estrogenowym, podczas gdy amplifikacja *MYC*, mutacje *NF1* i warianty patogenetyczne *BRCAl/2* powtarzały się w TNBC (89–92).

W 2020 roku natomiast, w ramach programu CPTAC dokonano analizy proteogenomicznej dużej kohorty 122 prospektywnie zebranych próbek raka piersi od pacjentów, którzy uprzednio nie otrzymali żadnej terapii. W wyniku analiz proteogenomicznych, za pomocą grupowania z wykorzystaniem faktoryzacji macierzy nieujemnej (ang. *Non-negative matrix factorization*, NMF) zidentyfikowano 4 tzw. klastry raka piersi, które w znakomitej większości zająłoby się zarówno z powszechnie znanymi podtypami klinicznymi, jak i podtypami sklasyfikowanymi w ramach PAM50 (ang. *Prediction Analysis of Microarray 50*). Klaster NMF LumA-I zawierał guzy z ER+

i PR+ oraz typ dziki *TP53*. Klaster NMF Basal-I składał się z kolei z guzów z mutacją w *TP53* i ujemnym statusem receptorów hormonalnych (ER i PR). NMF HER2-I zawierał próbki podtypu PAM50 oraz próbki z HER2. Podczas gdy NMF LumB-I i NMF LumA zawierały tylko ich odpowiedni podtyp luminalny PAM50, oba klastry luminalne skupiały guzy z pozytywnym status receptora ER i PR, jak również guzy z *TP53* typu dzikiego. Ponadto, w badaniu przeanalizowano fosforylację kinaz, co umożliwiło identyfikację kinaz będących celem w terapii takich jak PRKDC, MAP4K4 i SPEG w podtypie NMF Basal-I; ERBB2 i CDK12 w próbkach NMF HER2-I oraz DCLK1 w próbkach NMF LumA-I. Co więcej, w guzach z nawracającymi mutacjami somatycznymi zwrócono uwagę na podwyższony poziom fosforylacji kinaz TNIK w próbkach z mutacją *ARID1A*, RIPK3 w guzach z mutacją *MAP3K1* czy też SLK/LATS1 w guzach z mutacją w *AKT*. Ponadto, dzięki podejściu proteogenomicznemu, badacze powiązali mutagenezę napędzaną przez APOBEC z aktywnym mikrośrodowiskiem immunologicznym guza w podtypie ER- dodatnim. Wyniki sugerowały również, że guzy piersi w podtypie luminalnym, charakteryzujące się niedoborem białek naprawy pojedynczych pęknięć łańcucha DNA są związane z wyższą immunogennością. W badaniu podkreślono, że pacjenci z rakiem piersi z aktywnym mikrośrodowiskiem guza mogą pozytywnie reagować na terapię z wykorzystaniem inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego, a dalsze analizy proteogenomiczne wykazały, że poziom białka Rb może służyć jako potencjalny marker odpowiedzi na inhibitor CDK4/6 (palbocyclib), niezależnie od genotypu RB1 i podtypu klinicznego (37).

1.4.2 Jasnokomórkowy rak nerki (CCRCC)

Jasnokomórkowy rak nerki (CCRCC) stanowi jeden z podtypów histologicznych raka nerkowokomórkowego i jest przyczyną większości zgonów związanych z rakiem nerki (93). Według danych statystycznych, w 2020 roku na raka nerki zachorowało 430 tysięcy ludzi na świecie, z czego 323 tysiące to przypadki jasnokomórkowego raka nerki (1,94).

Leczenie nieprzerzutowego CCRCC polega głównie na chirurgicznej resekcji guza lub ablacji termicznej, jednakże możliwości terapeutyczne w przypadku zaawansowanego stopnia choroby bądź przerzutów są ograniczone z uwagi na oporność na chemioterapię (95). Dodatkowo, 20 - 50% pacjentów, u których zdiagnozowano CCRCC, rozwinię w przyszłości przerzuty (96). Stąd też, aktualnie kładzie się duży nacisk zarówno na terapie celowane, jak i na rozwój nowych biomarkerów prognostycznych (97). Choć kombinacje

terapeutyczne inhibitorów kinazy tyrozynowej, takich jak aksytynib, kabozantynib i lenwatynib oraz inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego, takich jak pembrolizumab, niwolumab i ipilimumab wykazują pewną skuteczność terapeutyczną, niestety ich wpływ na zahamowanie rozwoju guza i przeżycie pacjentów nie zawsze prowadzi do poprawy wyników leczenia (97–99). Dlatego też, wciąż poszukiwane są nowe opcje terapii dla pacjentów z zaawansowanym CCRCC.

Wśród czynników patofizjologicznych CCRCC wyróżnia się deregulację sygnalizacji czynnika indukowanego hipoksją (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1*, HIF1), mutacje w enzymach modyfikujących chromatynę czy też przeprogramowanie metaboliczne w metabolizmie glukozy, lipidów i aminokwasów (100). Bialleliczna inaktywacja genu supresorowego *VHL*, który jest negatywnym regulatorem białek czynnika indukowanego hipoksją, zmiany liczby kopii chromosomów 3p, 5q i 14q, a także znaczna częstość mutacji w genach kodujących enzymy modyfikujące chromatynę takie jak *PBRM1*, *SETD2* i *BAP1* zaliczane są do genetycznych cech charakterystycznych CCRCC, związanych z progresją choroby i bardziej agresywnym fenotypem (100–102).

Co więcej, przeprowadzone analizy genomyczne w ramach TCGA podkreślały specyficzne dla CCRCC zmiany w wielu szlakach metabolicznych oraz potwierdziły dotychczasowe obserwacje dotyczące wysokiego poziomu wewnątrzkomórkowej infiltracji immunologicznej i heterogenności wśród pacjentów z tym typem nowotworu (101,103).

Z kolei w wyniku zintegrowanych analiz proteomicznych, genomicznych i transkryptomicznych przeprowadzonych przez CPTAC, ujawniono specyficzne dla guza zmiany proteomiczne i fosfoproteomiczne oraz sygnaturę immunologiczną CCRCC. Integrując cechy transkryptomiczne i proteomiczne z wcześniej opisywanymi w literaturze cechami grup immunologicznych CCRCC, zdefiniowano cztery podtypy guza w analizowanej kohorcie: (1) CD8⁺ zapalne, (2) CD8⁻ zapalne, (3) VEGF *immune desert* i (4) *metabolic immune desert*, które charakteryzowały się unikalnymi zmianami genomowymi i sygnaturami mikrośrodowiska nowotworowego (ang. *Tumor microenvironment*, TME). Podtypy te odróżniały się ścieżkami sygnałowymi: IFN γ dla CD8⁺ zapalnych, degranulacja płytek krwi dla CD8⁻ zapalnych, hipoksja dla VEGF *immune desert* i fosforylacja oksydacyjna z glikolizą w *metabolic desert*, co pozwala na przewidywanie odpowiedzi terapeutycznej (40).

W kolejnym badaniu przeprowadzonym w ramach CPTAC, które stanowi rozszerzenie wcześniejszych analiz podkreślono znaczenie zwiększonej hipermetylacji

i niestabilności genetycznej jako markerów niekorzystnego rokowania wśród pacjentów CCRCC. Zwrócono także szczególną uwagę na znaczenie zmian proteomicznych, w tym fosfoprotein i glikoprotein jako specyficznych wskaźników zróżnicowanej biologii CCRCC i wyniku leczenia pacjentów oraz heterogenność CCRCC, zwłaszcza pod kątem krajobrazu immunologicznego w obrębie guza. Zintegrowane analizy proteogenomiczne przybliżyły sygnatury zależne od wyników leczenia i celów terapeutycznych, aby w konsekwencji rozwinąć spersonalizowane leczenie pacjentów z CCRCC (30).

1.4.3 Rak endometrialny trzonu macicy (UCEC)

Rak endometrialny trzonu macicy (ang. *Uterine corpus endometrial carcinoma*, UCEC) - lub inaczej rak endometrium (ang. *Endometrial carcinoma*, EC) - to jeden z najpowszechniejszych nowotworów wśród kobiet. Zgodnie z danymi podawanymi przez GLOBOCAN, w 2020 roku na raka endometrium zachorowało 414 tysięcy kobiet na świecie, co stanowi 4,5% wszystkich zachorowań na nowotwory wśród płci żeńskiej. W tym samym roku z powodu raka endometrium zmarło niemal 339 tysięcy kobiet w ujęciu globalnym (1).

Pomimo faktu, iż ogólne rokowanie w przypadku wcześniej zdiagnozowanego raka endometrium jest stosunkowo dobre, rak endometrium o wysokim stopniu złośliwości wykazuje tendencję do nawrotów. Standardowe leczenie tego typu nowotworu polega na histerektomii (usunięciu macicy) i obustronnej salpingo-ooforektomii (usunięciu jajników i jajowodów). Limfadenektomia (coraz częściej połączona z biopsją węzła wartowniczego) umożliwia identyfikację pacjentek, które wymagają leczenia adjuwantowego, w tym chemioterapii i radioterapii. Leczenie adjuwantowe zazwyczaj stosuje się u kobiet w stadium zaawansowania FIGO I-II ze współistniejącymi czynnikami wysokiego ryzyka, a także u pacjentek w stadium III. Chemioterapia stosowana jest głównie w raku surowicznym oraz w rakach z mutacją *TP53*. W przypadku zaawansowanej choroby nowotworowej najlepsze wyniki uzyskuje się poprzez połączenie operacji z chemioterapią i radioterapią lub z samą chemioterapią (104,105).

Z klinicznego punktu widzenia, najbardziej innowacyjnym postępem dotyczącym raka endometrium było zaproponowanie przez TCGA zamiany klasycznej klasyfikacji morfologicznej na klasyfikację molekularną (106). Na podstawie profilowania molekularnego, TCGA wyodrębniło cztery podtypy molekularne raka endometrium: 1) POLE *ultra-mutated* (POLEmut) - charakteryzujący się dużą liczbą mutacji somatycznych w domenie egzonukleazy genu POLE, który koduje polimerazę DNA

biorącą udział w naprawie DNA. Podtyp ten wykazuje korzystne rokowanie dla pacjentek i wiąże się z wysokim poziomem neoantygenów, stanowiących cele w immunoterapii, 2) *Microsatellite instability hypermutated* (MSI) - podtyp ten został sklasyfikowany na podstawie dużej liczby mutacji somatycznych spowodowanych defektami w genach naprawy DNA (ang. *DNA mismatch repair*, MMR), takich jak *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Ten podtyp również wiąże się z korzystnym rokowaniem i wysokim poziomem neoantygenów, 3) Podtyp o tzw. małej liczbie kopii (ang. *Copy number low*, CNL) - charakteryzuje się niskim poziomem zmian liczby kopii DNA i stosunkowo niskim obciążeniem mutacjami, choć często występuje mutacja genu *CTNNB1*. Rokowanie w tym przypadku jest pośrednie, 4) Podtyp o tzw. dużej liczbie kopii (ang. *Copy number high*, CNH) - określany jest na podstawie wysokiego poziomu zmian liczby kopii DNA, w tym amplifikacji i delecji określonych genów (np. *TP53*) i regionów chromosomalnych. Podtyp ten charakteryzuje się najgorszym rokowaniem i jest związany z wysokim poziomem niestabilności genomowej (106,107). Klasyfikacja molekularna zaproponowana przez TCGA jest wykorzystywana w codziennej praktyce klinicznej do określenia rokowania i proponowania odpowiedniego leczenia oraz jest uwzględniana w wytycznych krajowych, jak i międzynarodowych (108–110).

W celu jeszcze lepszego zrozumienia funkcjonalnego wpływu zmian genomowych scharakteryzowanych przez TCGA, CPTAC przeprowadził wieloomiczną analizę próbek raka endometrium wraz z odpowiadającymi im próbkami tkanek prawidłowych z prospektywnej kohorty 95 pacjentek (41). Warto nadmienić, iż podczas tego kolektywnego wysiłku olbrzymią rolę odegrał zespół ginekologów onkologicznych z Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu. Badanie Dou i wsp. wykazało, że różne podtypy raka endometrium mogą być wiarygodnie rozróżnione na podstawie wzorów poziomów białek i późniejszych modyfikacji potranslacyjnych. Co więcej, zidentyfikowano współdziałające mechanizmy aktywacji ścieżek sygnałowych i określono, które guzy będą zachowywać się w sposób bardziej agresywny. W badaniu przedstawiono również dowody na istnienie nowej ścieżki regulacyjnej związanej z EMT, obejmującej białka QKI, circRNA i ESRP2 w progresji raka endometrium wraz z wpływem na rokowanie pacjentek. Ponadto, zidentyfikowano wiele produktów genowych, które ulegają wysokiej ekspresji w podtypie raka endometrium o wysokim poziomie CNV, w tym CDK12, która może być ukierunkowana na zwiększenie odpowiedzi klinicznej na blokadę punktów kontrolnych układu odpornościowego. Badanie sugeruje również, że pomiar zdolności guza do przetwarzania i prezentowania antygenów dostarczy

dotychczasowych i być może bardziej efektywnych kryteriów wyboru pacjentów do immunoterapii (41). Podsumowując, badanie to dostarcza nowych informacji o podstawowych procesach biologicznych związanych z powstawaniem i progresją raka endometrium oraz przedstawia interesujące wskazówki dotyczące nowych podejść terapeutycznych w raku endometrium.

1.4.4 Glejak wielopostaciowy (GBM)

Glejak wielopostaciowy (ang. *Glioblastoma multiforme*, GBM) to - zgodnie z definicją WHO - pierwotny nowotwór złośliwy mózgu w IV stopniu złośliwości (111). GBM stanowi jeden z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych, będąc jednocześnie najczęstszym złośliwym guzem pierwotnym mózgu i ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącym 14,5% wszystkich guzów ośrodkowego układu nerwowego i 48,6% złośliwych guzów ośrodkowego układu nerwowego wśród dorosłych (112). Standardem leczenia w przypadku GBM jest chirurgiczna resekcja, chemioterapia i radioterapia (113,114), przy czym ostatnio metody te wspomagane są nieinwazyjną terapią TTFIELDS (ang. *Tumor Treating Fields*) (115,116). Co więcej, w ramach leczenia GBM zaproponowano również obiecujące immunoterapie, takie jak szczepionki, inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego, terapię chimerycznych receptorów antygenowych komórek T (CAR-T) czy terapię wirusową, jednakże silnie immunosupresyjne mikrośrodowisko GBM utrudnia rozwój immunoterapii i ich skuteczność w leczeniu (117,118). Pierwotnie, system klasyfikacji WHO dla GBM uwzględniał głównie cechy histologiczne guza, w tym obecność martwicy, aktywność mitotyczną oraz pleomorfizm komórkowy (zróznicowanie wielkości i kształtu komórek). Jednakże, badania m.in. w ramach TCGA wzbogaciły pierwotną klasyfikację WHO, uwzględniając cechy molekularne guza, w tym obecność mutacji w genie *IDH* i status promotora genu *MGMT* (metylotransferaza DNA O-6-metyloguaniny) (119,120). Zatem oprócz ogólnego stopnia zaawansowania guza, system klasyfikacji WHO dla GBM uwzględnia również cechy molekularne guza, co łącznie umożliwia dalszą klasyfikację guzów GBM na podtypy o odmiennych cechach klinicznych i patologicznych: 1) IDH-typ dziki (IDH-WT) GBM, który stanowi większość przypadków (~90%) i jest związany z gorszym rokowaniem i bardziej agresywną chorobą, 2) IDH-mutant GBM, który jest odrębnym podtypem o korzystniejszym rokowaniu i odmiennych cechach molekularnych oraz 3) GBM z cechami oligodendrogleju, który ma korzystniejsze rokowanie i charakteryzuje się obecnością specyficznych mutacji genetycznych. Dodatkowo,

IDH- WT GBM dzielą się na trzy odrębne podklasy (proneuralny, klasyczny i mezenchymalny) na podstawie zmian genomowych i sygnatur ekspresji genów (121). Badania genomiczne w ramach TCGA ujawniły dużą liczbę mutacji w genach supresorowych i onkogenach nowotworów, w tym *TP53* (42%), *PTEN* (33%), neurofibrominę 1 (*NF1*) (21%), *EGFR* (18%), *RBI* (11%), *PIK3R1* (10%) i *PIK3CA* (7%). Sekwencjonowanie całego eksomu 291 pacjentów z GBM ujawniło podobne wyniki i dodatkowo wskazało wysoce zmutowany gen - *SPTA17*. Analiza liczby kopii DNA zdefiniowała somatyczne aberracje liczby kopii (SCNA) i zidentyfikowała powszechnie amplifikowane i usunięte chromosomy. Najczęstsze amplifikacje stwierdzono w obrębie chromosomu 7 (*EGFR/MET/CDK6*), chromosomu 12 (*CDK4* i *MDM2*) oraz chromosomu 4 (*PDGFRA*), natomiast najczęstsze delecje zidentyfikowano na chromosomie 9 (*CDKN2A/B*), chromosomie 13 (*RBI*), chromosomie 1 (*CDKN2C*) oraz chromosomie 10 (*PTEN*). Wielowymiarowe dane genomowe zostały zintegrowane w celu identyfikacji wzorców mutacji somatycznych i liczby kopii DNA związanych z każdym podtypem. Podtyp klasyczny charakteryzował się amplifikacją *EGFR*, delecją *CDKN2A* i brakiem mutacji *TP53*, podtyp mezenchymalny był wzbogacony o mutację i/lub utratę *NF1*, natomiast podtyp proneuralny charakteryzował się zmianami w *PDGFRA* i mutacją punktową w *IDH1*, a podtyp neuralny był typowany przez ekspresję markerów neuronalnych, takich jak *NEFL*, *GABRA1*, *SYTI* i *SLC12A5* (119,120).

Z kolei w ramach programu CPTAC wykorzystano podejście wieloomicze, w tym genomikę, proteomikę, transkryptomikę, metabolomikę i lipidomikę, a także analizę pojedynczych komórek w celu uzyskania szerszej wiedzy dotyczącej GBM. Jednym z najważniejszych odkryć było zidentyfikowanie podgrupy pacjentów z mieszanymi podtypami w porównaniu do tradycyjnych podtypów opartych na sekwencjonowaniu, które wykazują znacznie skrócony czas przeżycia pacjentów. W badaniu CPTAC zidentyfikowano również nowy podtyp immunologiczny GBM (im3), który jest wzbogacony o limfocyty T i komórki NK (ang. *Natural killer*), co - jak podkreślają badacze - jest niespodziewane w GBM. Dodatkowo, w badaniu wykazano, że mezenchymalny podtyp GBM charakteryzuje się wysoką ekspresją sygnatur przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) oraz że zarówno komórki guza, jak i komórki stromy przyczyniają się do tworzenia sygnatury mezenchymalnej. Ponadto, wykazano związki pomiędzy acetylacją H2B a wzorcami ekspresji białek związanych z funkcjami komórek odpornościowych, jak również wrażliwością metaboliczną specyficzną dla mezenchymalnego podtypu GBM. Badanie CPTAC zdecydowanie podkreśla potrzebę

spersonalizowanego leczenia GBM, ponieważ pacjenci z mieszanymi podtypami wykazują różne wyniki przeżycia, a nowo zidentyfikowany podtyp immunologiczny (im3) ma odmienny profil immunologiczny oraz wskazuje na szybki postęp technologii genomiki i proteomiki pojedynczych komórek, które ułatwią głębszą analizę heterogeniczności GBM i interakcji z mikrośrodowiskiem guza (42).

1.4.5 Pediatryczne guzy mózgu (PBT)

Pediatryczne guzy mózgu (ang. *Pediatric brain tumors*, PBT) stanowią grupę nowotworów występujących u dzieci i młodzieży, zwykle poniżej 15 roku życia. Guzy te mogą powstać z różnych typów komórek w mózgu, w tym komórek glejowych (gwiaździak, skąpodrzewiak, wyściółczak), komórek nerwowych (nerwiak zarodkowy, zwojakoglejak) i komórek embrionalnych (rdzeniaki zarodkowe, atypowe teratoidalne guzy rabdoidalne) (122). Dziecięce guzy mózgu dzielą się na inne kategorie niż guzy mózgu dorosłych. Do najczęściej występujących pediatrycznych guzów mózgu zalicza się następująco: glejaki wysokiego stopnia (ang. *High grade gliomas*, HGGs), rdzeniaki zarodkowe, glejaki niskiego stopnia (ang. *Low grade gliomas*, LGGs) - astrocytarne, oligodendroglejowe i mieszane glejowo-neuronalne, wyściółczaki i glejaki pnia mózgu/rozlane glejaki śródmózgowe (ang. *Diffuse intrinsic pontine gliomas*, DIPGs) (122,123).

Pediatryczne guzy mózgu są niezwykle zróżnicowaną grupą nowotworów, a ich klasyfikacja stanowi spore wyzwanie. Jednym z przykładów obrazujących wspomniane zróżnicowanie jest rdzeniaka zarodkowego, który wywodzi się z mózdzku i stanowi ok. 20% wszystkich dziecięcych nowotworów mózgu. Typ ten dzieli się na cztery podtypy molekularne, dzięki czemu określa się rokowanie i odpowiednie metody leczenia: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), grupa 3 i grupa 4. Najlepsze rokowanie wykazują podtypy SHH i grupa 4, w których 5-letnie przeżycie oscyluje na poziomie 80- 90%, z kolei w podtypie WNT 70% przypadków jest wolnych od choroby po 5 latach. Zdecydowanie najgorsze rokowanie - na poziomie 20-30% w ciągu 5 lat - przypisuje się grupie 3 (124). Następnie, w 2017 roku w wyniku analiz molekularnych opartych na danych dotyczących metylacji DNA i ekspresji genów wraz z danymi zmiany liczby kopii zidentyfikowano 12 różnych podtypów rdzeniaka zarodkowego. W badaniu tym wykazano, że ponad 30% badanych guzów rdzeniaka zarodkowego charakteryzuje się mutacjami, delecjami lub amplifikacjami genów kodujących regulatory epigenetyczne, co może być wykorzystane do stratyfikacji pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym (125).

Dziecięce i dorosłe guzy mózgu zwykle wyłaniają się z różnych tkanek, a terapie, które są stosunkowo dobrze tolerowane przez dorosły mózg, takie jak np. radioterapia, mogą zakłócać rozwój mózgu u dzieci, zwłaszcza tych poniżej piątego roku życia (126). Ponadto, ponieważ większość terapii została opracowana dla dorosłych, guzy dorosłych i dzieci reagują inaczej na standardowe terapie. W związku z powyższym, obecne opcje leczenia dziecięcych guzów mózgu mają ograniczoną skuteczność ze względu na różne odpowiedzi na dostępne terapie (122).

W celu ukierunkowania na wybór możliwie najlepszej metody leczenia pediatrycznych guzów mózgu, w ramach projektu CPTAC przeprowadzono obszerne badanie przez Petralia i wsp., będące pierwszym badaniem proteogenomicznym dotyczącym pediatrycznych guzów mózgu na tak dużą skalę. Dzięki wyjściu poza tradycyjne granice histologiczne i integracji fundamentalnej biologii dziecięcych guzów mózgu z analizami proteogenomicznymi wykazano, że terapie stosowane w jednym typie histologicznym mogą być skutecznie stosowane w innych guzach o podobnych cechach proteomicznych, a dane proteomiczne ujawniły funkcjonalne efekty mutacji somatycznych i zmian liczby kopii (CNV), które nie są widoczne na poziomie danych transkryptomicznych (43). W badaniu tym wykorzystano 218 próbek guzów reprezentujących 7 odrębnych rozpoznań histologicznych, w tym glejaka niskiego stopnia (LGG), wyściółczaka (EP), glejaka wysokiego stopnia (HGG), rdzeniaka zarodkowego (MB), zwojakoglejaka, czaszko gardlaka (CP) i atypowego teratoidalnego guza rabdoidalnego (ATRT). Dekonwolucja mikrośrodowiska guzów oparta na analizach wieloomicznych zidentyfikowała 5 odrębnych klastrów związanych z różnymi populacjami infiltrujących komórek odpornościowych w obrębie guza: *Cold-medullo*, *Cold-mixed*, *Epithelial*, *Neuronal* i *Hot*. Dwa klastry tzw. zimnych guzów (*Cold-medullo* i *Cold-mixed*) wykazały najniższą infiltrację komórek odpornościowych, przy czym pierwszy klaster charakteryzuje się wzbogaceniem w guzy rdzeniaka zarodkowego, podczas gdy drugi jest mieszaniną wyściółczaka, ATRT, HGG i rdzeniaka zarodkowego. Z kolei grupa *Epithelial* obejmowała próbki czaszko gardlaka, czyli nowotworu wywodzącego się z nabłonka. Co ciekawe, poziomy RNA PD-1 i CTLA4 były znacząco podwyższone w grupie *Epithelial*, sugerując, że pacjenci z czaszko gardlakiem mogliby potencjalnie odnieść korzyści z terapii anty PD-1 i/lub CTLA-4. LGG i zwojakoglejaki zostały podzielone na dwie grupy *Neuronal* i *Hot*, przy czym pierwsza charakteryzowała się obecnością komórek neuronalnych, a druga obecnością makrofagów, mikrogleju i komórek dendrytycznych. Białka produkujące adenozyne (np. fosfatazy NT5E

i ENTPD1), które wykazują aktywność hamującą immunologiczne punkty kontrolne, wykazały zwiększenie ekspresji w klastrze *Hot* na podstawie zarówno danych RNAseq, jak i proteomu, co dalej sugeruje, że pacjenci w tej grupie mogą odnieść korzyści z leczenia opartego na zmniejszaniu stężenia adenozyiny. Z kolei wśród guzów LGG, zauważono znaczącą różnicę między polaryzacją mikrogleju i makrofagów w różnych statusach BRAF - BRAF-V600E i BRAF-Fuzja (gen fuzyjny BRAF), będących istotnymi czynnikami onkogennymi w LGG. Wariant BRAF-fuzja promował więcej proregeneracyjnych (immunosupresyjnych) mikroglejów niż mikroglejów prozapalnych, podczas gdy wariant BRAF-V600E promował więcej proregeneracyjnych makrofagów niż makrofagów prozapalnych, wskazując na odmienne mechanizmy immunosupresyjne w guzach BRAF- fuzja i BRAF-V600E (43). Podsumowując, praca Petralia i wsp. w ramach projektu CPTAC ukazuje znaczący postęp w badaniu biologii pediatrycznych guzów mózgu oraz stanowi dowód na to, iż badania proteogenomiczne na dużą skalę są ważnym źródłem wcześniej niedostrzeżonych odkryć, pozwalających na ukierunkowanie na odpowiednie terapie celowane.

1.4.6 Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi (HNSCC)

Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi (ang. *Head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych na świecie, z około 300 tysiącami zgonów każdego roku (1) i jest związany z dwoma odrębnymi czynnikami ryzyka determinującymi klasyfikację HNSCC. HPV (+) HNSCC jest związany z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), natomiast HPV (-) HNSCC wiąże się z ekspozycją na takie czynniki rakotwórcze jak palenie tytoniu i spożywanie alkoholu (127). HPV (-) HNSCC stanowi 75% wszystkich HNSCC i wykazuje wyższą częstotliwość mutacji oraz znacznie gorsze rokowanie niż HPV (+) HNSCC (44,128). Rozpoznanie HNSCC jest w większości przypadków późne, a odsetek nawrotów wynosi nawet 50% (129). Postępowanie terapeutyczne w przypadku HNSCC jamy ustnej obejmuje interwencję chirurgiczną, a następnie adjuwantową radioterapię lub chemio- i radioterapię. Nowotwory powstające w gardle lub krtani są zazwyczaj leczone za pomocą chemioradioterapii. W ciągu ostatnich 30 lat nastąpiła poprawa w leczeniu chirurgicznym, ze szczególnym uwzględnieniem chirurgii minimalnie inwazyjnej, co spowodowało zmniejszenie zachorowalności pacjentów podczas resekcji chirurgicznej (130). Nawracający lub przerzutowy HNSCC wiąże się ze złym rokowaniem, a możliwości skutecznego leczenia jest niewiele. Niewielka część pacjentów z wznową lokoregionalną

może być poddana ratującej operacji lub ponownemu napromienianiu, natomiast większość pacjentów z HNSCC wymaga leczenia wielomodalnego (131). W leczeniu nawrotowego lub przerzutowego HNSCC standardem leczenia systemowego jest chemioterapia na bazie platyny z 5-fluorouracylem, która może być połączona z przeciwciałem monoklonalnym EGFR cetuksymabem samodzielnie lub w połączeniu z radioterapią (132). Ponieważ u chorych z nawracającym lub przerzutowym HNSCC leczonych chemioterapią opartą na platynie wykazano złe rokowanie, FDA zatwierdziła inhibitory punktów kontrolnych układu immunologicznego - niwolumab i pembrolizumab, przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 (133,134). Jednakże, ogólne wskaźniki odpowiedzi na wyżej wymienione terapie celowane i immunoterapie były umiarkowane, a terapia skojarzona z zastosowaniem zarówno przeciwciała anty-PD-L1 - durvalumabu, jak i przeciwciała anty-CTLA4 - tremelimumabu również nie poprawiła odpowiedzi ani przeżycia całkowitego chorych na HNSCC (133–137).

Dlatego też, konieczne jest dalsze profilowanie molekularne i immunologiczne HNSCC w celu identyfikacji skuteczniejszych celów terapeutycznych. W tymże właśnie celu w ramach projektu CPTAC Huang i wsp. przeprowadzili analizy proteogenomiczne próbek HNSCC, skupiając się na wariancie HNSCC z gorszym rokowaniem, czyli HPV (-) HNSCC. Naukowcy zidentyfikowali trzy podtypy molekularne HNSCC dzięki analizie proteogenomicznej, co może pomóc w dopasowaniu odpowiednich terapii dla pacjentów. W badaniu stwierdzono, że pacjenci z odmiennymi podtypami molekularnymi HNSCC mogą różnie reagować na inhibitory EGFR, inhibitory CDK lub immunoterapię. Zespół zaproponował również, że wykorzystanie ligandów EGFR jako biomarkerów, w przeciwieństwie do amplifikacji lub nadekspresji *EGFR*, mogłoby pomóc w wyborze pacjentów do leczenia przeciwciałem monoklonalnym EGFR. Ponadto, status fosforylacji Rb mógłby potencjalnie stanowić lepszy wskaźnik odpowiedzi pacjentów na terapię inhibitorem CDK4/6. Badanie Huang i wsp. dostarczyło również informacji dotyczących skuteczności immunoterapii. Inhibitory PD-1 celują w interakcję pomiędzy immunologicznymi punktami kontrolnymi PD-1 i PD-L1, jednak - jak wspomniano wyżej - wskaźniki sukcesu immunoterapii są niskie. W wyniku przeprowadzonych analiz guzów z wysoką ekspresją PD-L1 odkryto, że w przypadku zwiększonej ekspresji PD-L1 dochodzi jednocześnie do zwiększenia ekspresji innych immunologicznych punktów kontrolnych, umożliwiając w ten sposób wzrost guza pomimo stosowania inhibitorów PD-1. Obserwacja ta sugeruje, że guzy aktywowane PD-1 i PD-L1 z tzw. gorącym środowiskiem immunologicznym mogą wymagać wielu rodzajów immunoterapii, które celują w różne

białka punktów kontrolnych układu odpornościowego, aby były skuteczne. Z kolei guzy charakteryzujące się tzw. zimnym środowiskiem immunologicznym nie są odpowiednim celem dla immunoterapii. W wyniku badania kwestii, w jaki sposób guz staje się immunologicznie zimny, wykazano, że główny problem tkwi w defekcie w ścieżce prezentacji antygenów, gdzie wiele kluczowych komponentów genów ścieżki prezentacji antygenów zostało usuniętych. Chociaż antygeny guza nadal ulegają ekspresji, to w rezultacie układ odpornościowy nie jest w stanie rozpoznać ich na powierzchni komórki i dlatego nie udaje się aktywować systemu obronnego organizmu mogącego zwalczyć nowotwór. Według badaczy, odkryte delecje w genach ścieżki prezentacji antygenów mają potencjał, by stać się skutecznymi celami dla przyszłych terapii (44). Podsumowując, badanie Huang i wsp. rozszerza biologiczne zrozumienie HPV- negatywnych HNSCC oraz dostarcza nowych informacji, które mogą służyć jako podstawa przyszłych badań i prób klinicznych w kierunku spersonalizowanego leczenia HPV (-) HNSCC.

1.4.7 Gruczolakorak płuc (LUAD)

Rak płuca charakteryzuje się jednymi z najwyższych wskaźników zachorowalności i umieralności na nowotwory na świecie (Rycina 1.1.) (1). Gruczolakorak płuca (ang. *Lung adenocarcinoma*, LUAD) wyróżniany jest jako najczęstszy podtyp histologiczny niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *Non-small cell lung carcinoma*, NSCLC), który stanowi około 40% wszystkich nowotworów złośliwych płuc (138). Do najczęstszych czynników ryzyka wystąpienia LUAD zalicza się palenie tytoniu, narażenie na czynniki rakotwórcze czy też zanieczyszczenia powietrza (139). Jednakże, ostatnio podkreśla się znaczenie czynników ryzyka niezwiązanych z paleniem tytoniu ze względu na wzrost liczby rozpoznań LUAD wśród pacjentów niepalących (140). Do takich czynników ryzyka wskazywanych przez TCGA i inne badania należą m.in. mutacje somatyczne w TP53, KRAS, STK11, KEAP1, EGFR, NF1 czy BRAF (141–143). Możliwości terapeutyczne dla pacjentów z LUAD obejmują zabiegi chirurgiczne, radioterapię, chemioterapię, terapię celowaną i immunoterapię lub kombinację tych metod (144). Na uwagę zasługują znaczne postępy w rozwoju terapii celowanych ukierunkowanych na czynniki onkogenne (ang. *oncogenic drivers*) oraz w immunoterapiach celujących w immunologiczne punkty kontrolne (145,146). Terapie celowane zatwierdzone przez FDA w leczeniu LUAD to m.in. inhibitory EGFR, BRAF, ALK, ROS1 czy MET (147). Potencjalne korzyści dla pacjentów z LUAD wykazały również terapie ukierunkowane na mutacje ERBB2

(*HER2*)(148). Mimo ciągłego rozwoju różnorodnych terapii, nadal istnieje duży odsetek pacjentów z LUAD, dla których wciąż brakuje odpowiednich opcji terapii celowanej, co może być spowodowane takimi czynnikami jak nieodkryte jeszcze mutacje genetyczne bądź brak odpowiedzi pacjentów na leczenie obecnie dostępnymi terapiami celowanymi, a także rozwój oporności pacjentów na terapie celowane na przestrzeni czasu, co prowadzi do niepowodzenia leczenia (149–152).

Ponieważ białka są funkcjonalnymi częściami komórki, dogłębna charakterystyka proteomu i fosfoproteomu LUAD (a także innych nowotworów) tworzy podstawy do kompleksowego zrozumienia molekularnych mechanizmów nowotworzenia i opracowania nowych podejść terapeutycznych. W 2020 roku w ramach projektu CPTAC przeprowadzono analizy proteogenomiczne kolejnego typu nowotworu - gruczolaka płuca. Gillette i wsp. wykorzystali w analizach 110 próbek guzów LUAD. Kohorta uwzględniona w badaniu zawierała mniej więcej równą liczbę obecnych lub byłych palaczy i osób nigdy nie palących, przy jednoczesnym zróżnicowaniu geograficznym populacji, co już na samym początku odróżniało tę kohortę od kohorty badanej w TCGA, która obejmowała głównie próbki LUAD związane z paleniem. W badaniu autorzy zastosowali wieloomiczne, nienadzorowane grupowanie do identyfikacji podtypów LUAD w oparciu o ich profile ekspresji białek i zidentyfikowali przypuszczalne efekty cis metylacji oraz nowy mechanizm regulacyjny KEAP1/NFE2L2. Co więcej, odkryto również potencjalne cele terapeutyczne w LUAD, w tym inhibitory dla SOS1 w guzach z mutacją *KRAS* oraz PTPN11/Shp2 w guzach z fuzją ALK i mutacją *EGFR*. Badanie pozwoliło ponadto na szeroką charakterystykę krajobrazu immunologicznego LUAD i wskazało potencjalne słabości terapeutyczne dotyczące m.in. terapii anty-CTLA4 i inhibicji IDO1 w tzw. guzach immunologicznie gorących (ang. *hot tumors*). Dalej podkreślono szczególny związek mutacji *STK11* z tzw. zimnym środowiskiem immunologicznym, a także wskazano degranulację neutrofilów jako potencjalny mechanizm immunosupresyjny w LUAD z mutacją *STK11* widoczny wyłącznie w przestrzeni proteomicznej. Ponadto, dzięki integracji danych proteogenomicznych i próbek pozyskanych od palaczy i osób nigdy niepalących uchwycono potencjalny mechanizm onkogenny u osób nigdy niepalących, skupiony na jednej z GTP-az Rho - ARHGAP5 (38). Niewątpliwie integracja danych genomicznych i proteomicznych na szeroką skalę stanowi znaczny postęp w stosunku do wcześniejszych badań nad gruczolakiem płuca, opartych wyłącznie na danych genomicznych (153), a badania takie jak te przeprowadzone

przez CPTAC umożliwią znaczny rozwój terapii celowanych, zarówno w LUAD jak i w przypadku innych typów nowotworów.

1.4.8 Rak płaskonabłonkowy płuca (LSCC)

Rak płaskonabłonkowy płuca (ang. *Lung squamous cell carcinoma*, LSCC), podobnie jak LUAD jest rodzajem niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). Rak płaskonabłonkowy płuca często występuje w centralnej części płuca lub w głównych drogach oddechowych, takich jak lewe lub prawe oskrzele. Około 80% przypadków raka płuca ma związek z paleniem tytoniu, zatem LSCC jest najsilniej związany z paleniem tytoniu niż jakikolwiek inny typ NSCLC. Oprócz palenia tytoniu, do czynników ryzyka LSCC zalicza się wiek, wywiad rodzinny, narażenie na bierne palenie, cząstki minerałów i metali oraz azbest (144,154). Niestety, częste mutacje kierujące (ang. *driver mutations*) występujące w LUAD są rzadko identyfikowane w LSCC, a próby identyfikacji mutacji sterujących charakterystycznych dla LSCC nie przyniosły wymiernych rezultatów. Kilka szlaków sygnałowych często zmienionych w LSCC (np. FGFR1 czy PI3K), które potencjalnie mogłyby stanowić bazę do terapii celowanych ukierunkowanych na te ścieżki, w badaniach klinicznych miały niską skuteczność. Pacjenci w zaawansowanych stadiach LSCC mają znacznie gorsze wyniki leczenia w porównaniu z ich odpowiednikami z LUAD, co wynika właśnie z mniejszej liczby opcji adekwatnego leczenia (155,156), a do tej pory jedynie immunoterapia jest skuteczną strategią terapeutyczną dla pacjentów z LSCC (157).

Opracowanie leków i terapii celowanych w LSCC stanowi wyzwanie ze względu na złożoną genomikę guza, ograniczone mechanistyczne zrozumienie wzajemnego oddziaływania szlaków onkogennych i brak reprezentatywnych modeli mysich (155). Stąd też, w 2021 roku Satpathy i wsp. przeprowadzili złożone badanie proteogenomiczne 108 pierwotnych guzów LSCC i 99 sparowanych z nimi prawidłowych tkanek sąsiadujących (NAT), identyfikując możliwe do wykorzystania w terapii białka oraz wyjaśniając szlaki sygnalizacji komórkowej i wzajemne powiązania między wieloma modyfikacjami potranslacyjnymi (PTMs), przyczyniając się do rozwoju metod terapeutycznych w LSCC. Wśród możliwości rozwoju nowych metod leczenia LSCC, zidentyfikowano gen *NSD3* jako możliwy cel dla guzów charakteryzujących się dodatkowymi kopiami FGFR1. Wyniki badań proteogenomicznych sugerowały, że *NSD3* może być krytycznym czynnikiem wzrostu i przeżycia w guzach z dodatkowymi kopiami FGFR1, co w konsekwencji czyni *NSD3* potencjalnym celem terapeutycznym wskazanym w badaniu. Ponadto, w części

próbek LSCC odkryto niski poziom ekspresji p63, przy jednoczesnym wysokim poziomie surwiwiny - białka, które odpowiada za regulację proliferacji i apoptozy komórek, i które jest celem badań klinicznych w innych typach nowotworów. Co więcej, wyniki badań wskazały, że guzy LSCC, w których dochodzi do nadekspresji SOX2 (jednego z czynników transkrypcyjnych) mogą wykazywać podatność na leczenie ukierunkowane na białka modyfikujące chromatynę, takie jak EZH2 i LSD1. Na podstawie danych proteogenomicznych w badaniu przedstawiono także szczegółowy obraz krajobrazu immunologicznego LSCC. Analiza ścieżek regulacji immunologicznej, które mogą służyć w terapii umożliwiła identyfikację podzbioru guzów, które wykazują ekspresję markerów związanych z odpowiedzią na inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego (takie jak blokery PD-1/PD-L1) oraz markerów związanych z opornością na immunoterapię, dostarczając w ten sposób informacji, dlatego wyniki immunoterapii są tak różne wśród pacjentów z LSCC (45). Jak podkreślono w powyżej przybliżonym badaniu, integracja danych proteomicznych z danymi genomicznymi pozwala na dostrzeżenie funkcjonalnych efektów genomu, dzięki czemu otrzymujemy nieocenione źródło informacji pozwalających na wskazanie wcześniej niezbadanych opcji terapeutycznych i specyficznych podgrup pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z określonego leczenia (45).

1.4.9 Gruczolakorak przewodu trzustkowego (PDA)

Rak trzustki, inaczej określany jako gruczolakorak przewodu trzustkowego (ang. *Pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDA) jest jednym z najbardziej agresywnych i śmiertelnych nowotworów, ze śmiertelnością około 500 tysięcy osób rocznie na całym świecie i 5-letnim całkowitym przeżyciem (OS) na poziomie zaledwie 11% (158). Czynniki ryzyka obejmują występowanie choroby w rodzinie, zespół Lyncha, przewlekły stan zapalny trzustki, cukrzycę, nadwagę lub otyłość oraz palenie tytoniu (159). Postępy w zakresie chemioterapii dokonane w ciągu ostatnich 10 lat poprawiły wyniki leczenia resekcyjnego PDA, jednak znakomita większość pacjentów (80%) jest diagnozowanych w zaawansowanym stadium choroby (i z odległymi przerzutami), co uniemożliwia przeprowadzenie zabiegu chirurgicznego u tychże pacjentów (160). Co więcej, w przypadku PDA wiele dużych badań z zastosowaniem leków celowanych nie przyniosło spodziewanego sukcesu (161–163). Stąd też, wciąż istnieje potrzeba zrozumienia biologii i mechanizmów molekularnych biorących udział w rozwoju PDA w celu poprawy przeżywalności pacjentów i jakości ich życia.

Trwające od lat badania nad PDA wyłoniły kluczowe zmiany genomowe w PDA, w tym mutacje somatyczne w *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* i *SMAD4* oraz umożliwiły klasyfikację molekularną guzów opartą na wzorcach ekspresji genów (164). W kolejnych latach TCGA potwierdziło wiele uprzednio odkrytych genów charakterystycznych dla PDA, a także zidentyfikowało dodatkowy gen kierujący (ang. *driver gene*) - *RREB1*. Co ciekawe, oprócz mutacji *KRAS*, około 42% pacjentów wykazywało także inne zmiany genomowe. Badacze zaobserwowali mutacje germinalne i somatyczne w genach naprawy uszkodzeń DNA (*BRCA2*, *PALB2* i *ATM*) w 8% próbek, co sugeruje, że ci pacjenci mogą odnieść korzyści z chemioterapii opartej na platynie i/lub terapii z inhibicją polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP), enzymu biorącego udział w naprawie DNA (165). Wykorzystując podejście proteogenomiczne, Cao i wsp. przeprowadzili analizy 140 próbek PDA w ramach projektu CPTAC i potwierdzili wiele istotnych klinicznie biomarkerów oraz wskazali fenotypowe efekty genomowych i epigenetycznych perturbacji w PDA. Badania te również potwierdziły, że w guzach trzustki częściej występują mutacje w kilku genach zidentyfikowanych w poprzednich badaniach, w tym w wyżej wspomnianych *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* i *SMAD4* oraz wskazały kinazy PAK1 i PAK2 jako atrakcyjne cele terapeutyczne do dalszych badań, które - hamowane wraz z elementami szlaków sygnałowych *KRAS*, takich jak MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR, mogą zwiększyć korzyści terapeutyczne poprzez maksymalne zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych. Ponadto, w wyniku kompleksowej analizy proteomicznej zidentyfikowano 222 białka, których ilość co najmniej dwukrotnie przeważała w komórkach raka trzustki w porównaniu z komórkami prawidłowymi, przy czym w białkach tych wykryto niemal 5000 miejsc ze zwiększoną ilością fosforylacji i ponad 1700 miejsc ze zwiększoną ilością glikozylacji. We wnioskach badania zasugerowano, że zarówno fosforylowane jak i glikozylowane białka wydzielane przez komórki PDA mogłyby służyć jako biomarkery diagnostyczne pozyskiwane z krwi pacjentów (48). Podsumowując, wyniki uzyskane w badaniu Cao i wsp. stanowią niezwykle cenne źródło dla przyszłych badań skupionych na wczesnym wykrywaniu i klasyfikacji guzów trzustki.

1.4.10 Rak jajnika (OV)

Nowotwory jajnika są jednymi z najbardziej agresywnych nowotworów ginekologicznych, z zachorowalnością w 2020 roku na poziomie 300 tysięcy kobiet na całym świecie (1). Ogólny termin "nowotwór jajnika" szczegółowo skupia heterogenną grupę nowotworów, których podział został oparty według genetyki, histologii i tkanki,

z której wywodzi się dany guz (166). Do głównych podtypów nowotworów jajnika zalicza się nowotwory jajnika hormonalnie czynne, nowotwory jajnika z komórek rozrodczych oraz nabłonkowy rak jajnika (ang. *Epithelial ovarian carcinoma*, EOC). Nabłonkowy rak jajnika jest najczęściej występującym podtypem i stanowi około 95% wszystkich przypadków nowotworów jajnika (167). EOC dalej dzieli się na pięć podtypów histologicznych: śluzowy, endometrioidalny, jasnokomórkowy, o niskim stopniu złośliwości (ang. *Low grade ovarian carcinoma*, LGOC) i o wysokim stopniu złośliwości (ang. *High grade ovarian carcinoma*, HGOC), przy czym ten ostatni stanowi 70% diagnozowanych przypadków EOC (168,169). Ze względu na brak specyficznych objawów, do diagnozy HGOC dochodzi stosunkowo późno, gdyż podtyp ten rozpoznawany jest w zaawansowanych stadiach (III i IV), czyli w momencie, gdy doszło do rozprzestrzenienia się guza do jamy brzusznej lub poza nią (170,171). Późna diagnoza drastycznie (172) zmniejsza przeżycie całkowite pacjentek i redukuje odpowiedzi terapeutyczne, dlatego też obecnie kładzie się duży nacisk na rozwój możliwości wczesnego diagnozowania HGOC (172,173).

HGOC charakteryzuje się występowaniem mutacji *TP53*, zróżnicowaną i powszechną niestabilnością chromosomową i brakiem zidentyfikowanych mutacji kierujących, które mogłyby być celem terapeutycznym (4). Z uwagi na heterogenność genomową charakteryzującą HGOC, standardem postępowania jest chirurgiczne usunięcie guza, po czym następuje zastosowanie chemioterapii skojarzonej z użyciem pochodnych platyny (np. cisplatyna) i inhibitora depolaryzacji mikrotubul - paklitakselu. Pomimo początkowej odpowiedzi klinicznej u większości pacjentek, bardzo często dochodzi do nawrotu choroby, a 5-letnie przeżycie całkowite w stadium IV HGOC wynosi mniej niż 20% (158,174). Brak skutecznych strategii leczenia skłonił badaczy TCGA do kompleksowej analizy zaburzeń genomicznych i epigenomicznych w klinicznych próbkach HGOC, w wyniku których ustalono następujące kluczowe aspekty dotyczące HGOC: zidentyfikowanie dominującej roli mutacji *TP53* i rozległych zmiany liczby kopii DNA, opracowanie wstępnych sygnatur transkrypcyjnych związanych z przeżyciem, odkrycie zróżnicowanych mechanizmów inaktywacji *BRCA1/2* i wpływu aberracji *CCNE1* (4). Dane genomowe uzyskane w badaniu TCGA posłużyły następnie jako baza do udoskonalenia sygnatur opartych na transkryptach do przewidywania ryzyka nawrotu i wyników terapii pacjentek z HGOC (175). Kontynuacją badań TCGA zajęło się także konsorcjum CPTAC, wzbogacając analizy we wgląd w profil proteomiczny HGOC (176,177). W badaniu CPTAC z 2016 roku naukowcy uzyskali panel 90-białek, których

ilość silnie korelowała z przeżyciem pacjentów (176). Z kolei w badaniu z 2020 roku przeprowadzonym w ramach CPTAC zidentyfikowano guzy o niewielkiej ilości konkretnych białek, które były silnie związane ze znacznie krótszym czasem przeżycia pacjentek, podczas gdy białka te występujące w guzach w średniej ilości korelowały z dłuższym czasem przeżycia. Co więcej, kompleksowa analiza aktywności kinaz wskazuje na kluczową rolę kontroli cyklu komórkowego i stresu replikacyjnego w HGOC, a identyfikacja wielu CDK o zwiększonej aktywności w guzach w porównaniu z tkanką prawidłową sugeruje potencjalne zastosowanie zatwierdzonych przez FDA inhibitorów CDK w HGOC (177). Doniesienia te stanowią nieoceniony zasób informacji dla klinicyстів w celu odpowiedniego doboru terapii celowanych w HGOC.

1.4.11 Rak jelita grubego (CRC)

Rak jelita grubego (ang. *Colorectal cancer*, CRC) jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie. Według danych GLOBOCAN, w 2020 roku odnotowano niemal 2 miliony zachorowań na raka jelita grubego na całym świecie, a śmiertelność z powodu tego typu nowotworu wyniosła ponad 900 tysięcy osób (1). Pomimo tego, iż ogólna śmiertelność zmniejsza się na przestrzeni lat, co wiąże się z naciskiem na profilaktykę nowotworów i wcześniejszym rozpoznawaniem choroby dzięki badaniom przesiewowym i lepszym metodom leczenia, niepokojącym zjawiskiem jest wzrost zachorowalności na raka jelita grubego wśród osób poniżej 50 roku życia (178,179). U około 50%-60% chorych z rozpoznaniem raka jelita grubego występują przerzuty, a u 80%-90% tych chorych stwierdza się nieresekcyjną chorobę przerzutową wątroby (179).

Podział raka jelita grubego na raka okrężnicy i raka odbytnicy jest podziałem głównie anatomicznym (180). TCGA początkowo badało raka okrężnicy jako odrębnego od raka odbytnicy, jednakże wiele analiz przypadków raka okrężnicy i raka odbytnicy wskazało, że różnice między tymi nowotworami są na tyle niewielkie, iż należy traktować raka okrężnicy i raka odbytnicy jako jeden typ nowotworu (6), choć podejście to nie jest do końca akceptowane w środowisku klinicznym (181).

W przypadku CRC za liczne zmiany genetyczne (np. mutacje w genach takich jak *APC*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, mutacje w genach systemu naprawy DNA czy zaburzenia ścieżek sygnałowych takich jak TGF- β) odpowiedzialna jest głównie niestabilność genomowa (182), która może przejawiać się jako niestabilność chromosomalna (ang. *Chromosomal instability*, CIN), niestabilność mikrosatelitarna (ang. *Microsatellite*

instability, MSI) oraz fenotyp metylatora wysp CpG (ang. *CpG Islands Methylator Phenotype*, CIMP). Podczas rozwoju CRC wspomniane zmiany mogą pojawiać się osobno bądź też w kombinacjach (np. CIMP zwykle pojawia się wraz z MSI, ze względu na metylację i wyciszenie genów naprawy DNA), co jest też przyczyną heterogenności CRC (183). Choć proponowano wcześniej różne rodzaje klasyfikacji CRC (184), jednym z nowszych systemów podziału CRC jest klasyfikacja CMS (ang. *Consensus Molecular Subtypes*) oparta na różnicowaniu molekularnym.

Klasyfikacja CMS została opracowana na podstawie danych wieloomicznych i uwzględnia różnice w przebiegu klinicznym i odpowiedzi na chemioterapię i leczenie biologiczne. W ramach klasyfikacji CMS rozróżnia się cztery następujące podtypy CRC: 1) CMS1 (immunologiczny, MSI) - związany z wysoką częstotliwością MSI, silną aktywacją immunologiczną, hipermutacją i hipermetylacją oraz wiąże się z lepszym rokowaniem, zwłaszcza w przypadku wczesnej diagnozy; 2) CMS2 (kanoniczny) - najczęściej rozpoznawany podtyp (37% przypadków CRC), charakteryzuje się CIN, wysoką ekspresją genów szlaku Wnt/b-kateniny i czynnika transkrypcyjnego *MYC*, odpowiedzialnego za proliferację i różnicowanie komórek. CMS2 nie jest związany z hipermutacją, a rearanżacje chromosomalne i aneuploidia są znacznie częściej obserwowane niż w przypadku podtypu CMS1. Charakterystyczna jest utrata genu supresorowego *APC*, inaktywacja *TP53* i mutacja w genie *KRAS*. Z klinicznego punktu widzenia, podtyp ten wiąże się z dobrym rokowaniem, a pięcioletnie przeżycie całkowite jest najwyższe spośród wszystkich typów; 3) CMS3 (metaboliczny) - w niewielkim stopniu obejmuje przypadki CIN, natomiast głównie charakteryzuje się występowaniem mutacji genu *KRAS* (68% przypadków). W około 5% przypadków notuje się amplifikację genu *HER2*. CMS3 ma stosunkowo korzystne rokowanie, ponieważ niezależnie od stadium choroby, około 75% pacjentów przeżywa dłużej niż 5 lat; 4) CMS4 (mezenchymalny) - oznaczany w około 23% przypadków CRC, charakteryzuje się wzmożoną angiogenezą, aktywacją szlaku TGF- β oraz ekspresją białek związanych z mikrozapaleniem. Podtyp ten wiąże się z częstymi nawrotami i złym rokowaniem (184–187).

W 2019 roku badacze CPTAC na podstawie analiz proteogenomicznych dokonali nieco innej klasyfikacji CRC nazwanej UMS (ang. *Unified multi-omics subtypes*). Klasyfikacja UMS wyróżnia trzy podtypy CRC: MSI, CIN i podtyp mezenchymalny. Jak wskazują autorzy badania, klasyfikacja ta jest zgodna z wcześniejszymi badaniami transkryptomicznymi i proteomicznymi, które niezależnie powiązały CMS1 z MSI-High (wysoka częstotliwość MSI) i hipermutacją, CMS2 z CIN, a CMS4 z przejściem

nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT). Klasyfikacja UMS wyeliminowała podtyp CMS3 ze względu na zróżnicowany charakter molekularny i przypisała guzy CMS3 do innych podtypów UMS (46). Uwzględniając system klasyfikacji UMS, dzięki analizom proteogenomicznym badaczom CPTAC udało się zrozumieć, dlaczego większość pacjentów z CRC z wysoką częstotliwością MSI (MSI-High) nie odpowiada na leczenie zatwierdzonym przez FDA lekiem immunoterapeutycznym - pembrolizumabem, przeznaczonym do leczenia tego podtypu CRC. Odkryto, że niektóre guzy CRC MSI-High wykazywały wyższe ilości enzymów zaangażowanych w kontrolę glikolizę, czyli procesu, który wykorzystywany jest przez komórki do wytwarzania energii, przy jednoczesnym niskim poziomie infiltrujących komórek odpornościowych w porównaniu z guzami niedefiniowanymi jako MSI-High (46). Odkrycie związku między glikolizą a poziomem komórek odpornościowych jest niewątpliwie bardzo ważnym doniesieniem, ponieważ wyznacza nowe potencjalne podejścia terapeutyczne dla pacjentów z CRC charakteryzującym się MSI-H, który jest odporny na immunoterapię. Praca badaczy CPTAC podkreśla również wagę zintegrowanych badań proteogenomicznych, ukierunkowanych na terapie celowane.

1.4.12 Rak żołądka o wczesnym początku (EOGC)

Rak żołądka (ang. *Gastric cancer*, GC) jest jednym z najagresywniejszych typów nowotworów złośliwych, z odnotowaną śmiertelnością w 2020 roku na poziomie ponad 700 tysięcy osób na całym świecie (1). Najwięcej przypadków zachorowalności i umieralności na raka żołądka odnotowuje się w Azji Wschodniej, Europie Wschodniej i Ameryce Południowej (1). Do czynników ryzyka GC należą: zakażenie bakterią *Helicobacter pylori*, zakażenie wirusem *Epstein-Barr* (EBV), wiek, palenie papierosów, a także dieta obfitująca w wysokie spożycie soli, alkoholu, grillowanych mięs czy przetworzone produkty i uboga w warzywa i owoce. GC jest chorobą wysoce heterogenną zarówno pod kątem molekularnym, jak i fenotypowym. Podstawową metodą leczenia wczesnie zdiagnozowanego GC jest endoskopowa resekcja, natomiast w przypadku operacyjnego raka żołądka w nieco bardziej zaawansowanym stadium stosuje się leczenie chirurgiczne obejmujące także limfadenektomię. Dodatkowo, u pacjentów z GC w stadium 1B lub wyższym zastosowanie ma chemioterapia okołoperacyjna lub adjuwantowa, co ma wpływ na poprawę przeżycie całkowitego pacjentów. Terapie celowane, które są dopuszczone do leczenia GC obejmują trastuzumab (w przypadku pacjentów

HER2- dodatnich), ramucirumab (terapia przeciwdziałająca angiogenezie) oraz niwolumab lub pembrolizumab (terapia anty-PD-1) (188,189).

W ciągu ostatnich lat zaproponowano kilka różnych systemów klasyfikacji molekularnej raka żołądka, podejmując wysiłek powiązania cech molekularnych GC z fenotypami histologicznymi i cechami klinicznymi (190–193). W 2014 roku TCGA opublikowało wyniki kompleksowych analiz genomicznych, w wyniku których wyodrębniono cztery molekularne podtypy GC: 1) EBV+ - związany z wirusem Epstein-Barr, charakteryzujący się częstymi mutacjami PIK3CA, hipermetylacją DNA oraz amplifikacją *JAK2*, *CD274* (PD-L1) i *PDCD1LG2*; 2) MSI - związany z niestabilnością mikrosatelitarną i wysokim wskaźnikiem mutacji; 3) stabilny genomycznie - zawierający wariant histologiczny rozlany, z mutacjami w *RHOA* (ang. *Ras Homolog Family Member A*, bierze udział m.in. w progresji cyklu komórkowego i transformacji komórkowej); 4) CIN - związany z niestabilnością chromosomową, wykazuje aneuploidię i amplifikację genów kodujących receptorowe kinazy tyrozynowe (194). MSI, CIN i EBV+ już wcześniej zostały zidentyfikowane jako odrębne podtypy GC, jednak nigdy nie dokonano tak szczegółowej charakterystyki pod względem molekularnym jak w badaniu TCGA (188). Klasyfikowanie GC jest istotne, ponieważ różne typy GC mogą być związane z różnymi czynnikami ryzyka, rokowaniem i postępowaniem terapeutycznym oraz stanowi podstawę do zrozumienia tej choroby i jej mechanizmów, umożliwiając rozwój terapii celowanych.

Ze względu na wzrastającą liczbę zachorowań na raka żołądka wśród młodych ludzi (poniżej 45 roku życia) (1,158,195), szczególne zainteresowanie badaczy wzbudza rak żołądka we wczesnym stadium (ang. *Early-onset gastric cancer*, EOGC). W zależności od przeprowadzonych badań kohortowych, szacuje się, że około 10% GC klasyfikowanych jest jako EOGC (196). Ze względu na to, iż młodzi pacjenci są mniej narażeni na środowiskowe czynniki rakotwórcze, EOGC stanowi dobry model do badania zmian genetycznych w procesie kancerogenezy żołądka (197,198). Zakażenie *H. pylori* ma znaczenie dla rozwoju nowotworów u pacjentów EOGC, jednakże polimorfizmy genu *IL1β*, który koduje cytokinę prozapalną IL1β, nie różnią się znacząco pomiędzy młodszymi i starszymi pacjentami z EOGC (199). Z kolei u większości przypadków z EOGC zakażenie EBV diagnozuje się bardzo rzadko lub nie występuje ono w EOGC wcale w porównaniu z GC u starszych pacjentów (200).

Reprezentując podejście proteogenomiczne, badacze z Korei z ramienia Międzynarodowego Konsorcjum Proteogenomu Raka (ang. *International Cancer*

Proteogenome Consortium, ICPC) będącego partnerem CPTAC przeprowadzili analizy próbek EOGC. Za pomocą analiz proteogenomicznych, na podstawie danych o N- glikozylacji i fosforylacji, zidentyfikowano ścieżki sygnałowe skorelowane z mutacjami somatycznymi w EOGC. Jedno z odkryć stanowi obserwacja, że gen *ARID1A* jest często zmutowany w EOGC związanym ze złym rokowaniem, a dane dotyczące fosforylacji wykazały, że warianty w genie *ARID1A*, który koduje podjednostkę kompleksu przebudowy chromosomów zaangażowanego w różnicowanie i proliferację komórek, korelują ze zwiększoną fosforylacją białek charakterystycznych dla szlaków sygnałowych, takich jak m.in. WNT, PI3K-AKT i mTOR. Ponadto, analizy proteogenomiczne wskazały, że młodzi pacjenci z rozlanym podtypem GC mogą być stratyfikowani na dwie grupy – z dobrym rokowaniem lub ze złym rokowaniem poprzez przewidywanie, czy pacjent wykazuje podwyższony lub obniżony poziom ekspresji mRNA/białka czterech onkogenów (spośród *CTGF*, *NRP1*, *RAB23*, *AXL*, *LAMC1* i *STOM* wskazanych w badaniu) i dwóch supresorów guza (*SH3GLB2* i *TNK1*) oraz czy pacjent należy do podtypu 2 lub 4 (dobre lub złe rokowanie, odpowiednio) w oparciu o sygnatury molekularne mRNA i białek. Co więcej, pacjenci mogą być również podzieleni na wrażliwych i opornych na leki poprzez przewidywanie wrażliwości na leki w oparciu o związki mutacji i fosforylacji *ARID1A*, *CDH1* i *RHOA* (49). Zarówno opisane pokrótce badanie Mun i wsp., oparte na analizie proteogenomicznej, jak i inne tego typu badania pokazują, że dane proteomiczne zapewniają dodatkowy wgląd w zrozumienie biologii EOGC i umożliwiają klasyfikację pacjentów z EOGC, przyczyniając się do poprawy i skutecznego leczenia nowotworów.

Rozdział II

Założenia i cel pracy

Głównym celem pracy jest przeprowadzenie kompleksowych analiz proteogenomicznych, które wskażą potencjalnie nowe mechanizmy molekularne odpowiadające za procesy nowotworzenia u ludzi oraz formowanie przerzutów. Jednocześnie, otrzymane wyniki umożliwią selekcję nowych celów białkowych dla terapii personalizowanych. Ponadto, wyniki analiz molekularnych będą korelowane z przebiegiem leczenia chorych, co będzie miało znaczenie w opracowywaniu nowych biomarkerów predykcyjnych dla obecnych i przyszłych terapii przeciwnowotworowych. Otrzymane wyniki niewątpliwie przyczynią się do zdobycia nowej wiedzy na temat podstawowych mechanizmów biologii nowotworów oraz będą stanowić podstawę do dalszego rozwoju personalizowanego leczenia nowotworów zarówno w Polsce, jak i na świecie.

Cele szczegółowe pracy obejmują:

1. Ocenę stopnia odróżnicowania onkogenego dla próbek guzów zakwalifikowanych do projektu CPTAC dla 12 typów nowotworów: raka piersi, raka jasnokomórkowego nerki, raka endometrium, glejaka wielopostaciowego, pediatrycznych guzów mózgu, płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, gruczolakoraka płuc, raka płaskonabłonkowego płuc, gruczolakoraka trzustki, raka jelita grubego, raka jajnika i gruczolakoraka żołądka we wczesnym stadium za pomocą nowego indeksu macierzystości nowotworów opartego o ekspresję białek (PROTsi),
2. Korelację wyników analiz proteogenomicznych z danymi klinicznymi pacjentów biorących udział w projekcie CPTAC w celu identyfikacji markerów białkowych skorelowanych z macierzystością nowotworów służących do stratyfikacji pacjentów i predykcji progresji nowotworowej w postaci wznowy lub przerzutów,
3. Walidację wybranych markerów białkowych związanych z macierzystością dla raka jasnokomórkowego nerki i płaskonabłonkowego raka głowy i szyi za pomocą immunohistochemii z użyciem bloczków parafinowych pozyskanych od pacjentów stanowiących niezależne kohorty walidacyjne,
4. Identyfikację inhibitorów ścieżek związanych z macierzystością nowotworów i ich mechanizmów działania w oparciu o zidentyfikowane białka związane z macierzystością i narzędzie CMap.

Rozdział III

Materialy i metody

3.1 Próbkę pozyskane od pacjentów

W niniejszej pracy wykorzystano dane proteogenomiczne i kliniczne uzyskane łącznie od 1424 uczestników z 12 histopatologicznie zdefiniowanymi typami nowotworów, zakwalifikowanych do udziału w programie CPTAC. Spośród całkowitej liczby próbek, dane proteogenomiczne i kliniczne były dostępne dla 134 próbek z rakiem piersi (BR)(37), 110 z rakiem jasnokomórkowym nerki (CCRCC) (40), 109 z gruczolakorakiem jelita grubego (CO) (46), 100 z glejakiem wielopostaciowym (GBM) (42), 110 z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (HNSCC) (44), 110 z rakiem płaskonabłonkowym płuc (LSCC) (45), 111 z gruczolakorakiem płuc (LUAD) (38), 110 z rakiem jajnika (OV) (47), 140 z gruczolakorakiem prostaty (PDA) (48), 103 z rakiem trzonu macicy (UCEC) (41) oraz 218 próbek pediatrycznych guzów mózgu (PBT), grupy dziecięcych guzów mózgu składających się z atypowego teratoidalnego guza rabdoidalnego (ATRT, n = 12), czaszko gardłaka (*craniopharyngioma*, n = 16), wyściółczaka (*ependymoma*, n = 32), zwojakoglejaka (*ganglioglioma*, n = 18), glejaka niskiego stopnia (LGG, n = 93), glejaka wysokiego stopnia (HGG, n = 25) i rdzeniaka zarodkowego (*medulloblastoma*, n = 22) (43).

Dodatkowo, wykorzystano dostępne dane proteogenomiczne i kliniczne pochodzące od 80 pacjentów, u których zdiagnozowano raka żołądka o wczesnym początku (EOGC)(49), zebrane dla ICPC, będącego partnerem CPTAC.

Wszystkie próbki zostały pozyskane od pacjentów podczas rutynowych zabiegów resekcji guzów za świadomą zgodą pacjentów i zgodnie z wytycznymi i standardami CPTAC.

3.2 Dane kliniczne i molekularne próbek

Dane kliniczne i molekularne wszystkich próbek CPTAC zostały pozyskane z tzw. miejsc źródłowych tkanek (ang. *Tissue Source Sites*, TSSs) i zgromadzone w wewnętrznej bazie danych CPTAC zwanej CDR (ang. *Comprehensive Data Resource*) zsynchronizowanej z Centrum Koordynacji Danych CPTAC (ang. *Data Coordinating Center*, DCC).

3.3 Dane proteogenomiczne

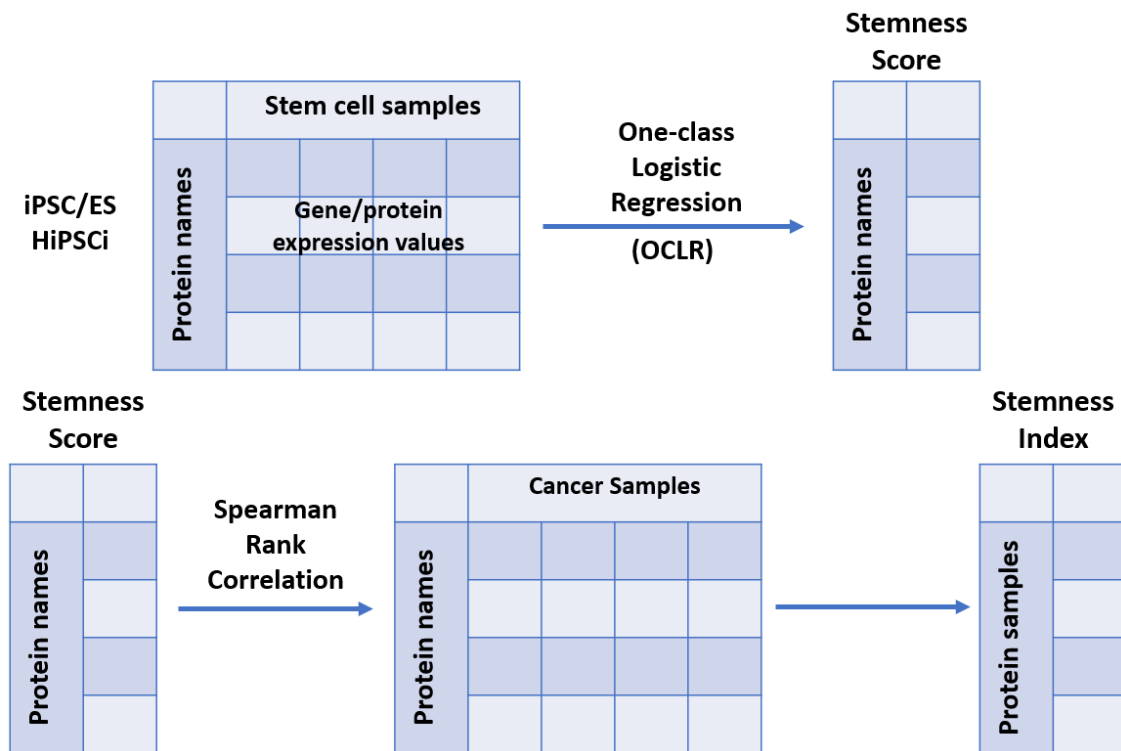
Dane proteogenomiczne zawierające ekspresję mRNA, miRNA i białek oraz dane dotyczące metylacji DNA, zmiany liczby kopii (CNV) i fosforylacji białek zostały opracowane i znormalizowane przez członków CPTAC AWGs (ang. *Analysis Working Groups*) odpowiedzialnych za tę część pracy w projekcie CPTAC. Opracowane i znormalizowane dane zostały udostępnione członkom projektu CPTAC do dalszych analiz. Komplet wyżej wymienionych danych proteogenomicznych dostępny był dla następujących typów nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC, natomiast dla BR, OV, CO i EOGC dostępne dane obejmowały wyłącznie ekspresję mRNA i białek, a dla PBT dostępne były dodatkowo dane fosfoproteomiczne.

3.4 Wskaźnik macierzystości powstały w oparciu o ekspresję białek (PROTsi)

Wskaźnik macierzystości oparty o ekspresję białek (ang. *Protein expression-based stemness index*, PROTsi) ma na celu wskazanie, w jakim stopniu próbki guzów otrzymane od pacjentów nowotworowych dzielą cechy z komórkami macierzystymi, czyli jak bardzo komórki nowotworowe są podobne do komórek macierzystych. Wartość PROTsi waha się od 0 do 1, gdzie 0 oznacza niskie podobieństwo do komórek macierzystych, a 1 wskazuje na wysokie podobieństwo komórek nowotworowych do komórek macierzystych.

Aby obliczyć indeks macierzystości (ang. *stemness index*, si) oparty o ekspresję białek, zbudowano model predykcyjny przy użyciu algorytmu jednoklasowej regresji logistycznej (OCLR) (78) na próbkach indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) ze zbioru danych HipSci (201). Konsorcjum HipSci (ang. *Human Induced Pluripotent Stem Cells Initiative*) wygenerowało duży, wysokiej jakości referencyjny panel ludzkich linii komórkowych iPSC, składający się z setek linii komórkowych pochodzących od fenotypowo zdrowych dawców oraz kilku kohort dawców będących nosicielami dziedzicznych chorób genetycznych (201). Zastosowanie wartości ekspresji białek uzyskanych z 211 próbek HipSci iPSC i poddanie ich algorytmowi OCLR umożliwiło obliczenie wagi dla każdego białka w oparciu o macierzystość, uzyskując w ten sposób tzw. współczynnik macierzystości (*stemness score*). Następnie wykorzystano uzyskany współczynnik macierzystości (*stemness score*) i korelację rang Spearmana do klasyfikacji próbek guzów pacjentów (obliczenie korelacji Spearmana pomiędzy wektorem wagowym modelu a profilem ekspresji próbek guzów), otrzymując w ten sposób wskaźnik macierzystości (*stemness index*) oparty o ekspresję białek (PROTsi).

Schemat procesu otrzymania PROTsi został przedstawiony na Rycinie 3.1. poniżej.



Rycina 3.1. Schemat procesu opracowania PROTsi

3.5 Stratyfikacja typów guzów CPTAC, ich podtypów oraz prawidłowej tkanki sąsiadującej według PROTsi

W celu stratyfikacji guzów CPTAC, ich podtypów i prawidłowej tkanki sąsiadującej (ang. *Normal adjacent tissue*, NAT) zastosowano proteomiczny wskaźnik macierzystości PROTsi do próbek guzów i NAT. Wygenerowano wykresy pudełkowe do stratyfikacji guzów CPTAC według typu tkanki (porównanie próbek nowotworowych z prawidłowymi), natomiast tylko próbki nowotworowe posłużyły do stratyfikacji stopni zaawansowania histologicznego i podtypów molekularnych przez PROTsi. Wykresy pudełkowe zostały wygenerowane przy użyciu funkcji `ggboxplot` z pakietu `ggpubr` w programie R i dodatkowych funkcji z pakietu `ggplot2` programu R. Wartości istotności statystycznej uzyskano przy użyciu funkcji `stat_compare_means` z pakietu R `ggpubr` z użyciem metody statystycznej "anova" do porównania średnich. Wyniki z wartością istotności statystycznej $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

3.6 Korelacja ekspresji genów i białek z PROTsi w próbkach nowotworowych

Korelację Spearmana obliczono pomiędzy PROTsi a wszystkimi genami z macierzy ekspresji genów RNAseq dla wszystkich analizowanych typów nowotworów,

otrzymując plik wyjściowy Spearman_Rho_RNA, wykorzystując funkcję `spearman.test` z pakietu programu R `pspearman`. Następnie obliczono korelację Spearmana pomiędzy PROTsi a wszystkimi białkami z macierzy ekspresji białek dla wszystkich analizowanych typów nowotworów, otrzymując plik wyjściowy Spearman_Rho_PROT, w ten sam sposób. Po wykonaniu tych dwóch analiz oszacowano dla każdego transkryptu i każdego białka średnią pomiędzy Spearman_Rho_RNA i Spearman_Rho_PROT, otrzymując wartości Rho_RNA_Prot_Mean. Następnie wartości Rho_RNA_Prot_Mean posortowano najpierw w kolejności malejącej, aby wybrać 50 najbardziej pozytywnie skorelowanych białek z PROTsi, a następnie w kolejności rosnącej, aby wybrać 50 najbardziej negatywnie skorelowanych białek z PROTsi. W ten sposób uzyskano listę 100 celów (targetów) białkowych związanych z macierzystością dla każdego analizowanego typu nowotworu. Uwzględniono wyłącznie wyniki z założoną wartością istotności statystycznej $p < 0,05$.

3.7 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z danymi fosforylacyjnymi

Korelację między zidentyfikowanymi białkami związanymi z macierzystością z danymi fosforylacji białek obliczono w oparciu o dane fosforylacyjne opracowane przez CPTAC AWGs dla następujących typów nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA, UCEC i PBT. Korelację rang Spearmana określono pomiędzy wszystkimi miejscami fosforylacji z macierzy ekspresji fosforylowanych białek a ekspresją każdego ze 100 zidentyfikowanych wcześniej białek, używając funkcji `spearman.test` z pakietu programu R `pspearman`. Uwzględniono wyłącznie wyniki z założoną wartością istotności statystycznej $p < 0,05$.

3.8 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z ekspresją miRNA

Korelacja między zidentyfikowanymi białkami związanymi z macierzystością a ekspresją miRNA została obliczona na podstawie danych o miRNA, przygotowanych przez CPTAC AWGs dla następujących typów nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC. Korelację rang Spearmana obliczono pomiędzy wszystkimi przefiltrowanymi miRNA z macierzy ekspresji miRNAseq a ekspresją każdego ze 100 zidentyfikowanych wcześniej białek, używając funkcji `spearman.test` z pakietu R `pspearman`. Z bazy danych miRDB (<http://mirdb.org/>), która zapewnia informacje dotyczące miRNA i przewiduje ich geny docelowe, pobrano wszystkie przewidywane miRNA dla każdego z białek, które następnie skorelowano z danymi miRNA z macierzy

ekspresji miRNA. Pobrane z bazy miRDB miRNA targetujące analizowane białka posiadały przypisany tzw. miRDB target score (0 - 100), który wskazuje prawdopodobieństwo, że interakcja między konkretnym miRNA a białkiem jest biologicznie istotna. W ten sposób zidentyfikowano interakcje miRNA-białko, które z największym prawdopodobieństwem mają funkcjonalne znaczenie w kontekście macierzystości i ekspresji białek. Uwzględniono wyłącznie wyniki z założoną wartością istotności statystycznej $p < 0,05$.

3.9 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością ze zmiennością liczby kopii (CNV)

W celu przeprowadzenia analizy korelacji pomiędzy zidentyfikowanymi białkami związanymi z macierzystością a danymi dotyczącymi zmienności liczby kopii (ang. *Copy number variations*, CNV) wykorzystano dane CNV opracowane przez CPTAC AWGs dla następujących typów nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC. Korelacja rang Spearmana została obliczona pomiędzy ekspresją każdego ze 100 zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością i CNV z macierzy somatycznych CNV przy użyciu funkcji `spearman.test` z pakietu programu R `pspearman`. Uwzględniono wyłącznie wyniki z założoną wartością istotności statystycznej $p < 0,05$.

3.10 Korelacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością z metylacją DNA

Analiza korelacji pomiędzy zidentyfikowanymi białkami związanymi z macierzystością a metylacją DNA została przeprowadzona z wykorzystaniem danych o metylacji DNA opracowanych przez CPTAC AWGs dla nowotworów CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC. Dane o metylacji DNA skupiały poziomy metylacji sond zlokalizowanych zarówno w wyspach CpG, jak i w regionach promotorów (w tym 5'UTR). Uwzględniono wyłącznie wyniki z założoną wartością istotności statystycznej $p < 0,05$.

3.11 Korelacja zidentyfikowanych białek z danymi klinicznymi (OS, PFS)

Dla każdego ze zidentyfikowanych 100 białek związanych z macierzystością obliczono współczynnik ryzyka (HR) i przeprowadzono test log-rank w oparciu o PROTs i przeżycie całkowite (OS) oraz przeżycie wolne od progresji (PFS). Dane kliniczne wraz z danymi dotyczącymi przeżycia (OS, PFS) wykorzystanymi do analizy pozyskano w sposób opisany w podrozdziale 3.2. Analizy te zostały włączone do map cieplnych

przygotowanych dla CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC. Wyniki z wartością istotności statystycznej $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

3.12 Adnotacje dotyczące przynależności zidentyfikowanych białek do rodzin funkcjonalnych

W celu przypisania zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością do ich rodzin funkcjonalnych wykorzystano platformę InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Platforma InterPro łączy informacje z różnych baz danych takich jak Pfam, PROSITE, PRINTS i innych, aby zapewnić kompleksową klasyfikację domen białkowych i adnotacji funkcjonalnych (202). Nazwy genów kodujących łącznie 700 białek związanych z macierzystością, zidentyfikowanych dla CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC wpisano do pola "query" InterPro i otrzymano adnotacje dotyczące rodzin funkcjonalnych wyszukiwanych białek. Adnotacje funkcjonalne białek następnie zintegrowano z mapami cieplnymi.

3.13 Weryfikacja białek związanych z macierzystością w bazie danych aktualnie istniejących białkowych celów lekowych

W celu sprawdzenia, czy i jakie białka uprzednio zidentyfikowane jako związane z macierzystością należą do aktualnie istniejących białkowych celów lekowych wykorzystano platformę Open Targets. Open Targets stanowi kompleksowe narzędzie, które umożliwia systematyczną identyfikację celów terapeutycznych leków (203).

Wykorzystując Open Targets, pobrano adnotacje dla 700 białek najbardziej związanych z macierzystością, zidentyfikowanych dla CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC i pobrano listę zawierającą dane o interakcjach cel białkowy-lek. W ten sposób otrzymano odpowiednie adnotacje, czy analizowane białka związane z macierzystością są aktualnie identyfikowane jako cele dla leków. Adnotacje te zamieszczono na mapach cieplnych przygotowanych dla analizowanych typów nowotworów.

3.14 Kategoryzacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością

Białka najbardziej związane z macierzystością, czyli znajdujące się w pierwszej 100 zidentyfikowanych białek skorelowanych z PROTsi w analizowanych typach nowotworów zostały poddane kategoryzacji. Wszystkie białka zidentyfikowane jako pozytywnie skorelowane z macierzystością w 7 typach nowotworów w pierwszej

kolejności zebrano razem, a następnie posortowano i dokonano podziału tychże białek na dwie grupy: grupę pierwszą, zawierającą białka powtarzające się w co najmniej dwóch typach nowotworów oraz grupę drugą, składającą się z białek zidentyfikowanych wyłącznie w jednym konkretnym typie nowotworu. Podobnie postąpiono z białkami negatywnie skorelowanymi z macierzystością, również otrzymując podział na dwie grupy białek wspólnych dla nowotworów i białek specyficznych tylko dla konkretnych typów. W rezultacie, białka przyporządkowano według następującej klasyfikacji: białka specyficzne dla nowotworu - to białka zidentyfikowane tylko w jednym typie guza, białka wspólne dla kilku typów nowotworów - zidentyfikowane w 2 lub 3 typach guzów i tzw. białka pan-nowotworowe (ang. *Pan-cancer proteins*) - zidentyfikowane w 4 lub więcej typach nowotworów.

3.15 Kryteria wyboru markerów białkowych do walidacji za pomocą IHC

Walidacja markerów białkowych związanych z macierzystością, mająca na celu wykazanie wartości prognostycznej białek zidentyfikowanych za pomocą analiz bioinformatycznych została przeprowadzona za pomocą techniki immunohistochemii (IHC), opisaną w dalszych podrozdziałach pracy.

Głównym kryterium selekcji markerów białkowych związanych z macierzystością do walidacji IHC była korelacja ekspresji danego markera białkowego określonej za pomocą spektrometrii mas (LC-MS/MS) z macierzystością próbek guza zmierzoną przy użyciu PROTsi.

Dodatkowe kryteria wyboru obejmowały:

- Marker białkowy jest wybierany, gdy znajduje się w grupie 50 białek najbardziej skorelowanych z macierzystością, przy czym korelacja może być pozytywna bądź negatywna i/lub
- Marker białkowy jest wybierany, gdy ulega ekspresji wyłącznie w jednym typie nowotworu lub jest wspólny dla wielu typów nowotworów i/lub
- Marker jest wybrany, gdy ulega ekspresji wyłącznie w jednym podtypie molekularnym nowotworu lub jest wspólny dla wielu podtypów molekularnych danego nowotworu i/lub
- Marker jest wybierany, gdy jego ekspresja jest skorelowana z cechami kliniczno-patologicznymi, tj. przeżyciem całkowitym (OS), przeżyciem wolnym od progresji (PFS) czy obecnością przerzutów odległych lub odnotowaną wznową i/lub

- Marker jest wybierany, gdy jego biologia wiąże się z teorią macierzystości nowotworów.

3.16 Kohorty walidacyjne IHC

Kohorta walidacyjna CCRCC składała się z 52 przypadków CCRCC, zebranych w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. J. Strusia w Poznaniu. Z całkowitej liczby 52 przypadków CCRCC, 36 przypadków zostało włączonych do kohorty CPTAC CCRCC (40). Wszyscy pacjenci włączeni do kohorty walidacyjnej CCRCC wyrazili pisemną świadomą zgodę na pobranie tkanek i zbior danych klinicznych do celów naukowych. Kryteria włączenia do kohorty walidacyjnej CCRCC uwzględniały: 1) pacjentów z nowo rozpoznany guzem nerki, poddanych leczeniu chirurgicznemu (radykałna nefrektomia lub organooszczędna resekcja guza), u których potwierdzono rozpoznanie raka jasnokomórkowego nerki, 2) brak wcześniejszego leczenia systemowego w postaci chemioterapii czy leków biologicznych, 3) regularną 6-miesięczną obserwację, 4) pacjentów pełnoletnich.

Próbki w kohorcie walidacyjnej CCRCC przydzielono do dwóch następujących grup: grupy ze złym rokowaniem, składającej się z 26 pacjentów, u których w ciągu 5 lat od operacji guza pierwotnego rozwinęły się przerzuty oraz grupy z dobrym wynikiem klinicznym skupiającej 26 pacjentów, którzy nie rozwinęli przerzutów w tym czasie. Tabela 3.1. zawiera szczegółowe dane kliniczne pacjentów i próbek włączonych do kohorty walidacyjnej CCRCC.

Tabela 3.1. Charakterystyka kohorty walidacyjnej CCRCC

Numer	Identyfikator próbki	Próbka włączona do kohorty CPTAC CCRCC?	Data operacji guza pierwotnego	Data pojawienia się przerzutu	Wiek w momencie operacji guza pierwotnego	Data śmierci	Stopień zaawansowania histologicznego (G)	Lokalizacja przerzutu	Liczba dni od daty operacji do daty zwnowy lub ostatniego kontaktu, gdy brak wznowy - PFS	Przerzut - tak (1) lub nie (0)	Liczba dni od daty operacji do daty śmierci lub ostatniego kontaktu, gdy pacjent żywy - OS	Stan pacjenta - zmarły (1) lub żywy (0)
1	C3N-00305	Tak	09-maj-16	11-sie-21	60	Zywy	G3	Brak przerzutu	1920	0	2226	0
2	C3N-00310	Tak	17-maj-16	09-lis-20	84	09-lis-20	G1	Brak przerzutu	1637	0	1637	1
3	C3N-00312	Tak	31-maj-16	11-sie-21	68	Zywy	G2	Brak przerzutu	1898	0	2204	0
4	C3N-00313	Tak	10-cze-16	11-sie-21	31	Zywy	G3	Brak przerzutu	1888	0	2194	0
5	C3N-00315	Tak	28-cze-16	11-sie-21	68	Zywy	G2	Brak przerzutu	1870	0	2176	0
6	C3N-00320	Tak	12-lip-16	11-sie-21	67	Zywy	G3	Brak przerzutu	1856	0	2162	0
7	C3N-00437	Tak	18-sie-16	17-lut-21	69	17-lut-21	G2	Brak przerzutu	1644	0	1644	1
8	C3N-00491	Tak	01-wrz-16	22-gru-16	54	22-gru-16	G3	Brak przerzutu	112	0	113	1
9	C3N-00492	Tak	05-wrz-16	11-sie-21	49	Zywy	G2	Brak przerzutu	1801	0	2107	0
10	C3N-00494	Tak	13-wrz-16	11-sie-21	66	Zywy	G3	Brak przerzutu	1793	0	2099	0
11	C3N-00832	Tak	28-wrz-16	11-sie-21	79	Zywy	G2	Brak przerzutu	1778	0	2084	0
12	C3N-00834	Tak	07-paź-16	11-sie-21	65	Zywy	G2	Brak przerzutu	1769	0	2075	0
13	C3N-01175	Tak	21-lis-16	11-sie-21	60	Zywy	G1	Brak przerzutu	1724	0	2030	0
14	C3N-01178	Tak	29-lis-16	11-sie-21	58	Zywy	G2	Brak przerzutu	1716	0	2022	0
15	C3N-01179	Tak	13-gru-16	11-gru-21	72	Zywy	G2	Brak przerzutu	1824	0	2008	0
16	C3N-01180	Tak	13-gru-16	11-gru-21	51	Zywy	G2	Brak przerzutu	1824	0	2008	0
17	C3N-01361	Tak	19-gru-16	12-gru-21	48	Zywy	G2	Brak przerzutu	1819	0	2002	0
18	C3N-01648	Tak	06-lut-17	11-sie-21	69	Zywy	G2	Brak przerzutu	1647	0	1953	0
19	C3N-01657	Tak	05-kwi-17	11-sie-21	74	Zywy	G2	Brak przerzutu	1589	0	1895	0
20	C3N-01905	Tak	27-kwi-17	11-sie-21	59	Zywy	G1	Brak przerzutu	1567	0	1873	0
21	C3N-02263	Tak	12-maj-17	11-sie-21	69	Zywy	G2	Brak przerzutu	1552	0	1858	0
22	C3N-02266	Tak	22-maj-17	11-sie-21	56	Zywy	G1	Brak przerzutu	1542	0	1848	0
23	C3N-03018	Tak	13-wrz-17	11-sie-21	65	Zywy	G2	Brak przerzutu	1428	0	1734	0
24	C3N-03019	Tak	13-wrz-17	11-sie-21	46	Zywy	G2	Brak przerzutu	1428	0	1734	0
25	C3N-03020	Tak	19-wrz-17	18-sty-21	65	18-sty-21	G1	Brak przerzutu	1217	0	1217	1
26	C3N-03021	Tak	21-wrz-17	11-sie-21	50	Zywy	G3	Brak przerzutu	1420	0	1726	0
27	3086-94/13	Nie	2-lip-15	24-kwi-17	51	02-lip-17	G3	Kości	662	1	731	1
28	14119-28/18	Nie	11-paź-18	03-kwi-19	52	Zywy	G2	Kości	174	1	1341	0
29	C3N-01655	Tak	22-mar-17	01-sie-19	64	Zywy	G2	Nerka	862	1	1909	0
30	C3N-02264	Tak	16-maj-17	30-maj-17	68	Zywy	G2	Nerka	14	1	1854	0
31	10758-61/15	Nie	16-wrz-15	09-cze-21	56	Zywy	G2	Nerka	2093	1	2462	0
32	C3N-00831	Tak	30-wrz-16	07-lis-16	52	29-gru-17	G2	Płuca	38	1	455	1
33	C3N-01176	Tak	21-lis-16	05-gru-16	71	Zywy	G2	Płuca	14	1	2030	0
34	4585-97/19	Nie	14-mar-19	14-mar-19	62	Zywy	G3	Płuca	0	1	1187	0
35	5207-18/19	Nie	1-kwi-19	19-sty-21	50	Zywy	G3	Płuca	659	1	1169	0
36	13164-70/14	Nie	4-lis-14	15-maj-15	62	15-sty-16	G3	Płuca	192	1	437	1
37	8034-43/13	Nie	24-maj-13	12-lip-13	56	15-sie-17	G3	Płuca	49	1	1544	1
38	6072-76/16	Nie	04-maj-16	08-lis-11	57	27-wrz-18	G2	Płuca	0	1	876	1
39	6512-21/15	Nie	2-cze-15	13-wrz-18	55	Zywy	G3	Płuca	1199	1	2309	0
40	13980-89/15	Nie	23-lis-15	04-paź-17	50	Zywy	G2	Płuca	681	1	2394	0
41	8947-54/16	Nie	5-lip-16	25-sie-16	57	30-paź-19	G3	Płuca	51	1	1212	1
42	2652-59/14	Nie	26-lut-14	19-sty-15	54	Zywy	G1	Płuca, nerka	327	1	2878	0
43	16184-87/13	Nie	03-gru-13	09-kwi-14	42	26-kwi-14	G2	Płuca, wątroba, nerka	127	1	144	1
44	16102/9100	Nie	7-lip-16	28-wrz-17	80	30-gru-17	G2	Płuca, wątroba, nerka	448	1	541	1
45	13321-27/13	Nie	25-wrz-13	26-sie-14	58	23-lis-14	G1	Płuca, wątroba, nerka	335	1	424	1
46	C3N-01651	Tak	09-lut-17	06-lut-18	58	Zywy	G2	Płuco	362	1	1950	0
47	C3N-01656	Tak	04-kwi-17	01-paź-18	68	Zywy	G2	Płuco	545	1	1896	0
48	C3N-02262	Tak	13-maj-17	04-paź-17	67	Zywy	G2	Płuco	144	1	1857	0
49	C3N-00314	Tak	16-cze-16	01-lip-16	78	31-sie-16	G2	Wątroba	15	1	140	1
50	C3N-01649	Tak	7-lut-17	16-lut-17	51	Zywy	G2	Wątroba	9	1	1952	0
51	C3N-01654	Tak	13-mar-17	15-lip-20	64	Zywy	G3	Wątroba	1220	1	1918	0
52	11944-50/15	Nie	8-paź-15	18-wrz-15	52	17-sty-16	G3	Wątroba, kości, nerka	0	1	101	1

Kohorta walidacyjna HNSCC zawierała 60 przypadków HPV (-) HNSCC zebranych prospektywnie w Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Spośród 60 przypadków HNSCC, 30 przypadków włączono do kohorty CPTAC HNSCC (44). Wszyscy pacjenci włączeni do kohorty walidacyjnej HNSCC wyrazili pisemną świadomą zgodę na pobranie tkanek i zbiorów danych klinicznych do celów naukowych. Kryteria włączenia do kohorty walidacyjnej obejmowały: 1) lokalizację guza pierwotnego w krtani, gardle dolnym lub w jamie ustnej, 2) zaawansowane stadium guza pierwotnego (T2 - T4, N0 - N2, M0), 3) chirurgię jako pierwszą zastosowaną metodę leczenia zapewniającą uzyskanie próbek guza uprzednio nieleczonych (operacja została wykonana przy użyciu dobrze ugruntowanych technik chirurgicznych, w tym operacji robotycznej TransOral dla guzów zlokalizowanych w jamie ustnej, mikrochirurgii laserowej dla guzów zlokalizowanych w krtani oraz częściową lub całkowitą laryngektomię), 4) leczenie po wycięciu guza pierwotnego (pacjenci z guzem

pierwotnym charakteryzującym się jako T2 lub N1 ukończyli adjuwantową radioterapię (RT) 68-72 Gy, a pacjenci z guzem pierwotnym charakteryzującym się jako $\geq T3$ lub $>N1$ ukończyli adjuwantową radioterapię z chemioterapią), 5) regularną 2-miesięczną obserwację, 6) pełnoletność pacjentów.

Próbki w kohorcie walidacyjnej HNSCC przydzielono do dwóch grup: grupy z dobrym wynikiem klinicznym ($n = 30$) i grupy ze złym wynikiem klinicznym ($n = 30$). Grupa z dobrym wynikiem klinicznym składała się z pomyślnie wyleczonych chirurgicznie pacjentów, u których nie wystąpił nawrót w ciągu 5 lat obserwacji, podczas gdy grupa ze złym wynikiem klinicznym obejmowała pacjentów, u których doszło do wznowy lokoregionalnej w ciągu 24 miesięcy po operacji pierwotnego guza. Tabela 3.2. zawiera szczegółowe dane kliniczne pacjentów i próbek włączonych do kohorty walidacyjnej HNSCC.

Tabela 3.2. Charakterystyka kohorty walidacyjnej HNSCC

Numer	Identyfikator próbki	Problematyka do kohorty CPTAC HNSCC?	Data operacji guza pierwotnego	Data wznowy	Wiek w momencie operacji guza pierwotnego	Wielkość guza pierwotnego (T)	Data śmierci	Stan regionalnych węzłów chłonnych (N)	Przerzuty odległe (M)	Stopień zaawansowania histologicznego (G)	Localizacja guza pierwotnego	Adjuwantowa radioterapia (RT) lub chemioterapia (CT) z RT po leczeniu operacyjnym	Liczba dni od daty operacji do daty wznowy lub ostatniego kontaktu, gdy brak wznowy - PFS	Wznowa - tak (1) lub nie (0)	Liczba dni od daty operacji do daty śmierci lub ostatniego kontaktu, gdy pacjent żywy - OS	Stan pacjenta - zmarły (1) lub żywy (0)
1	C3N-00300	Nie	12-lip-16	Brak wznowy	63	pT2	Zywy	pN0	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	2162	0	2162	0
2	C3N-00498	Tak	21-lip-16	Brak wznowy	63	pT2	Zywy	pN1	M0	G2	Dno jamy ustnej	Nie	2153	0	2153	0
3	C3N-00300	Nie	30-sie-16	Brak wznowy	64	pT3	Zywy	pN0	M0	G1	Gardło	RT	2113	0	2113	0
4	C3N-00822	Tak	13-wrz-16	Brak wznowy	59	pT3	Zywy	pN0	M0	G2	Krtan	Nie	2099	0	2099	0
5	C3N-01340	Tak	12-sty-17	Brak wznowy	73	pT4a	11-lis-2020	pN0	M0	G2	Krtan	Nie	1978	0	1399	1
6	C3N-01757	Tak	27-mar-17	Brak wznowy	65	pT2	Zywy	pN0	M0	G2	Krtan	Nie	1904	0	1904	0
7	C3N-01941	Nie	18-kwi-17	Brak wznowy	70	pT4a	Zywy	pN2c	M0	G1	Krtan	RT/CT	1882	0	1882	0
8	C3N-02275	Tak	06-cze-17	Brak wznowy	70	pT4	14-lis-2022	pN0	M0	G2	Krtan	Nie	1833	0	1774	1
9	C3N-02276	Nie	08-cze-17	Brak wznowy	64	pT3	Zywy	pN1	M0	G2	Język	RT	1831	0	1831	0
10	C3N-02278	Nie	20-cze-17	Brak wznowy	65	pT2	Zywy	pN0	M0	G3	Krtan	RT	1819	0	1819	0
11	C3N-03015	Tak	10-mar-17	Brak wznowy	61	pT4a	Zywy	pN2b	M0	G2/G3	Język	RT	1921	0	1921	0
12	C3N-03028	Tak	07-lis-17	Brak wznowy	60	pT2	Zywy	pN2b	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	1679	0	1679	0
13	C3N-03456	Tak	12-gru-17	Brak wznowy	64	pT4	Zywy	pN0	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	1644	0	1644	0
14	C3N-03012	Tak	26-wrz-17	Brak wznowy	72	pT4a	21-maj-2021	pN0	M0	G2	Krtan	RT/CT	1721	0	1333	1
15	C3N-03014	Nie	29-wrz-17	Brak wznowy	61	pT4a	Zywy	pN0	M0	G2	Krtan	RT	1718	0	1718	0
16	C3N-03435	Nie	17-sty-18	Brak wznowy	52	pT4a	16-wrz-2020	pN2c	M0	G2	Krtan	Nie	1608	0	973	1
17	IMO-AA0521	Nie	20-lip-17	Brak wznowy	61	pT3	30-maj-2021	pN0	M0	G2	Krtan	RT	1789	0	1410	1
18	C3N-04546	Tak	27-lip-16	Brak wznowy	43	pT3	Zywy	pN0	M0	G2	Krtan	RT/CT	1782	0	1782	0
19	C3N-04689	Nie	22-paz-18	Brak wznowy	43	pT2	Zywy	pN1	M0	G2	Język, migdałek	RT	1330	0	1330	0
20	C3N-04690	Nie	05-lis-18	Brak wznowy	54	pT2	31-paz-2021	pN0	M0	G1	Dno jamy ustnej	RT/CT	1316	0	1091	1
21	C3N-04697	Nie	13-lis-18	Brak wznowy	45	pT3	Zywy	pN3b	M0	G3	Krtan	RT/CT	1308	0	1308	0
22	C3N-04708	Nie	17-gru-18	Brak wznowy	52	pT3	Zywy	pN0	M0	G1	Krtan	RT/CT	1274	0	1274	0
23	C3N-05096	Nie	19-gru-18	Brak wznowy	68	pT2	Zywy	pN2b	M0	G3	Krtan	RT	1272	0	1272	0
24	C3N-04722	Nie	03-kwi-18	Brak wznowy	64	pT2	Zywy	pN0	M0	G2	Migdałek	RT	1532	0	1532	0
25	C3N-04274	Nie	10-kwi-18	Brak wznowy	50	pT2	Zywy	pN0	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	1525	0	1525	0
26	C3N-04275	Tak	17-kwi-18	Brak wznowy	62	pT2	Zywy	pN0	M0	G1	Krtan	Nie	1518	0	1518	0
27	C3N-04280	Tak	29-maj-18	Brak wznowy	66	pT2	Zywy	pN0	M0	G1	Krtan	Nie	1476	0	1476	0
28	C3N-03785	Tak	22-mar-16	Brak wznowy	67	pT1	21-maj-2021	pN0	M0	G2	Język	Nie	1544	0	1156	1
29	C3N-01756	Tak	21-mar-17	Brak wznowy	63	pT3	Zywy	pN2c	M0	G2	Krtan	RT	1910	0	1910	0
30	C3N-03458	Tak	11-sty-18	Brak wznowy	71	pT2	Zywy	pN0	M0	G1	Dno jamy ustnej	RT	1614	0	1614	0
31	C3N-03007	Tak	14-lip-16	01-sty-17	70	pT4a	22-kwi-2017	pN0	M0	G2/G3	Krtan	Nie	171	1	282	1
32	C3N-00829	Tak	16-sie-16	01-lis-17	53	pT2	9-kwi-2019	pN2b	M0	G2	Język	RT/CT	442	1	966	1
33	C3N-00821	Nie	09-sie-16	01-wrz-17	68	pT2	12-sty-2018	pN2c	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	388	1	622	1
34	C3N-00668	Nie	23-sie-16	01-wrz-17	34	pT1	Zywy	pN0	M0	G2	Język	Brachyterapia	374	1	2120	0
35	C3N-00871	Tak	29-lis-16	01-paz-17	58	pT3	17-sty-2018	pN2b	M0	G2	Język, dno jamy ustnej	RT/CT	306	1	414	1
36	C3N-01339	Tak	13-sty-17	01-mar-17	69	pT4	1-wrz-2017	pN1	M0	G3	Krtan	RT/CT	47	1	231	1
37	C3N-01445	Tak	24-sty-17	01-mar-18	72	pT3	7-wrz-2018	pN0	M0	G2	Krtan	RT	401	1	591	1
38	C3N-01338	Tak	27-sty-17	01-lip-18	50	pT2	9-paz-2018	pN1	M0	G2	Krtan	RT/CT	520	1	620	1
39	C3N-01943	Tak	19-kwi-17	01-cze-19	63	pT4a	19-sie-2019	pN3a	M0	G2	Krtan	RT/CT	773	1	852	1
40	C3N-01948	Tak	25-kwi-17	01-mar-18	56	pT4a	26-lip-2018	pN2b	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	371	1	457	1
41	C3N-03433	Tak	23-lis-17	01-lis-19	76	pT2	14-lip-2020	pN0	M0	G2	Język, dno jamy ustnej	Nie	708	1	964	1
42	C3N-03459	Nie	16-sty-18	01-wrz-18	44	pT3	27-sty-2019	pN1	M0	G2	Skowłoka podczka	RT	228	1	376	1
43	C3N-03008	Tak	05-wrz-17	01-sty-18	65	pT4a	24-lut-2018	pN2c	M0	G2	Język, dno jamy ustnej	NA	118	1	172	1
44	C3N-03011	Tak	08-wrz-17	01-lis-18	62	pT2	29-kwi-2019	pN2b	M0	G3	Krtan	RT	419	1	598	1
45	C3N-01858	Tak	28-cze-17	01-sty-18	63	pT3	12-lut-2018	pN3b	M0	G2	Krtan	RT/CT	187	1	229	1
46	C3N-03098	Nie	10-sty-19	01-lip-20	64	pT4	17-sie-2020	pN0	M0	G1	Krtan	Nie	538	1	585	1
47	C3N-01448	Tak	16-sty-18	01-cze-19	72	pT3	19-gru-2019	pN0	M0	Gx	Krtan	Nie	442	1	582	1
48	C3N-01944	Tak	23-maj-17	01-sty-18	66	pT4a	12-sie-2018	pN1	M0	G3	Język, dno jamy ustnej	RT	223	1	446	1
49	C3N-05081	Nie	15-lip-19	01-maj-20	64	pT2	4-wrz-2020	pN1	M0	G2	Język, dno jamy ustnej	RT	291	1	417	1
50	C3N-05084	Nie	18-lip-19	01-wrz-20	71	pT4a	18-gru-2020	pN2a	M0	G2	Krtan	RT/CT	411	1	519	1
51	C3N-05089	Nie	25-lip-19	01-lut-20	69	pT4a	6-maj-2020	pN2b	M0	G2/G3	Krtan	RT	191	1	286	1
52	C3N-05937	Nie	26-sie-19	01-lip-20	71	pT4a	27-lis-2020	pN2a	M0	G3	Krtan	RT/CT	310	1	459	1
53	C3N-03773	Nie	30-sty-18	01-sie-18	56	pT4a	20-paz-2019	pN0	M0	G2	Dno jamy ustnej	RT	183	1	628	1
54	C3N-04271	Nie	02-lip-18	01-gru-18	74	pT3	16-sie-2019	pN0	M0	G2	Krtan	RT	152	1	410	1
55	C3N-05061	Nie	24-sie-18	01-lip-19	69	pT1b	31-mar-2020	pN2c	M0	G2	Krtan	RT	311	1	585	1
56	C3N-05062	Nie	27-sie-18	01-sty-20	65	pT4a	28-mar-2020	pN0	M0	Gx	Saczkę	RT	492	1	579	1
57	C3N-05919	Nie	11-mar-19	01-sty-20	49	pT2	27-paz-2020	pN3b	M0	G2	Saczkę	RT	296	1	596	1
58	C3N-05941	Nie	27-maj-19	01-sty-20	62	pT3	17-kwi-2020	pN0	M0	G2	Język, dno jamy ustnej	RT	219	1	326	1
59	C3N-01336	Nie	31-sty-17	01-mar-17	60	pT4a	23-wrz-2017	pN2b	M0	G2	Krtan	RT	90	1	235	1
60	C3N-03783	Tak	27-lut-18	01-mar-20	67	pT2	8-paz-2020	pN2b	M0	G1	Dno jamy ustnej	RT	733	1	954	1

3.17 Immunohistochemia

W celu walidacji zidentyfikowanych markerów białkowych związanych z macierzystością, przeprowadzono analizę immunohistochemiczną (IHC) z użyciem specyficznych przeciwciał. Walidacja IHC została wykonana z wykorzystaniem bloczków FFPE pochodzących od pacjentów CCRCC i HNSCC, którzy przeszli operację guza pierwotnego w dwóch szpitalach w Polsce, Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. Józefa Strusia w Poznaniu (CCRCC) i Szpitalu Klinicznym im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (HNSCC).

IHC przeprowadzono przy użyciu 4-mikronowych skrawków tkankowych pozyskanych z bloczków FFPE. Każda tura IHC została wykonana przy użyciu automatycznej barwiarki Dako Autostainer Link 48 z zaprogramowanymi uprzednio protokołami barwienia i zestawem wizualizacyjnym Dako EnVision. Do barwienia immunohistochemicznego preparatów należących do kohorty walidacyjnej CCRCC zastosowano następujące przeciwciała: anti-HATR1 (ThermoFisher, poliklonalne, 1:200), anti-SLC27A2 (Atlas Antibodies, poliklonalne, 1:500), anti-SNRNP200 (Atlas

Antibodies, poliklonalne, 1:225), anti-UCHL1 (Atlas Antibodies, poliklonalne, 1:3000) i anti-UHRF1 (Atlas Antibodies, poliklonalne, 1:2000). Natomiast w kohorcie walidacyjnej HNSCC, IHC przeprowadzono używając przeciwciał anti-REX1 (ThermoFisher, poliklonalne, 1:400) i anti-SOX2 (Atlas Antibodies, poliklonalne, 1:300). Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych, które posłużyły do analizy IHC została uwzględniona w tabeli 3.3. Oddzielnie dla każdego z przeciwciał przygotowano odpowiednie kontrole pozytywne i negatywne, umożliwiające optymalizację warunków analizy IHC. Gotowe preparaty IHC następnie skanowano cyfrowo za pomocą automatycznego skanera ScanScope AT Turbo (Aperio/Leica Microsystems, Vista, CA) w 40-krotnym powiększeniu. Obrazy cyfrowe preparatów IHC były zapisywane jako pliki .svs rekomendowane dla oprogramowania do przeglądania slajdów histopatologicznych i immunohistochemicznych w wysokiej jakości - ImageScope (Aperio, Vista, CA). Dostęp do obrazów cyfrowych zapewniono za pośrednictwem serwera Synology Rack Station (RS18017xs+) chronionego hasłem.

Tabela 3.3. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych do analizy IHC

Przeciwciało	Rozcieńczenie	Producent	Identyfikator
Królicze poliklonalne anty-HEATR1	1:200	Thermo Fisher Scientific	Cat# bs-15438R, RRID:AB_2934056
Królicze poliklonalne anty-UCHL1	1:3000	Atlas Antibodies	Cat# HPA005993, RRID:AB_1858560
Królicze poliklonalne anty-UHRF1	1:2000	Atlas Antibodies	Cat# HPA049408, RRID:AB_2756317
Królicze poliklonalne anty-SNRNP200	1:225	Atlas Antibodies	Cat# HPA029321, RRID:AB_10604096
Królicze poliklonalne anty-SLC27A2	1:500	Atlas Antibodies	Cat# HPA026089, RRID:AB_1857060
Mysie monoklonalne anty-SOX2 (klon CL4716)	1:300	Atlas Antibodies	Cat# AMAb91307, RRID:AB_2665892
Mysie monoklonalne anty-REX1 (klon 5E11A6)	1:400	Thermo Fisher Scientific	Cat# MA5-38664, RRID:AB_2898576

3.18 Ewaluacja preparatów IHC

Ocena preparatów IHC została przeprowadzona przez dwóch wykwalifikowanych patomorfologów w konsultacji z trzecim patomorfologiem zapewniającym dokonanie niezależnej oceny w przypadku jakichkolwiek rozbieżności. Tabela 3.4. i Tabela 3.5. przedstawiają wartości przyporządkowane poszczególnym preparatom CCRCC i HNSCC (odpowiednio) poddanym analizie IHC z użyciem poszczególnych przeciwciał. Podczas oceny preparatów IHC patomorfolodzy korzystali z metodologii H-score do oceny punktowej IHC. System H-score opiera się na wartości stopnia ekspresji w komórkach guza w procentach (0 - 100%) i pomnożonej przez intensywność ekspresji zaobserwowanej w postaci brązowego precipitatu w przypadku pozytywnej reakcji: 0 (reakcja negatywna), 1+ (niska intensywność ekspresji), 2+ (umiarkowana intensywność ekspresji) i 3+ (wysoka intensywność ekspresji), co daje całkowitą ocenę od 0 do 300 (204).

Tabela 3.4. Ocena patomorfologiczna preparatów CCRCC wykonana według metodologii H-score

Identyfikator	PFS	Przerzut 1 - tak, 0 - nie	HEATR1 H-score	SNRNP200 H-score	SLC27A2 H-score	UCHL1 H-score	UHRF1 H-score
C3N-00305	1920	0	5	0	40	0	25
C3N-00310	1637	0	90	0	190	20	0
C3N-00312	1898	0	15	40	130	0	12
C3N-00313	1888	0	90	50	200	60	0
C3N-00315	1870	0	5	10	190	240	0
C3N-00320	1856	0	120	10	210	0	0
C3N-00437	1644	0	160	30	130	0	13
C3N-00491	112	0	80	10	190	0	5
C3N-00492	1801	0	5	10	150	5	5
C3N-00494	1793	0	90	20	210	0	0
C3N-00832	1778	0	70	20	20	300	0
C3N-00834	1769	0	130	40	230	0	10
C3N-01175	1724	0	5	90	170	70	0
C3N-01178	1716	0	5	20	140	0	30
C3N-01179	1824	0	105	70	220	0	5
C3N-01180	1824	0	10	0	130	0	0
C3N-01361	1819	0	35	0	120	30	15
C3N-01648	1647	0	5	10	100	10	5
C3N-01657	1589	0	80	40	260	30	0
C3N-01905	1567	0	120	20	130	5	0
C3N-02263	1552	0	60	30	100	0	0
C3N-02266	1542	0	100	0	140	35	20
C3N-03018	1428	0	45	110	170	80	6
C3N-03019	1428	0	190	30	120	115	15
C3N-03020	1217	0	110	20	210	0	0
C3N-03021	1420	0	115	20	190	145	0
C3N-00314	15	1	140	110	100	0	0
C3N-00831	38	1	5	10	0	220	10
C3N-01176	14	1	15	80	0	0	0
C3N-01649	9	1	10	50	150	0	0
C3N-01651	362	1	100	10	0	0	
C3N-01654	1220	1	30	90	0	0	0
C3N-01655	862	1	100	50	180	5	0
C3N-01656	545	1	100	40	160	10	0
C3N-02262	144	1	100	140	0	5	8
C3N-02264	14	1	140	40	130	120	25
4585-97/19	1	1	150	120	160	70	80
5207-18/19	659	1	220	70	140	120	30
13164-70/14	192	1	170	70	80	150	10
16184-87/13	127	1	130	50	90	155	10
9100 (10765)	448	1	150	20	50	120	100
13321-27/13	335	1	195	20	90	30	30
8034-43/13	49	1	110	0	20	100	1
2652-59/14	327	1	185	0	60	120	50
11944-50/15	1	1	210	150	30	60	15
6072-76/16	1	1	260	80	50	110	20
6512-21/15	1199	1	200	70	20	65	10
10758-61/15	2093	1	140	80	130	70	10
13980-89/15	681	1	210	90	80	100	5
8947-54/16	51	1	170	80	160	120	20
3086-94/13	662	1	180	90	20	140	30
14119-28/18	174	1	125	90	190	90	20

Tabela 3.5. Ocena patomorfologiczna preparatów HNSCC wykonana według metodologii H-score

Identyfikator	Wznowa 1 - tak, 0 - nie	PFS	SOX2 H- score	REX1 H- score
C3N-00300	0	2162	0	0
C3N-00498	0	2153	270	0
C3N-00830	0	2113	0	0
C3N-00822	0	2099	20	10
C3N-01340	0	1978	5	0
C3N-01757	0	1904	5	0
C3N-01941	0	1882	0	50
C3N-02275	0	1833	0	0
C3N-02276	0	1831	0	70
C3N-02278	0	1819	10	160
C3N-03015	0	1921	0	80
C3N-03028	0	1679	15	130
C3N-03456	0	1644	90	150
C3N-03012	0	1721	15	0
C3N-03014	0	1718	140	10
C3N-03435	0	1608	240	160
IIMO_AA0521	0	1789	0	100
C3N-02693	0	1782	170	160
C3N-04689	0	1330	6	30
C3N-04690	0	1316	15	5
C3N-04697	0	1308	290	120
C3N-04708	0	1274	9	10
C3N-05096	0	1272	0	0
C3N-04272	0	1532	0	40
C3N-04274	0	1525	0	80
C3N-04275	0	1518	5	155
C3N-04280	0	1476	0	70
C3N-03785	0	1544	60	0
C3N-01756	0	1910	70	0
C3N-03458	0	1614	5	20
C3N-00307	1	171	120	100
C3N-00829	1	442	290	0
C3N-00821	1	388	60	10
C3N-00668	1	374	20	80
C3N-00871	1	306	20	110
C3N-01339	1	47	245	0
C3N-01645	1	401	0	100
C3N-01338	1	520	55	15
C3N-01943	1	773	60	50
C3N-01948	1	371	0	50
C3N-03433	1	708	80	40
C3N-03459	1	228	15	0
C3N-03008	1	118	2	125
C3N-03011	1	419	200	0
C3N-01858	1	187	0	110
C3N-05098	1	538	35	200
C3N-04278	1	442	160	105
C3N-01944	1	223	6	190
C3N-05081	1	291	230	0
C3N-05084	1	411	0	30
C3N-05949	1	191	270	10
C3N-05937	1	310	0	15
C3N-03773	1	183	50	0
C3N-04271	1	152	0	0
C3N-05061	1	311	9	15
C3N-05062	1	492	300	10
C3N-05919	1	296	15	0
C3N-05941	1	219	140	145
C3N-01336	1	90	230	100
C3N-03783	1	733	240	110

3.19 Analiza wartości prognostycznej markerów białkowych związanych z macierzystością

W celu ewaluacji związku między poziomem ekspresji białek mierzonym za pomocą IHC a przeżyciem wolnym od progresji (PFS) pacjentów w kohortach walidacyjnych CCRCC i HNSCC, przeprowadzono analizę krzywych przeżycia Kaplana- Meiera. Dla każdego białka walidowanego z wykorzystaniem techniki IHC, uszeregowano wartości H-score uzyskane dla wszystkich próbek w wyniku oceny patomorfologicznej w porządku malejącym, a następnie podzielono próbki i przyporządkowane im wyniki H-score na trzy grupy. Grupa z najwyższymi wartościami H-score ($\frac{1}{3}$ wszystkich próbek) została uznana za grupę 'Wysoka wartość H-score', natomiast grupa z najniższymi wartościami H-score ($\frac{1}{3}$ wszystkich próbek) została przypisana do grupy 'Niska wartość H-score'. Dodatkowo, obliczono współczynnik ryzyka (HR) i podano 95% przedział ufności (95% CI) dla każdej analizy przeżycia wolnego od progresji (PFS) wykonanej dla walidowanych białek związanych z macierzystością przy użyciu nieparametrycznego testu statystycznego log-rank (inaczej testu Coxa-Mantela). Prawdopodobieństwo testowe o wartości $p < 0,05$ uznano za wynik istotny statystycznie. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 9.

3.20 Analiza połączeń leków (ang. *Drug Connectivity Analysis*) dla 7 typów nowotworów

W celu zidentyfikowania związków, które mogą potencjalnie hamować macierzystość nowotworów, jak również ich mechanizmów działania (ang. *Mechanisms of Action*, MoAs) i specyficznych targetów dla zidentyfikowanych związków, przeprowadzono tzw. analizę połączeń leków (ang. *Drug Connectivity Analysis*) przy użyciu narzędzia internetowego - CMap (dostępnego pod tym adresem: <https://clue.io>). CMap (ang. *Connectivity map*, mapa połączeń) jest wielkoskalową kolekcją około 1,3 miliona profili ekspresji genów uzyskanych z linii komórkowych, które były poddane działaniu bioaktywnych małych cząsteczek i modyfikacji genetycznych (tzw. perturbagenów lekowych). Celem rozwoju narzędzia CMap było umożliwienie badań opartych na danych dotyczących repozycjonowania leków i trybu działania leków (205,206). Aby przeprowadzić analizę połączeń leków, do modułu "query" w CMap wgrano listę 100 białek (tzw. *input*), w tym 50 o najbardziej obniżonej regulacji i 50 o najbardziej podwyższonej regulacji, wcześniej zidentyfikowanych jako najbardziej związane z macierzystością (odpowiednio negatywnie i pozytywnie) dla każdego typu guza osobno. Wygenerowany plik wynikowy (tzw. *output*) zawierał listę związków

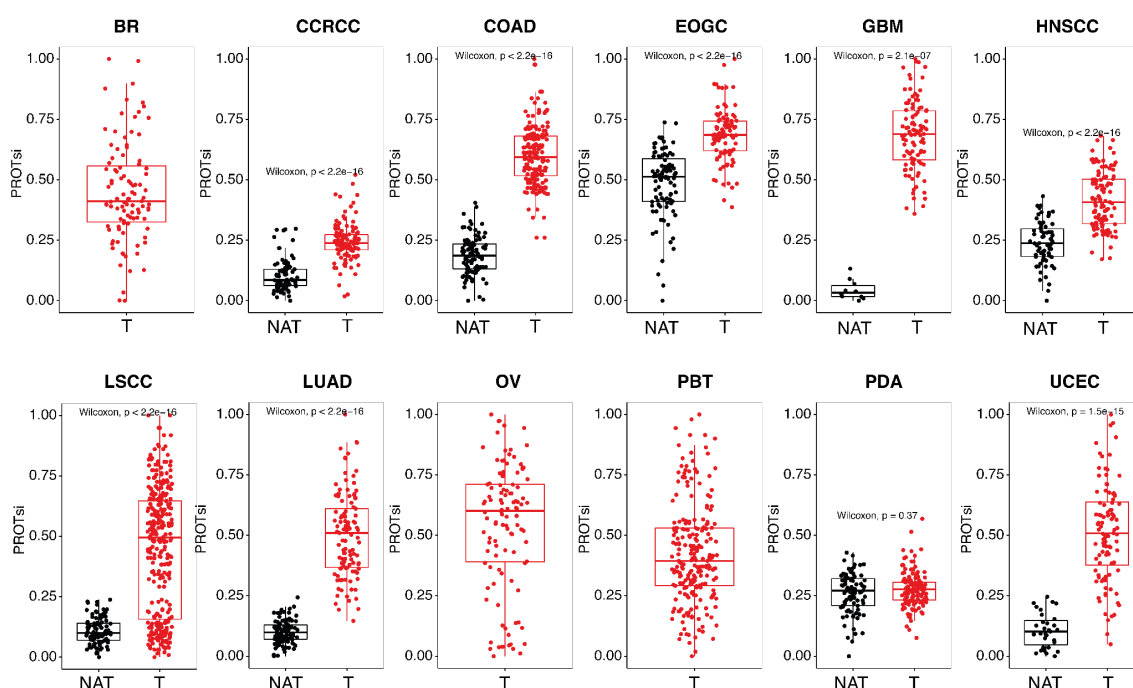
z przyporządkowaną punktacją łączności CS (ang. *Connectivity score, CS*) w zakresie od -100 do 100, reprezentującą funkcjonalne połączenie pomiędzy przesłanymi sygnaturami białek a ekspresją związków zgromadzonych w bazie CMap. Ponieważ ujemne wartości CS wskazują na potencjał terapeutyczny danej cząsteczki, wybrano zestaw związków/cząsteczek kandydujących z wynikami CS poniżej -97. Dla każdego typu nowotworu ograniczono listę związków/cząsteczek kandydujących do 20 związków o najniższych wartościach CS i istotności statystycznej określonej na poziomie $p < 0,05$, uzyskując listę związków/cząsteczek, które mogą represjonować fenotyp macierzystości w analizowanych guzach. Wszystkie zidentyfikowane związki były albo wspólne dla kilku typów nowotworów, albo dotyczyły tylko jednego typu nowotworu. Następnie zbadano specyficzne cele molekularne dla każdego ze zidentyfikowanych związków. Cele te - podobnie jak same inhibitory - były albo wspólne dla kilku inhibitorów, albo specyficzne dla konkretnego związku. Dodatkowo, w oparciu o CMap zaproponowano również mechanizmy działania (MoAs) zidentyfikowanych potencjalnych inhibitorów macierzystości dla analizowanych nowotworów.

Rozdział IV

Wyniki

4.1 Ocena odróżnicowania onkogennego w analizowanych typach nowotworów

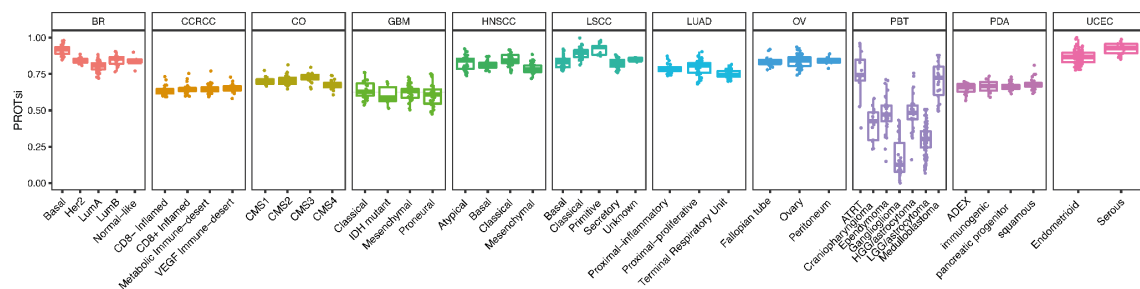
W analizowanym zestawie danych przeprowadzono stratyfikację próbek nowotworowych z 12 typów nowotworów oraz sąsiadujących z nimi próbek tkanek prawidłowych (nieдоступnych dla BR, OV i PBT). Analizy te ilustruje Rycina 4.1. Wykazano, że wartości PROTsi są zdecydowanie wyższe w próbkach nowotworowych w porównaniu z próbkami prawidłowymi, a zatem komórki nowotworowe mają charakter macierzysty, w przeciwieństwie do prawidłowych komórek. Stratyfikacja próbek za pomocą PROTsi pozwoliła również na zaobserwowanie heterogenności w obrębie analizowanych guzów. Dodatkowo, zgodnie z Ryciną 4.1., nie zaobserwowano istotnych różnic między próbkami PDA a sąsiadującymi NAT. Ponadto, wartości PROTsi dla próbek prawidłowych żołądka były niemal dwukrotnie wyższe od wartości PROTsi pozostałych próbek prawidłowych zilustrowanych na rycinie 4.1.



Rycina 4.1. Stratyfikacja próbek nowotworowych (T) i próbek tkanek prawidłowych (NAT) za pomocą PROTsi

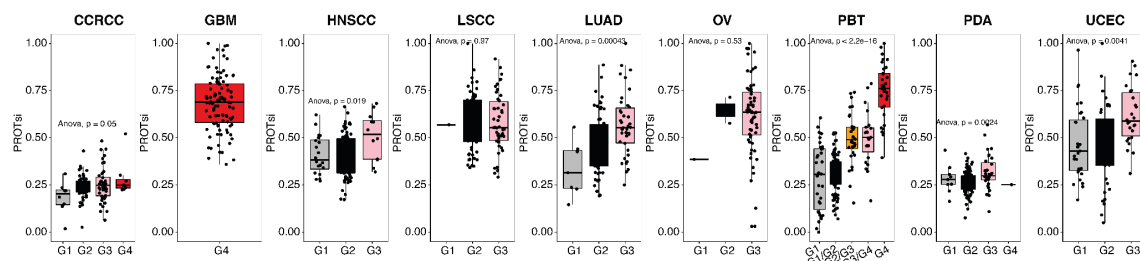
Następnie, dokonano stratyfikacji podtypów molekularnych nowotworów. W wyniku analiz zilustrowanych na Rycinie 4.2. stwierdzono silny związek między PROTsi a znanymi podtypami molekularnymi analizowanych nowotworów. Najwyższe

wartości PROTsi zaobserwowano m.in. w podtypie podstawnokomórkowym (Basal) BR, który wykazuje agresywny fenotyp związany ze stanem odróżnicowanym (207). Z kolei w przypadku stratyfikacji typów histologicznych PBT, najwyższą wartość PROTsi odnotowano dla ATRT, który wywodzi się z komórek embrionalnych i jest jednym z najagresywniejszych nowotworów złośliwych (208).



Rycina 4.2. Stratyfikacja podtypów molekularnych nowotworów oraz typów histologicznych PBT za pomocą PROTsi

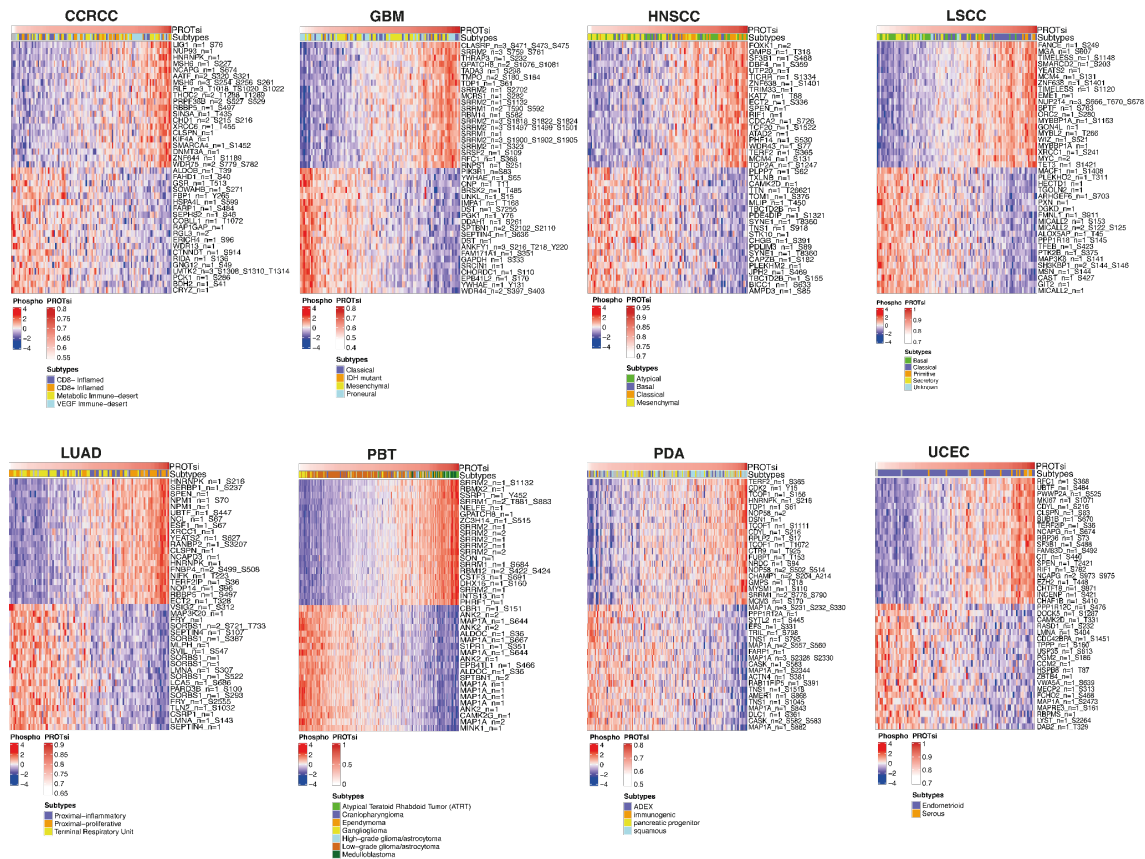
Wartości PROTsi znajdują także odzwierciedlenie w stopniach zaawansowania histologicznego nowotworów (Rycina 4.3.). Zaobserwowano, że w większości przypadków im wyższa wartość PROTsi, tym wyższy stopień zaawansowania histologicznego (ang. *Grade*), a co za tym idzie, szybszy wzrost i rozprzestrzenianie się guza. Z uwagi na fakt, iż klasyfikacja GBM opiera się na stopniu zaawansowania G4, wszystkie próbki w analizowanej kohorcie GBM mają właśnie ten stopień. Niemniej jednak, w obrębie GBM widoczna jest znaczna heterogenność, którą odzwierciedla rozrzut próbek na osi y (PROTsi waha się od 0,4 do 1). Podobny rozrzut zaobserwowano w przypadku PBT.



Rycina 4.3. Stratyfikacja stopnia zaawansowania histologicznego nowotworów przez PROTsi.

4.2 Korelacja PROTsi z modyfikacjami potranslacyjnymi - fosforylacją białek

W celu odkrycia potencjalnych celów dla leków w terapii przeciwnowotworowej, zbadano również związek między macierzystością a modyfikacjami potranslacyjnymi (PTM) w analizowanych typach nowotworów. Analiza korelacji PROTsi i danych o fosforylacji ujawniła fosfoproteiny i ich miejsca fosforylacji, które są najbardziej zaangażowane w procesy związane z macierzystością. Na Rycinie 4.4. przedstawiono mapy ciepłe dla 8 typów nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PBT, PDA i UCEC. Mapy ciepłe prezentują 20 najbardziej fosforylowanych białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością (górną część map ciepłych) i 20 najbardziej fosforylowanych białek negatywnie skorelowanych z macierzystością (dolną część map ciepłych). Każde białko ulegające fosforylacji jest opatrzone adnotacją z powiązаныmi miejscami fosforylacji, przy czym dla niektórych białek zidentyfikowano więcej niż jedno miejsce fosforylacji. Wzory kolorów na mapach ciepłych podkreślają silną korelację między fosforylacją białek a macierzystym charakterem próbek nowotworowych. Ponadto, wysoka wartość PROTsi w próbkach nowotworowych wskazuje na to, że silna fosforylacja białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością i jednocześnie niski poziom fosforylacji białek negatywnie skorelowanych z macierzystością mogą być związane z utrzymywaniem i/lub promowaniem fenotypu macierzystości nowotworów. Co więcej, zidentyfikowane miejsca fosforylacji mogą stanowić potencjalne cele dla interwencji terapeutycznych mających na celu osłabienie cech związanych z macierzystością nowotworów.



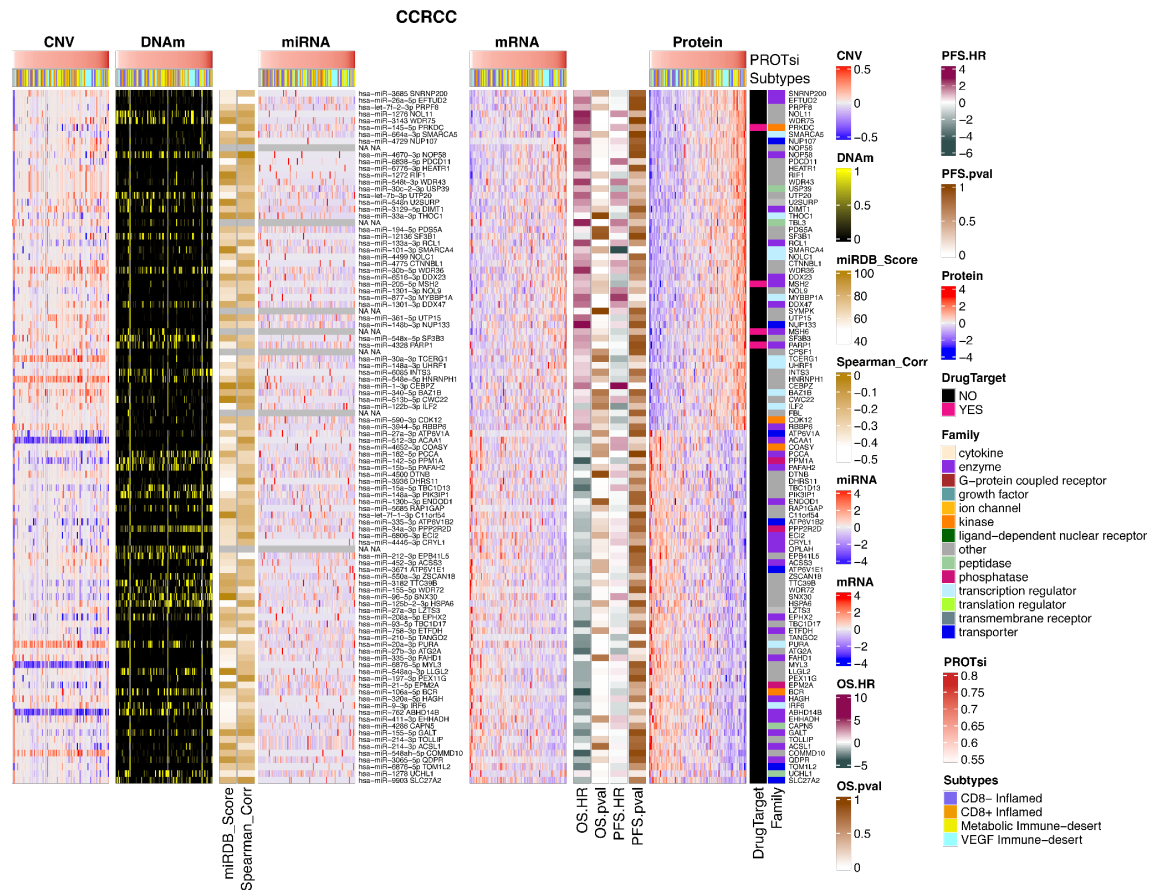
Rycina 4.4. Mapy ciepłe przedstawiające korelację białek z fosforylacją w 8 typach nowotworów

4.3 Identyfikacja białek związanych z macierzystością i ich korelacja z danymi proteogenomicznymi i klinicznymi

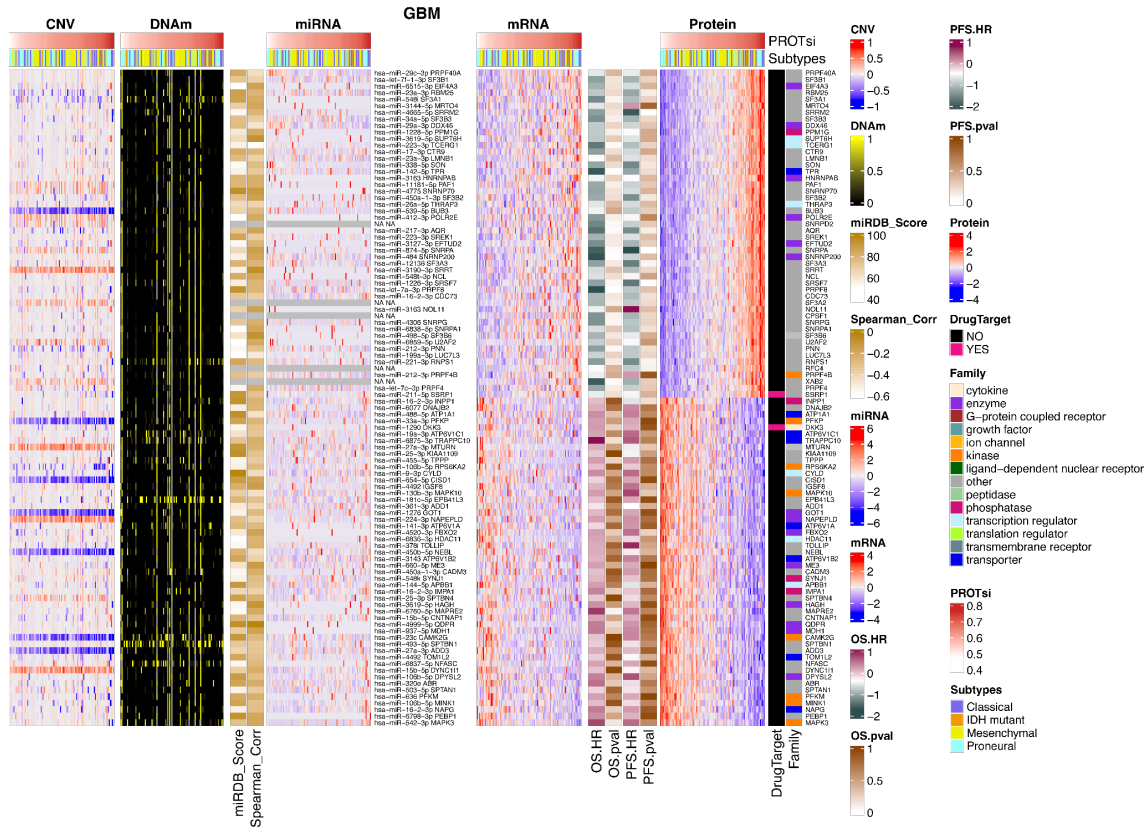
Integracja PROTsi z danymi dotyczącymi zmian liczby kopii (CNV), metylacji DNA, ekspresji mRNA, miRNA i białek doprowadziła do identyfikacji białek zaangażowanych w ścieżki związane z macierzystością, które mają potencjał terapeutyczny oraz umożliwiła odkrycie i zrozumienie nowych aspektów biologii nowotworów. Dla każdego z analizowanych typów nowotworów (dla których kompleksowe dane proteogenomiczne były dostępne) wytypowano 50 białek najbardziej pozytywnie skorelowanych z macierzystością (czyli takich, których wysoka ekspresja korelowała pozytywnie z wysokimi wartościami PROTsi w próbkach nowotworowych) i 50 białek najbardziej negatywnie skorelowanych z macierzystością (takich, których wysoka ekspresja korelowała negatywnie z PROTsi). Zgodnie z przedstawionymi na Rycinach 4.5. - 4.11. mapami cieplnymi, w większości przypadków - zarówno na poziomie próbek w obrębie nowotworu jak i między nowotworami - wysokie wartości PROTsi korelowały z wysoką ekspresją białek i mRNA, a także z niską ekspresją miRNA,

hipometylacją DNA i zwiększoną liczbą kopii (np. poprzez amplifikacje). Oprócz tych zależności, na Rycinach X-Z można jednak zaobserwować również odstępstwa od tego schematu. Biorąc za przykład mapę cieplną przedstawiającą zależność PROTsi i danych proteogenomicznych w HNSCC (Rycina 4.7.), wysokie wartości PROTsi korelowały z wysoką ekspresją białka DHX9, wysoką ekspresją mRNA, zwiększoną CNV i jednocześnie z niską ekspresją miRNA i hipometylacją. Natomiast w przypadku DYSF, wysokie wartości PROTsi korelowały z niską ekspresją tego białka, niską ekspresją mRNA oraz wysoką ekspresją miRNA, zwiększeniem CNV i hipermetylacją. Z kolei w jeszcze innych przypadkach wysokie wartości PROTsi korelowały np. z wysoką ekspresją białka HEATR1 przy jednocześnie zwiększonej ekspresji mRNA, zmniejszonej ekspresji miRNA, zwiększonej CNV i hipermetylacji, a także z wysoką ekspresją białka DDX5 przy jednocześnie zmniejszonej ekspresji mRNA, zwiększonej ekspresji miRNA, zwiększonej CNV i hipometylacji oraz ze zmniejszoną ekspresją białka TBC1D17 wraz ze zwiększoną ekspresją mRNA, zmniejszoną ekspresją miRNA, zwiększoną CNV i hipometylacją czy też ze zwiększoną ekspresją białka UTP15 przy jednocześnie zwiększonej ekspresji mRNA, zmniejszonej CNV, hipometylacji i bez związku z ekspresją miRNA. Na mapach cieplnych przedstawiono także związki PROTsi z danymi klinicznymi pacjentów (OS, PFS) w badanych kohortach w postaci współczynnika ryzyka (HR) wraz z istotnością statystyczną w celu wskazania białek o wartości prognostycznej. Dodatkowo, do konkretnych białek przypisano odpowiednie rodziny funkcjonalne ("Family"), do których białka te należą. Wyróżniono następujące rodziny białek: cytokiny, enzymy, receptory sprzężone z białkiem G, czynniki wzrostu, kanał jonowe, kinazy, receptory jądrowe zależne od ligandu, peptydazy, fosfatazy, regulatory transkrypcji, regulatory translacji, receptory transmembranowe i transportery. Sprawdzono także, czy białka te stanowią aktualne cele lekowe ("DrugTarget") wykorzystywane w klinice. Jak wynika z map cieplnych, większość białek związanych z macierzystością nie jest aktualnie wykorzystywanych w terapiach, zatem białka te stanowią cenny zbiór potencjalnych celów lekowych.

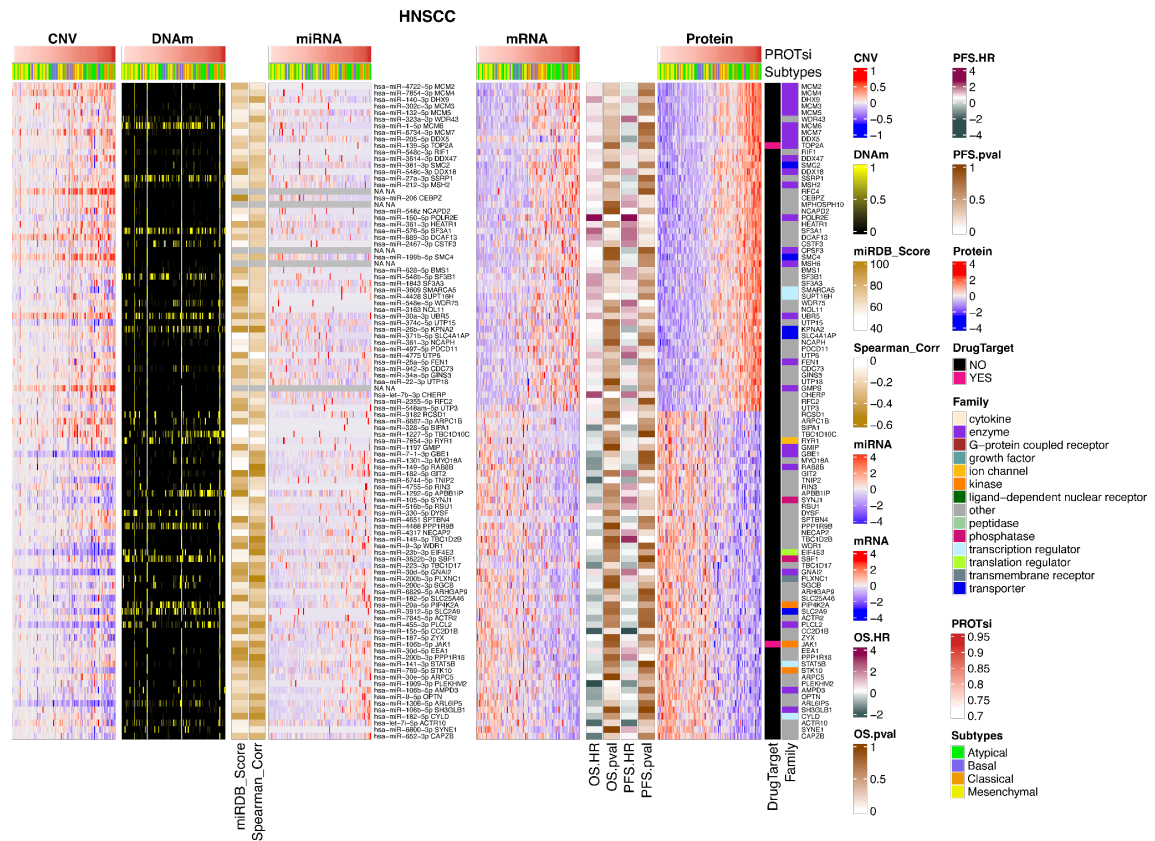
Podsumowując, kompleksowe analizy przedstawione na Rycinach 4.5. - 4.11. ukazują związek między macierzystością nowotworów a różnymi czynnikami molekularnymi, rzucając światło na potencjalne mechanizmy regulacyjne i ścieżki sygnałowe oraz identyfikując potencjalne biomarkery lub cele terapeutyczne dla pacjentów z analizowanymi nowotworami.



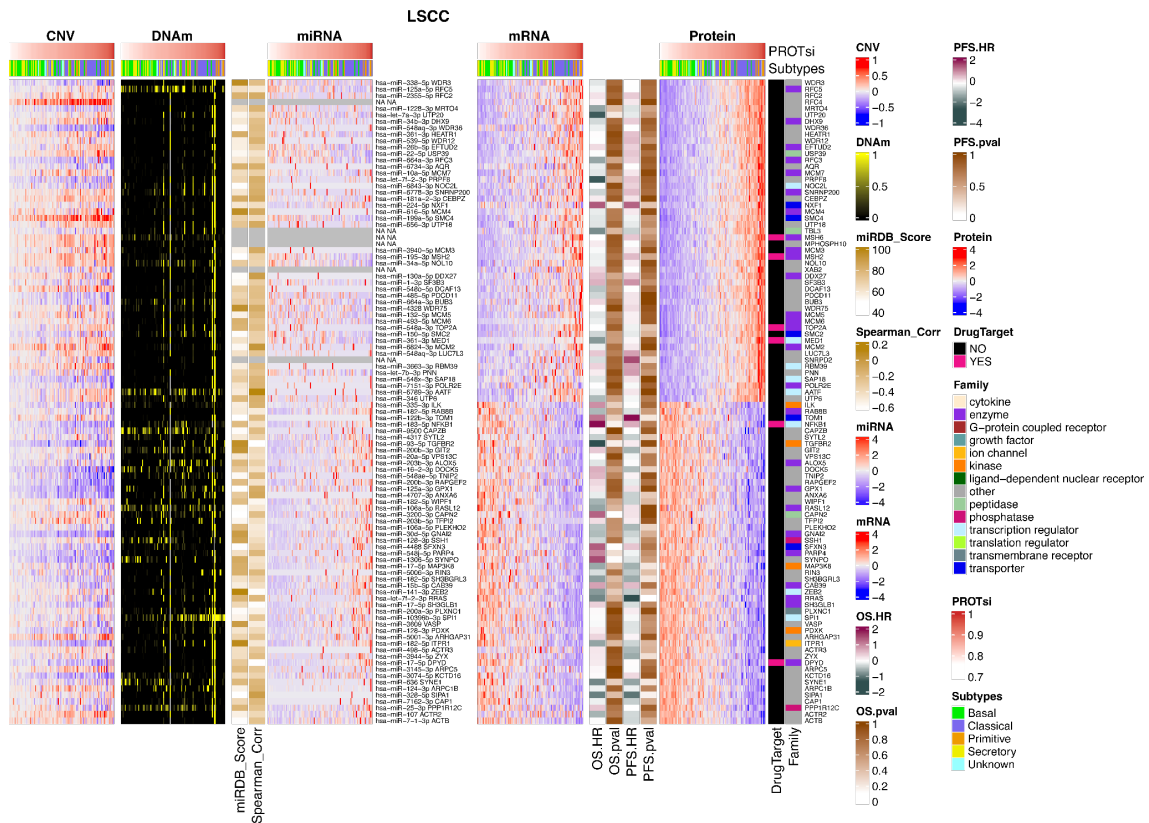
Rycina 4.5. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów CCRCC



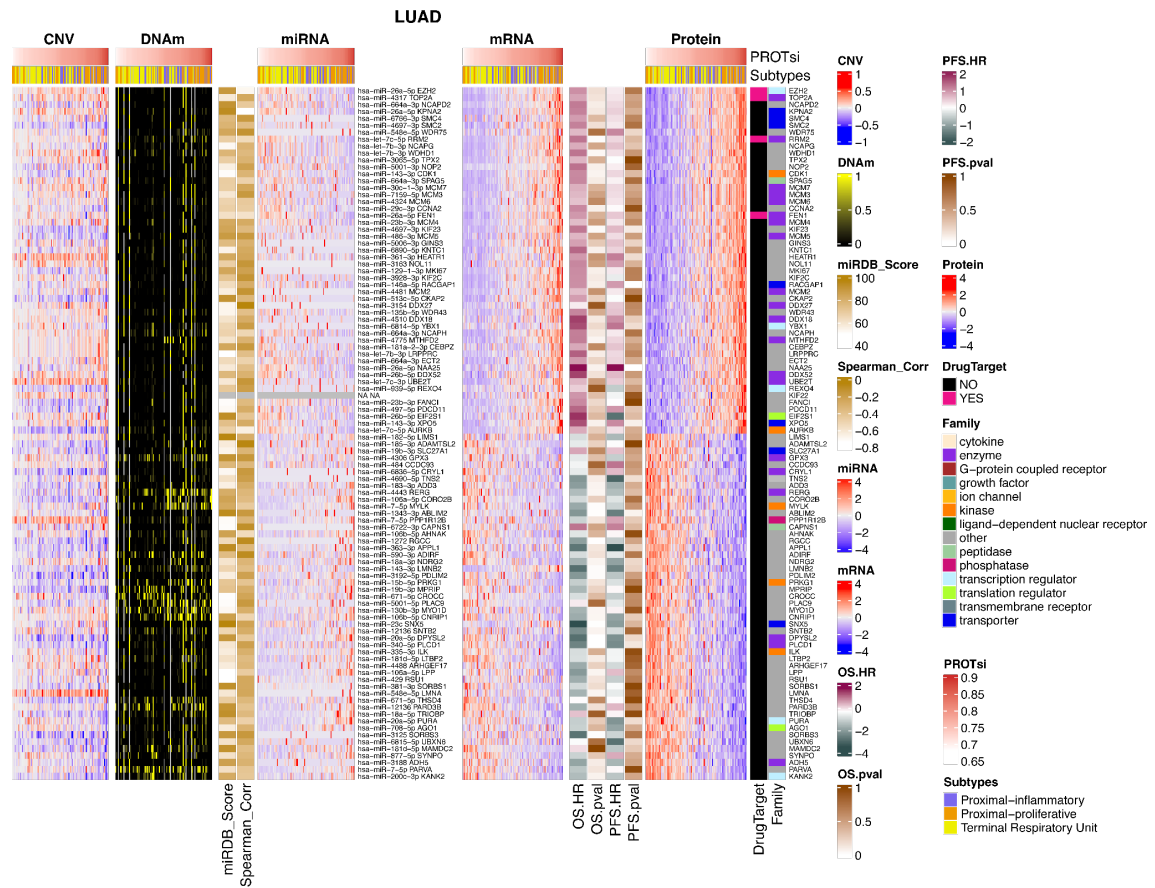
Rycina 4.6. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów GBM



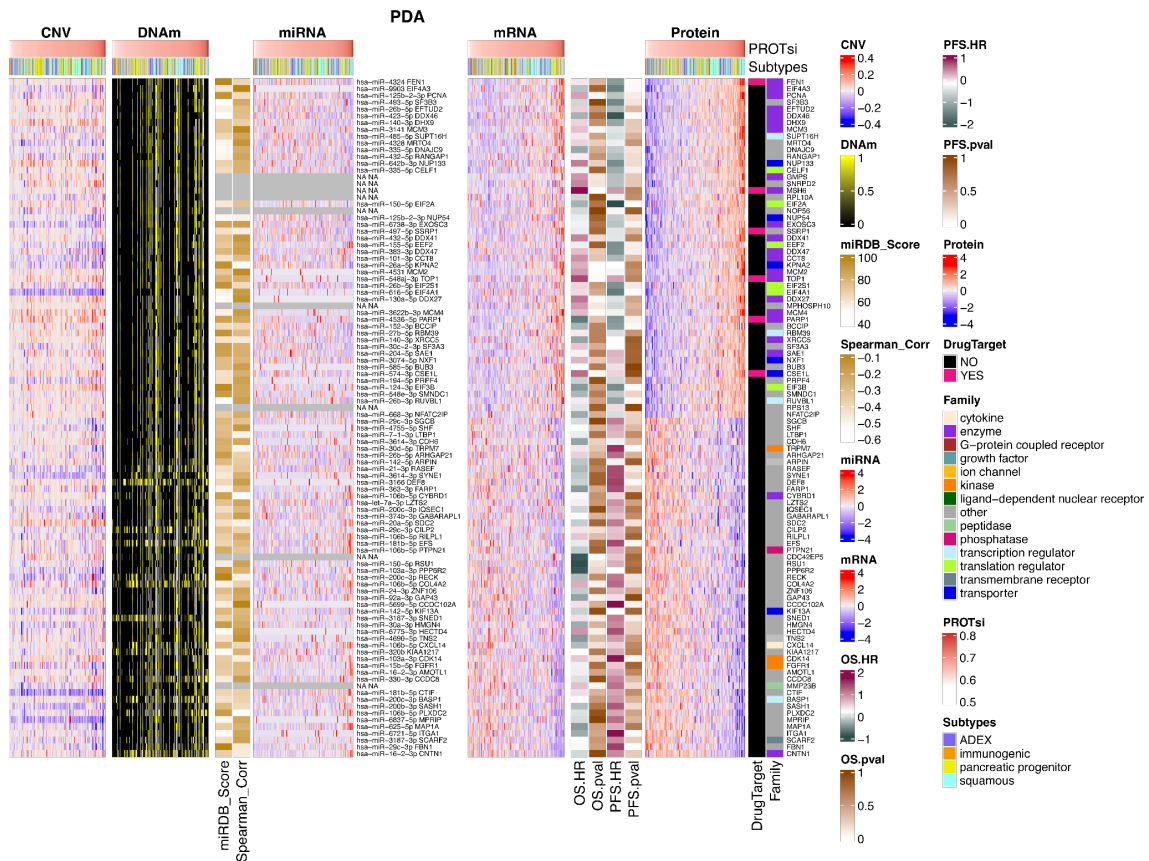
Rycina 4.7. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów HNSCC



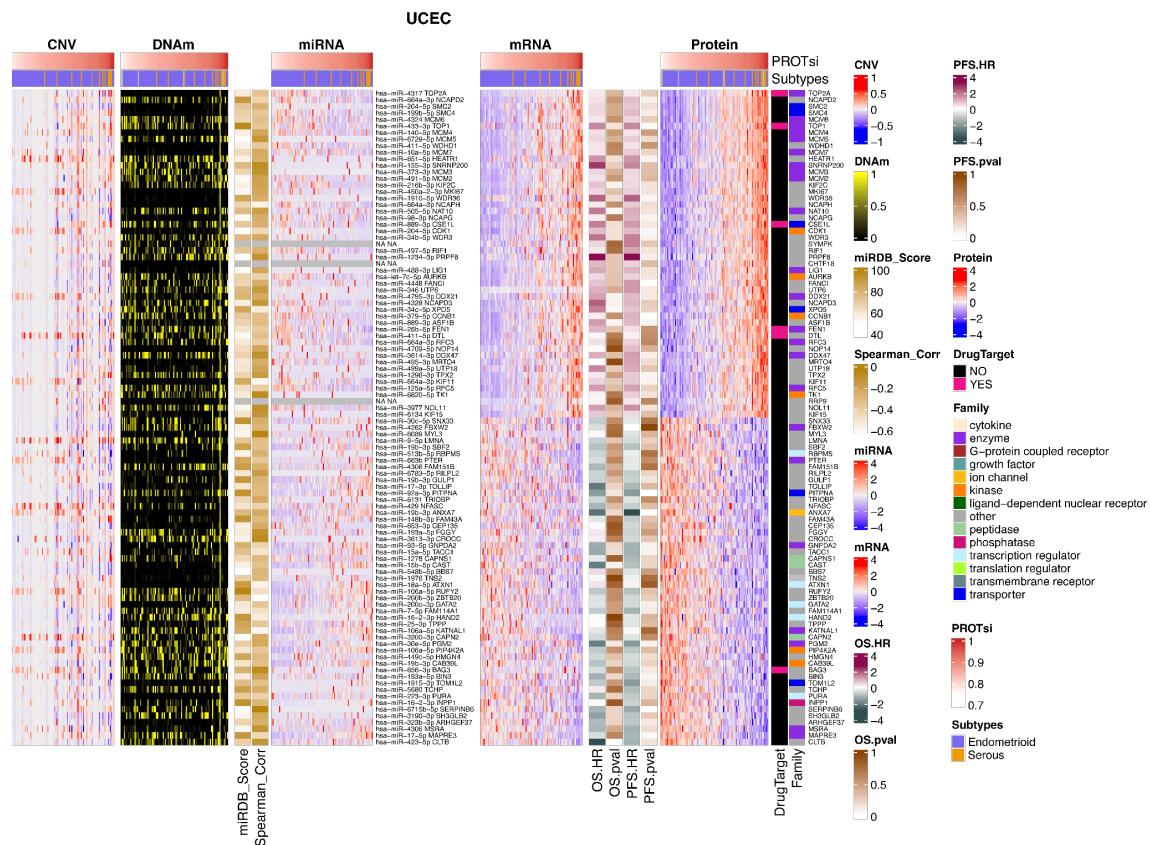
Rycina 4.8. Białka związane z macierzyością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów LSCC



Rycina 4.9. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów LUAD



Rycina 4.10. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów PDA

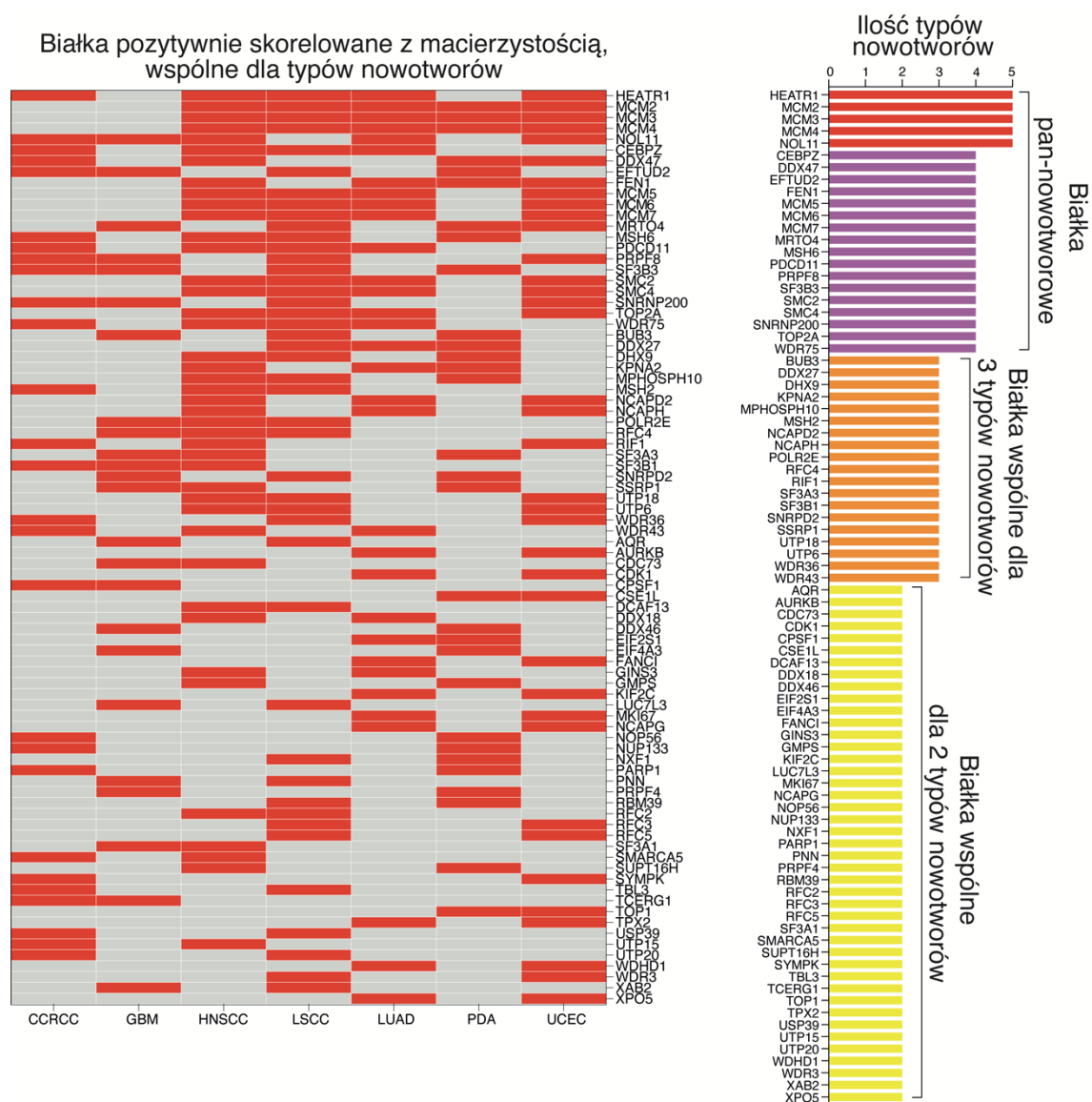


Rycina 4.11. Białka związane z macierzystością i ich korelacja z CNV, metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek oraz danymi klinicznymi pacjentów UCEC

4.4 Kategoryzacja zidentyfikowanych białek związanych z macierzystością

Przeprowadzona kategoryzacja uprzednio zidentyfikowanych białek najbardziej związanych z macierzystością w następujących typach nowotworów: CCRCC, HNSCC, GBM, LSCC, LUAD, PDA i UCEC umożliwiła wyróżnienie białek, które są zaangażowane w mechanizmy odróżnicowania onkogenego w kilku typach nowotworów oraz takie, których kluczowa rola w macierzystości analizowanych nowotworów została wskazana wyłącznie z jednym z analizowanych nowotworów. Na Rycinie 4.12. po lewej przedstawiono białka, których ekspresja pozytywnie koreluje z fenotypem macierzystym nowotworów, i które powtarzają się wśród analizowanych typów guzów, natomiast po prawej zilustrowano podział tych białek według wyróżnionych kategorii. Spośród 350 białek oznaczonych jako najbardziej pozytywnie skorelowane z macierzystością, wyodrębniono kategorię białek pan-nowotworowych, czyli takich białek, które zostały zidentyfikowane w co najmniej 4 typach nowotworów. W wyniku przeprowadzonych analiz, do białek pan-nowotworowych zaliczono następujące białka: HEATR1, NOL11, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 i MCM7, CEBPZ, DDX47, EFTUD2, FEN1,

MRTO4, MSH6, PDCD11, PRPF8, SF3B3, SMC2, SMC4, SNRNP200, TOP2 i WDR75. Co ciekawe, charakterystyczne dla proliferacji komórkowej białka z rodziny MCM (ang. *Minichromosome maintenance proteins*) (209) nie tylko nie zostały zidentyfikowane jako najbardziej związane z macierzystością we wszystkich analizowanych guzach, ale także zaobserwowano, że część z nich (MCM2, MCM3 i MCM4) wykazuje korelację z macierzystością w HNSCC, LSCC, LUAD, PDA i UCEC, natomiast część (MCM5, MCM6 i MCM7) w HNSCC, LSCC, LUAD i UCEC, ale nie w PDA. Oprócz kategorii białek pan-nowotworowych, wyróżniono także kategorię białek wspólnych dla trzech typów nowotworów oraz najliczniejszą kategorię białek wspólnych dla dwóch typów nowotworowych.



Rycina 4.12. Kategoryzacja zidentyfikowanych białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością, wspólnych dla analizowanych typów nowotworów

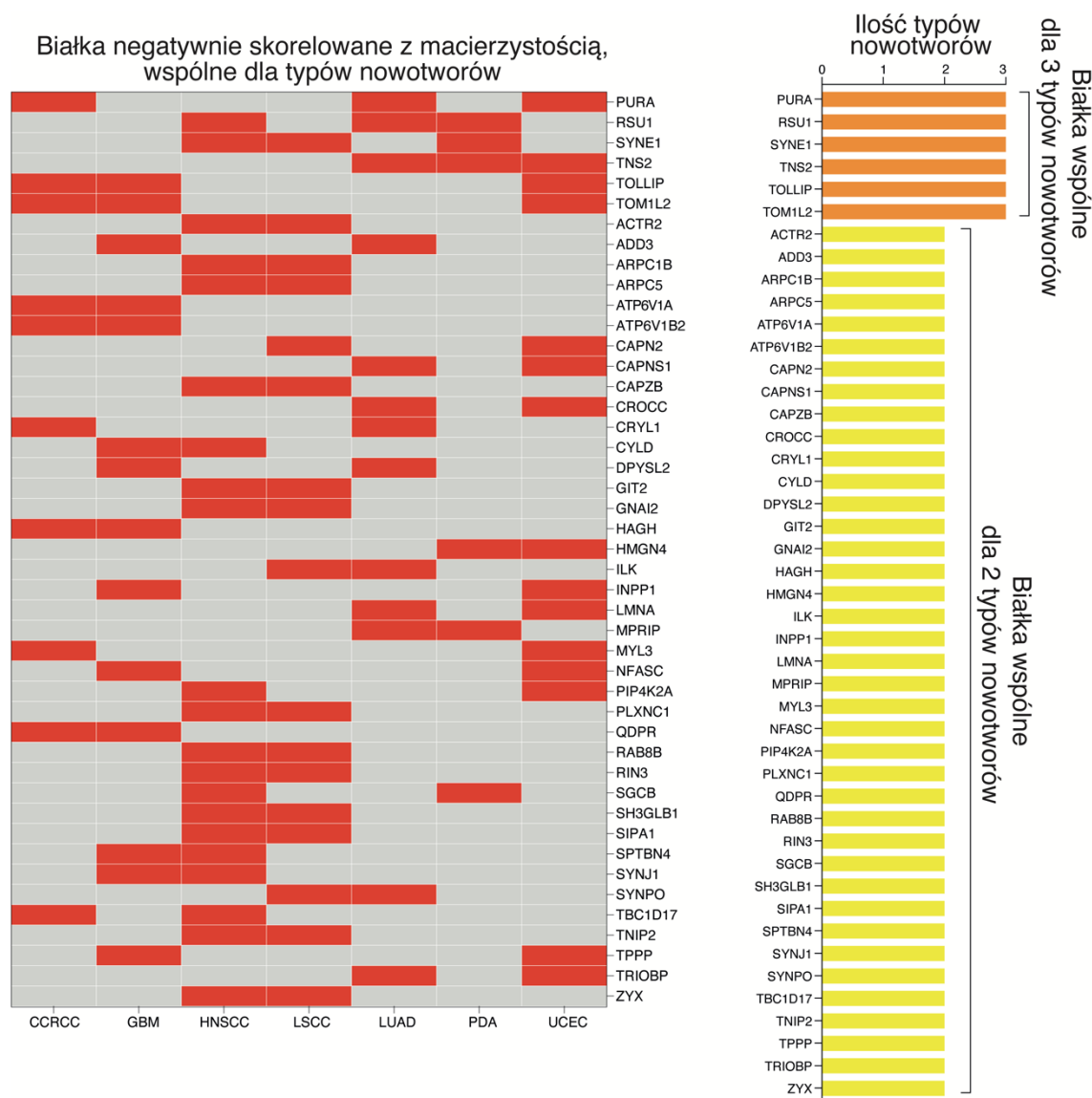
Ponadto, wśród białek najbardziej pozytywnie skorelowanych z macierzystością wyodrębniono białka, które zidentyfikowano wyłącznie w jednym z analizowanych typów guzów, a zatem białka, które są specyficzne dla poszczególnych typów nowotworów. Białka te zebrano w Tabeli 4.1. poniżej.

Tabela 4.1. Zidentyfikowane białka pozytywnie skorelowane z macierzystością, specyficzne dla poszczególnych typów nowotworów.

CCRCC	GBM	HNSCC	LSCC	LUAD	PDA	UCEC
BAZ1B	CTR9	BMS1	AATF	CCNA2	BCCIP	ASF1B
CDK12	HNRNPAB	CHERP	MED1	CKAP2	CCT8	CCNB1
CTNBL1	LMNB1	CPSF3	NOC2L	DDX52	CELF1	CHTF18
CWC22	NCL	CSTF3	NOL10	ECT2	DDX41	DDX21
DDX23	PAF1	DDX5	SAP18	EZH2	DNAJC9	DTL
DIMT1	PPM1G	SLC4A1AP	WDR12	KIF22	EEF2	KIF11
FBL	PRPF40A	UBR5		KIF23	EIF2A	KIF15
HNRNPH1	PRPF4B	UTP3		KNTC1	EIF3B	LIG1
ILF2	RBM25			LRPPRC	EIF4A1	NAT10
INTS3	RNPS1			MTHFD2	EXOSC3	NCAPD3
MYBBP1A	SF3A2			NAA25	NFATC2IP	NOP14
NOL9	SF3B2			NOP2	NUP54	RRP9
NOLC1	SF3B6			RACGAP1	PCNA	TK1
NOP58	SNRNP70			REXO4	RANGAP1	
NUP107	SNRPA			RRM2	RPL10A	
PDS5A	SNRPA1			SPAG5	RPS13	
PRKDC	SNRPG			UBE2T	RUVBL1	
RBBP6	SON			YBX1	SAE1	
RCL1	SREK1				SMNDC1	
SMARCA4	SRRM2				XRCC5	
THOC1	SRRT					
U2SURP	SRSF7					
UHRF1	SUPT6H					
	THRAP3					
	TPR					
	U2AF2					

W podobny sposób przeprowadzono kategoryzację białek wytypowanych jako najbardziej negatywnie skorelowane z macierzystością w analizowanych siedmiu typach nowotworów (Rycina 4.13.). W katalogu białek nie uwzględniono jednak kategorii białek pan-nowotworowych, gdyż największa ilość dzielonych typów nowotworów przez te same białka wynosiła 3. Wyróżniono zatem tylko dwie kategorie: kategorię białek powtarzających się w 3 typach nowotworów i kategorię białek wspólnych dla 2 typów

nowotworów, przy czym - podobnie jak w przypadku białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością - ostatnia kategoria zawierała największą ilość białek.



Rycina 4.13. Kategoryzacja zidentyfikowanych białek negatywnie skorelowanych z macierzystością, wspólnych dla analizowanych typów nowotworów

Mimo licznej kategorii białek negatywnie skorelowanych z macierzystością, powtarzających się w dwóch typach guzów, zdecydowanie największą liczbę białek przyporządkowano kategorii białek specyficznych dla poszczególnych typów nowotworów. Białka te zebrano w Tabeli 4.2. poniżej.

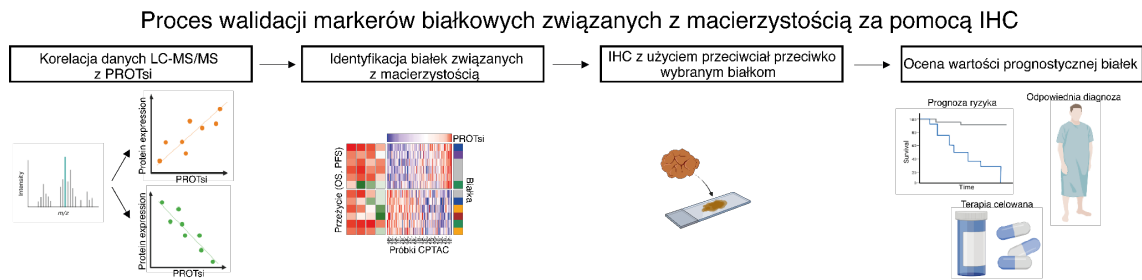
Tabela 4.2. Zidentyfikowane białka negatywnie skorelowane z macierzystością, specyficzne dla poszczególnych typów nowotworów.

CCRCC	GBM	HNSCC	LSCC	LUAD	PDA	UCEC
ABHD14B	ABR	ACTR10	ACTB	ABLIM2	AMOTL1	ANXA7
ACAA1	ADD1	AMPD3	ACTR3	ADAMTSL2	ARHGAP21	ARHGEF37
ACSL1	APBB1	APBB1IP	ALOX5	ADH5	ARPIN	ATXN1
ACSS3	ATP1A1	ARHGAP9	ANXA6	ADIRF	BASP1	BAG3
ATG2A	ATP6V1C1	ARL6IP5	ARHGAP31	AGO1	CCDC102A	BBS7
ATP6V1E1	CADM3	CC2D1B	CAB39	AHNAK	CCDC8	BIN3
BCR	CAMK2G	DYSF	CAP1	APPL1	CDC42EP5	CAB39L
C11orf54	CISD1	EEA1	DOCK5	ARHGEF17	CDH6	CAST
CAPN5	CNTNAP1	EIF4E3	DPYD	CCDC93	CDK14	CEP135
COASY	DKK3	GBE1	GPX1	CNRIP1	CILP2	CLTB
COMMD10	DNAJB2	GMIP	ITPR1	CORO2B	CNTN1	FAM114A1
DHRS11	DYNC111	JAK1	KCTD16	GPX3	COL4A2	FAM151B
DTNB	EPB41L3	MYO18A	MAP3K8	KANK2	CTIF	FAM43A
ECI2	FBXO2	NECAP2	NFKB1	LIMS1	CXCL14	FBXW2
EHHADH	GOT1	OPTN	PARP4	LMNB2	CYBRD1	FGGY
ENDOD1	HDAC11	PLCL2	PDXK	LPP	DEF8	GATA2
EPB41L5	IGSF8	PLEKHM2	PLEKHO2	LTBP2	EFS	GNPDA2
EPHX2	IMPA1	PPP1R18	PPP1R12C	MAMDC2	FARP1	GULP1
EPM2A	KIAA1109	PPP1R9B	RAPGEF2	MYLK	FBN1	HAND2
ETFHDH	MAPK10	RCSD1	RASL12	MYO1D	FGFR1	KATNAL1
FAHD1	MAPK3	RYR1	RRAS	NDRG2	GABARAPL1	MAPRE3
GALT	MAPRE2	SBF1	SFXN3	PARD3B	GAP43	MSRA
HSPA6	MDH1	SLC25A46	SH3BGRL3	PARVA	HECTD4	PGM2
IRF6	ME3	SLC2A9	SPI1	PDLIM2	IQSEC1	PITPNA
LLGL2	MINK1	STAT5B	SSH1	PLAC9	ITGA1	PTER
LZTS3	MTURN	STK10	SYTL2	PLCD1	KIAA1217	RBPMS
OPLAH	NAPEPLD	TBC1D10C	TFPI2	PPP1R12B	KIF13A	RILPL2
PAFAH2	NAPG	TBC1D2B	TGFBR2	PRKG1	LTBP1	RUFY2
PCCA	NEBL	WDR1	TOM1	RERG	LZTS2	SBF2
PEX11G	PEBP1		VASP	RGCC	MAP1A	SERPINB6
PIK3IP1	PFKM		VPS13C	SLC27A1	MMP23B	SH3GLB2
PPM1A	PFKP		WIPF1	SNTB2	PLXDC2	SNX33
PPP2R2D	RPS6KA2		ZEB2	SNX5	PPP6R2	TACC1
RAP1GAP	SPTAN1			SORBS1	PTPN21	TCHP
SLC27A2	SPTBN1			SORBS3	RASEF	ZBTB20
SNX30	TRAPPC10			THSD4	RECK	
TANGO2				UBXN6	RILPL1	
TBC1D13					SASH1	
TTC39B					SCARF2	
WDR72					SDC2	
ZSCAN18					SHF	
					SNED1	
					TRPM7	
					ZNF106	

Analizując listę wszystkich zidentyfikowanych białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością i listę białek o negatywnej korelacji, nie odnaleziono takich białek, które korelują pozytywnie z macierzystością w jednym lub kilku typach guzów i jednocześnie korelują negatywnie w innych typach. Dokonana kategoryzacja białek stanowi swego rodzaju katalog zawierający cele białkowe, które mają potencjał terapeutyczny i mogą zostać wykorzystane w terapiach przeciwnowotworowych. Jak wykazano w tym podrozdziale, identyfikacja białek za pomocą PROTsi nie tylko wskazała białka o zwiększonej i zmniejszonej regulacji zaangażowane w utrzymywanie fenotypu macierzystego, ale także umożliwiła odkrycie celów terapeutycznych specyficznych dla konkretnych typów nowotworów i takich, które mogłyby zostać wykorzystane do leczenia kilku nowotworów tą samą cząsteczką leku.

4.5 Walidacja wyselekcjonowanych markerów białkowych związanych z macierzystością za pomocą immunohistochemii

Korelacja danych białkowych otrzymanych w wyniku analizy tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) ze wskaźnikiem macierzystości PROTsi pozwoliła na identyfikację markerów białkowych związanych z macierzystością, zatem o wysokim potencjale klinicznym. W celu potwierdzenia wartości prognostycznej wyselekcjonowanych markerów białkowych w dwóch przykładowych typach nowotworów - CCRCC i HNSCC, przeprowadzono analizę ekspresji tychże białek za pomocą techniki immunohistochemii (IHC) z wykorzystaniem przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko wybranym białkom. W wyniku ewaluacji patomorfologicznej przygotowanych preparatów immunohistochemicznych otrzymano wartości H-score (0-300) dla każdego preparatu. Wartości H-score były następnie korelowane z danymi klinicznymi pacjentów w kohortach walidacyjnych CCRCC i HNSCC. W wyniku tych korelacji wyznaczono przeżycie wolne od progresji (PFS) oraz wskaźnik ryzyka w zależności od poziomu ekspresji danego przeciwciała dla pacjentów z grup z dobrym rokowaniem (bez przerzutów w przypadku kohorty CCRCC i bez nawrotu choroby w kohorcie HNSCC) i pacjentów z grup ze złym rokowaniem (z przerzutami w kohorcie CCRCC i wznową choroby w kohorcie HNSCC). Proces walidacji markerów białkowych związanych z macierzystością został zilustrowany na Rycinie 4.14.

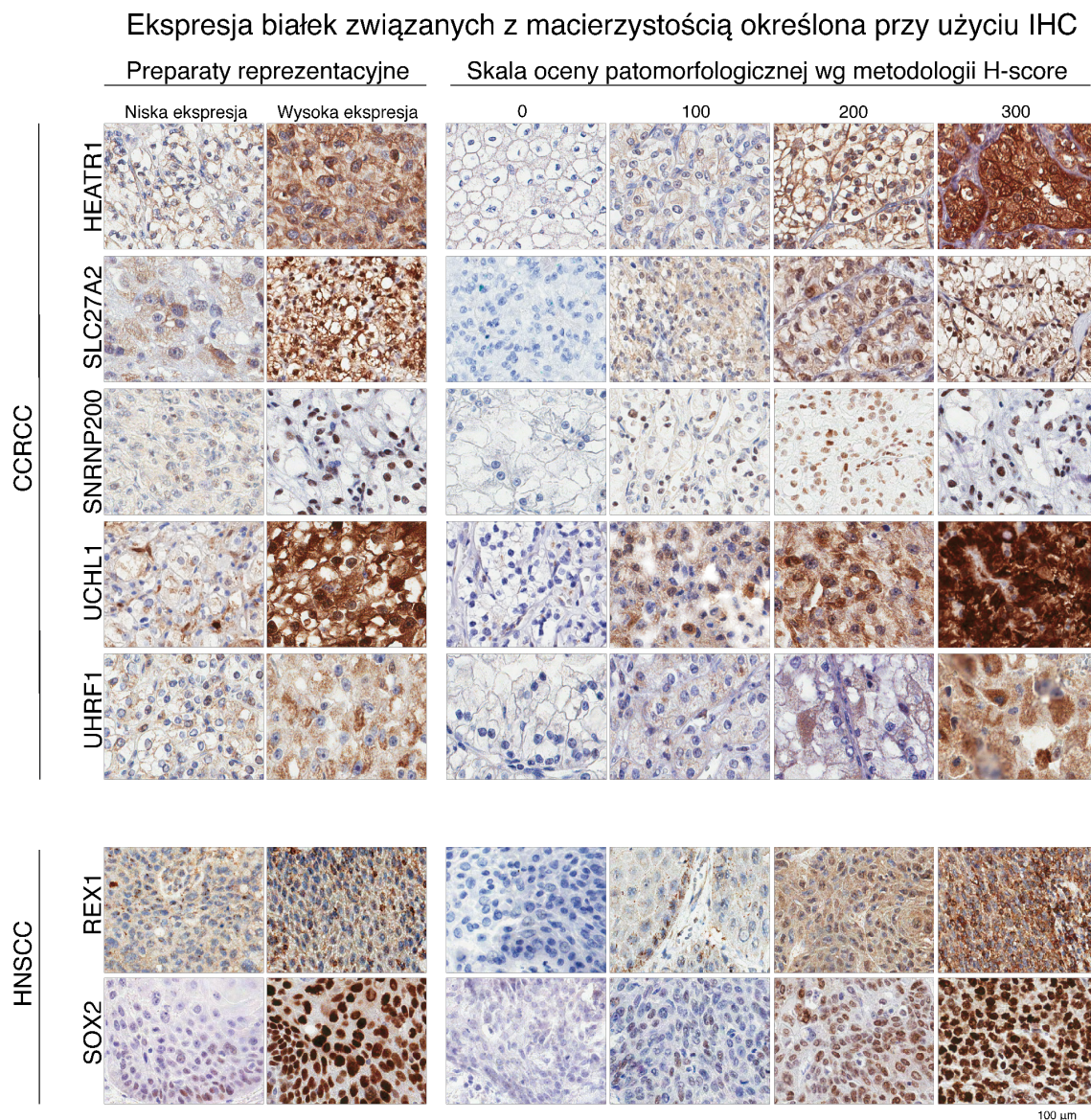


Rycina 4.14. Proces walidacji markerów białkowych związanych z macierzystością za pomocą immunohistochemii (IHC)

Na podstawie wcześniejszych analiz, do walidacji IHC w próbkach CCRCC wybrano 3 białka pozytywnie skorelowane z macierzystością: HEATR1, SNRNP200 i UHRF1, czyli takie, których zwiększona ekspresja związana jest z odróżnicowaniem onkogennym, a zatem ze zwiększoną agresywnością nowotworu i jego progresją. Dodatkowo, analizę IHC przeprowadzono również z użyciem markera UCHL1 w celu dokonania walidacji nie tylko wartości prognostycznej UCHL1 w CCRCC jako markera prognostycznego, ale przede wszystkim potwierdzenia kluczowych aspektów konceptu stemness - macierzystości. Z kolei jako białko negatywnie skorelowane z macierzystością, a więc takie, którego zmniejszona ekspresja wiąże się z agresywnym fenotypem nowotworu, a co za tym idzie, również z przerzutami, wybrano SLC27A2. Na Rycinie 4.15. (panel górny) przedstawiono wzory reakcji IHC w próbkach guzów pierwotnych CCRCC wykazujących niski i wysoki poziom ekspresji danego białka mierzonej za pomocą IHC wraz ze skalą referencyjną barwienia wyznaczoną przez patomorfologów według metodologii H-score (204). Przeprowadzone analizy IHC z użyciem przeciwciał przeciwko białkom HEATR1, SNRNP200, UCHL1, UHRF1 i SLC27A2 wykazały, że w komórkach nowotworowych do ekspresji HEATR1, SLC27A2 i UCHL1 dochodzi w jądrze i cytoplazmie, ekspresja SNRNP200 zachodzi tylko w jądrze komórkowym, a ekspresja UHRF1 widoczna jest głównie w cytoplazmie.

Do walidacji immunohistochemicznej w kohorcie HNSCC wybrano natomiast markery SOX2 i REX1. Markery te zostały wytypowane do walidacji nie za pomocą PROTsi, lecz dlatego, że są znanymi czynnikami transkrypcyjnymi i markerami pluripotencji, a więc są silnie związane macierzystością, a - według aktualnej wiedzy - ich wartość kliniczna dla pacjentów z HNSCC jak dotąd nie została potwierdzona. Na Rycinie 4.15. (panel dolny) zilustrowano wzory reakcji IHC w guzach pierwotnych HNSCC wykazujących niski i wysoki poziom ekspresji SOX2 i REX1 ocenionych za pomocą IHC

wraz ze skalą referencyjną barwienia. Zgodnie z przedstawionymi niżej obrazami preparatów IHC, do ekspresji SOX2 w komórkach HNSCC dochodzi w jądrze komórkowym, natomiast ekspresja REX1 zaobserwowana została dodatkowo w cytoplazmie.



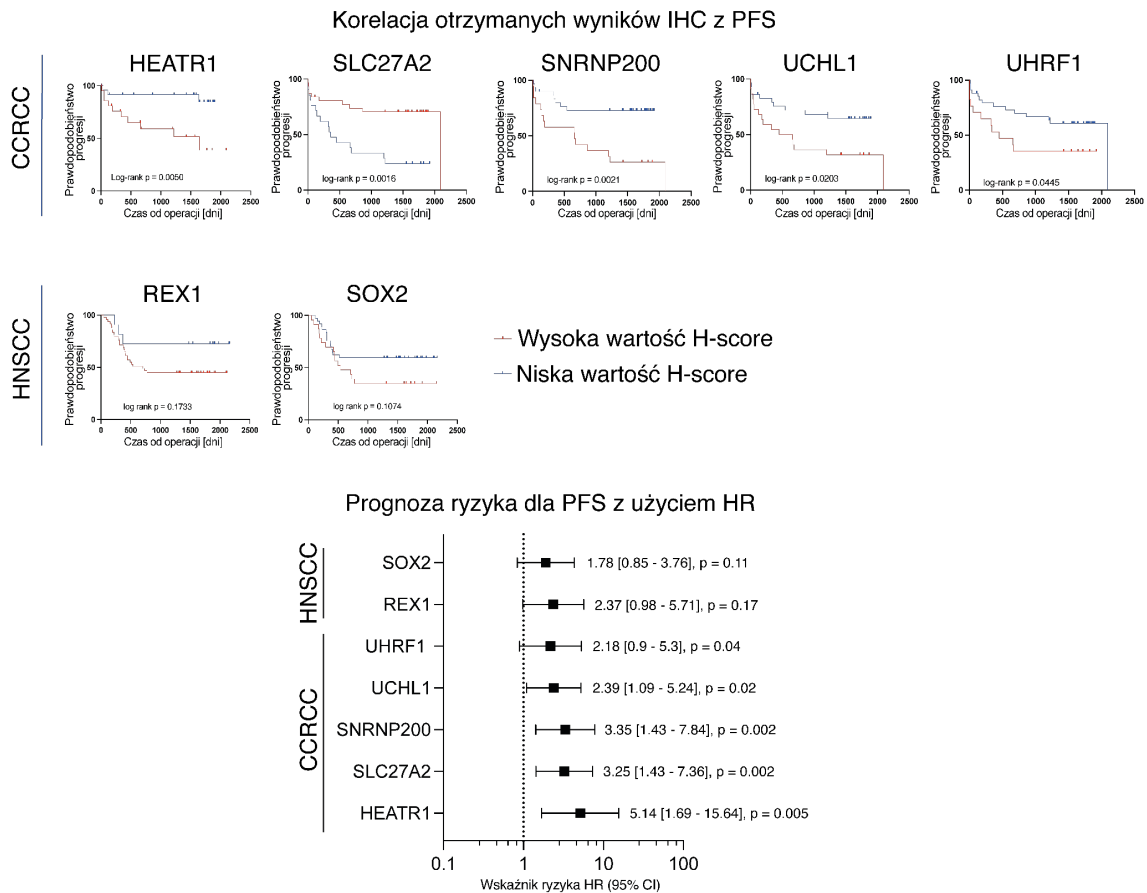
Rycina 4.15. Wzory ekspresji białek związanych z macierzystością określone za pomocą immunohistochemii (IHC) w guzach pierwotnych CCRCC i HNSCC

Zgodnie z oczekiwaniami, poziomy ekspresji HEATR1, SNRNP200, UCHL1 i UHRF1 były znacząco podwyższone w próbkach uzyskanych od pacjentów z przerzutami, co następnie znalazło odzwierciedlenie w analizie przeżycia Kaplana- Meiera (Rycina 4.16., górny panel). Wykazano, że pacjenci z wysoką ekspresją tych białek ('Wysoka wartość H-score') mają wyższe prawdopodobieństwo progresji

choroby, czyli pojawienia się przerzutu. Potwierdzono również wartość predykcyjną SLC27A2, wykazując, że jego niska ekspresja ('Niska wartość H-score) jest silnie skorelowana z krótszym czasem mierzonym od operacji guza pierwotnego do pojawienia się przerzutu. Ponadto, analiza predykcji ryzyka wskazała na istotnie zwiększone ryzyko progresji nowotworu przy wysokim poziomie ekspresji HEATR1, SNRNP200, UCHL1 i UHRF1 oraz przy niskim poziomie ekspresji SLC27A2. Przedstawiono zatem silne dowody na to, że białkowe markery macierzystości HEATR1, SNRNP200, UHRF1 i SLC27A2 mogą służyć jako predykcyjne biomarkery progresji nowotworu u pacjentów z CCRCC. Co więcej, potwierdzono także funkcję białka UCHL1 w prognozowaniu rozwinięcia przerzutów u pacjentów CCRCC, sugerując jego rolę w macierzystości nowotworów.

Podobnie oceniono ekspresję SOX2 i REX1 w próbkach HNSCC. Zarówno SOX2 jak i REX1 są powszechnie znanymi markerami macierzystości, jednak ich funkcjonalne powiązanie i wartość kliniczna nigdy nie zostały opisane w raku głowy i szyi. Analiza korelacji ekspresji białek SOX2 i REX1 mierzonej metodą IHC z wynikiem klinicznym pacjentów HNSCC nie osiągnęła istotności statystycznej, pomimo tego, iż zaobserwowano pewien trend (rycina 4.16.). Analiza predykcji ryzyka również nie wskazała na istotnie zwiększone ryzyko progresji HNSCC przy wysokim poziomie ekspresji SOX2 i REX1 (rycina 4.16.). Wyniki te sugerują, że pomimo ogólnie znanej funkcji czynników transkrypcyjnych SOX2 i REX1 oraz ich związku z odróżnicowaniem komórek macierzystych i nowotworowych białka te nie sprawdzają się w roli markerów predykcyjnych i podkreślają wartość PROTsi jako narzędzia do selekcji kandydatów na biomarkery progresji nowotworów.

Wartość prognostyczna zidentyfikowanych i zwalidowanych markerów białkowych związanych z macierzystością

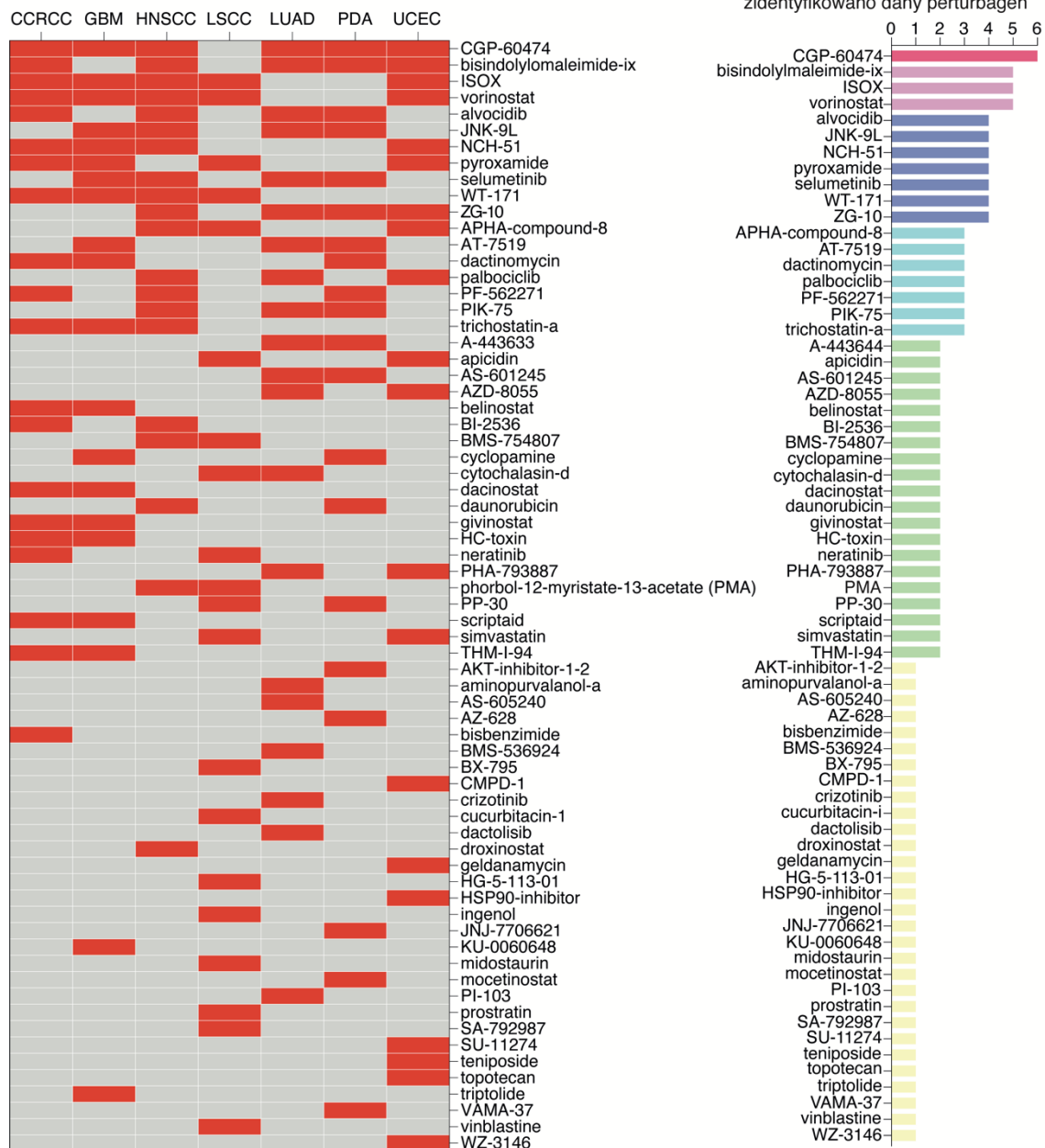


Rycina 4.16. Ocena wartości prognostycznej zidentyfikowanych i zwalidowanych markerów białkowych związanych z macierzystością

4.6 Identyfikacja potencjalnych inhibitorów macierzystości nowotworów

W wyniku tzw. analizy połączeń leków (ang. *Drug Connectivity Analysis*), przeprowadzonej na podstawie 100 białek o najbardziej zwiększonej i zmniejszonej ekspresji w analizowanych nowotworach zidentyfikowano zestaw perturbagenów, czyli małych cząsteczek, takich jak leki lub związki chemiczne (210), które wykazują potencjalną aktywność represjonującą macierzystość w analizowanych typach nowotworów. Wśród perturbagenów hamujących ścieżki związane z fenotypem macierzystości przedstawione na Rycinie 4.17. zidentyfikowano związki wspólne dla kilku typów nowotworów takie jak CGP-60474 dla CCRCC, GBM, HNSCC, LUAD, PDA i UCEC lub celujące tylko w jeden typ nowotworu takie jak prostratin dla LSCC czy topotecan dla UCEC.

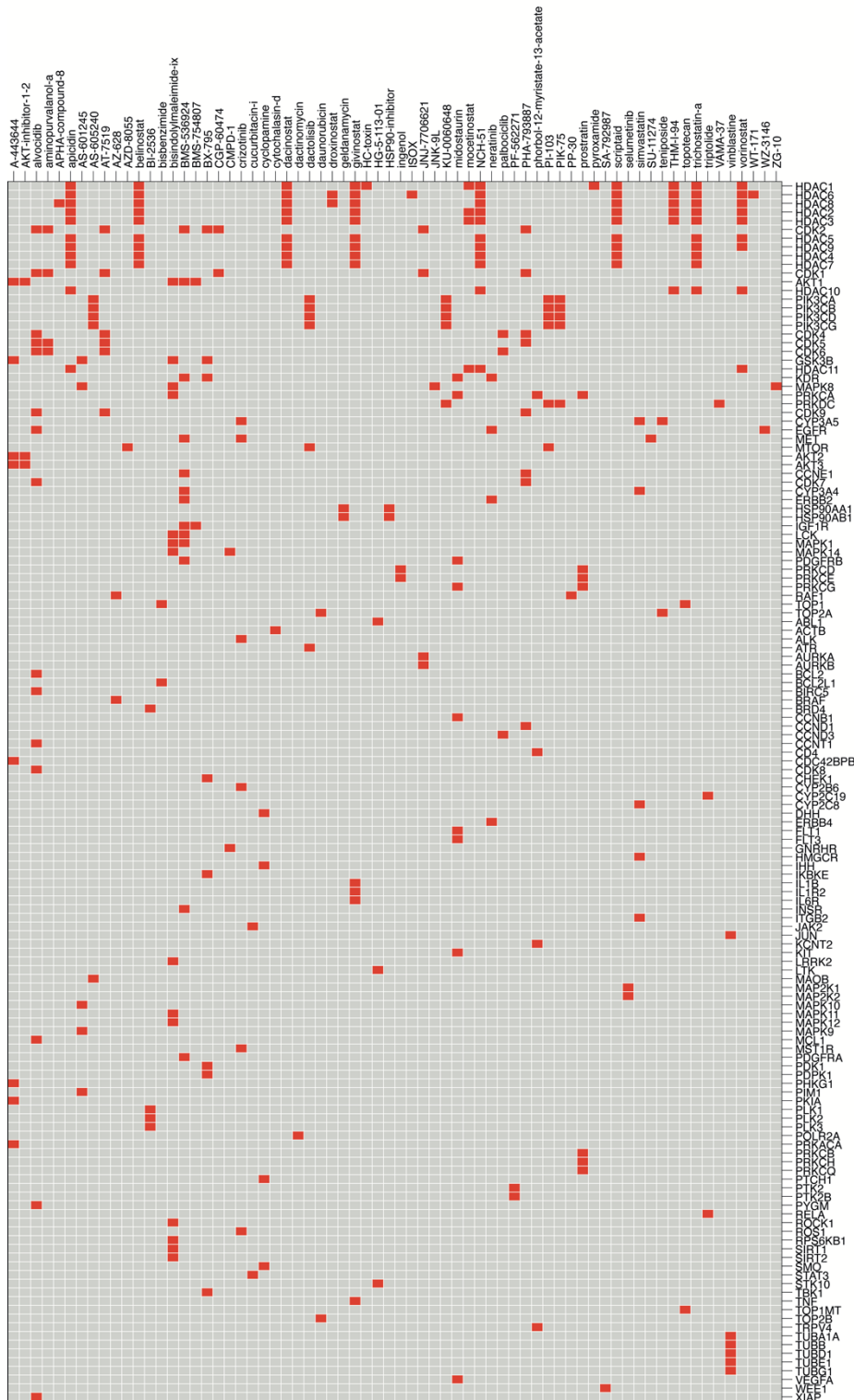
Perturbageny hamujące ścieżki związane z macierzystością



Rycina 4.17. Perturbageny potencjalnie hamujące macierzystość nowotworów

Następnie, w wyniku dalszych analiz połączeń leków, zidentyfikowano specyficzne cele lekowe dla perturbagenów hamujących ścieżki związane z macierzystością nowotworów. Podobnie jak w przypadku samych perturbagenów, zidentyfikowano cele lekowe wspólne dla wielu związków oraz cele lekowe charakterystyczne wyłącznie dla konkretnego perturbagenu, co zilustrowano na Rycinie 4.18.

Cele lekowe dla zidentyfikowanych perturbagenów hamujących ścieżki związane z macierzystością



Rycina 4.18. Cele lekowe dla zidentyfikowanych perturbagenów mających zdolność do hamowania ścieżek związanych z macierzystością nowotworów

Ponadto, na podstawie CMap odkryto również mechanizmy działania (MoAs) zidentyfikowanych potencjalnych inhibitorów macierzystości, które zostały przedstawione poniżej na Rycinie 4.19. Analiza połączeń leków przy użyciu narzędzia CMap umożliwiła identyfikację potencjalnych celów lekowych i mechanizmów działania, poprzez które można zahamować macierzystość nowotworów, a co za tym idzie, wykorzystać je w terapii celowanej dla pacjentów z nowotworami.

Rozdział V

Dyskusja

Macierzystość nowotworów odgrywa kluczową rolę w inicjacji, progresji i oporności na terapię. Jak wykazały analizy przedstawione w pracy, wskaźnik macierzystości oparty na ekspresji białek (PROTsi) stanowi cenne narzędzie do oceny podobieństwa próbek nowotworów do komórek macierzystych. Zdolność do ilościowego określenia cech macierzystych w komórkach nowotworowych przez PROTsi pozwala na głębsze zrozumienie biologii nowotworów i przybliżyć określenie mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworów i odpowiedzi na leczenie.

Trenowanie modelu predykcyjnego opartego na OCLR (78) na licznych zestawie próbek indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych ze zbioru danych HipSci (201), który jest rzetelnie przygotowanym i kompleksowym zasobem wraz z wartościami ekspresji białek wykazywanych iPSCs, dodaje wiarygodności i spójności podejściu zastosowanemu podczas opracowania PROTsi. Dzięki temu podejściu, wykorzystanie PROTsi do oceny stopnia odróżnicowania nowotworów w kohortach próbek pacjentów z nowotworami przyczynia się nie tylko do identyfikacji szlaków sygnałowych związanych z macierzystością, ale także do zrozumienia heterogenności badanych guzów oraz selekcji markerów predykcyjnych i celów lekowych.

Opracowany przez Malta et al. innowacyjny wskaźnik macierzystości oparty o ekspresję mRNA stanowi niewątpliwie wartościowe narzędzie do oceny stopnia odróżnicowania nowotworów na podstawie danych genomicznych, a kompleksowe analizy 33 typów nowotworów pozwoliły na głębsze zrozumienie procesów związanych z macierzystością i podkreśliły udział macierzystości w nowotworzeniu (51). Jednakże, postęp technologiczny w metodach pozyskiwania danych z próbek biologicznych umożliwia otrzymywanie rzetelnych danych proteomicznych, które zapewniają wgląd w to, w jaki sposób genetyczne i niegenetyczne czynniki ryzyka są mechanicznie powiązane z wynikami klinicznymi (211). Stąd też, integracja danych proteomicznych, w tym ekspresji białek, fosforylacji i interakcji białko-białko, z PROTsi odzwierciedla skomplikowaną interakcję białek zaangażowanych w regulację macierzystości. Podejście to pozwala na bardziej precyzyjną charakterystykę stanu macierzystości w komórkach nowotworowych, umożliwiając lepszą prognozę, stratyfikację pacjentów i identyfikację celów terapeutycznych. Proteomika, czyli dziedzina skupiająca się na badaniu białek i ich funkcji na dużą skalę, zapewnia bogactwo informacji wykraczających poza ekspresję mRNA. Analizując wzory ekspresji białek, modyfikacje potranslacyjne i interakcje

białko- białko, proteomika oferuje głębsze zrozumienie zdarzeń molekularnych zaangażowanych w nowotworzenie. Umożliwia identyfikację kluczowych białek w sieciach sygnalizacyjnych, celów leków i biomarkerów, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju badań nad nowotworami i spersonalizowanej medycyny (212). Zatem praca ta podkreśla znaczenie proteomiki w poszerzaniu naszego zrozumienia procesów związanych z macierzystością nowotworów, a opracowanie PROTsi jako nowego wskaźnika macierzystości podkreśla potencjał proteomiki w odkrywaniu złożoności biologii nowotworów i przyspieszaniu rozwoju innowacyjnych strategii terapeutycznych.

Obserwacja, że większość guzów wykazuje znacznie wyższe wartości PROTsi w porównaniu z próbkami prawidłowymi jest zgodna z poglądem, że komórki nowotworowe wykazują cechy podobne do komórek macierzystych (52,53). Odkrycie to jest także zgodne z wcześniejszymi badaniami podkreślającymi obecność nowotworowych komórek macierzystych lub komórek o właściwościach podobnych do komórek macierzystych w różnych typach nowotworów (51,213). Jednak brak istotnej różnicy w wartościach PROTsi między próbkami nowotworowymi PDA czy EOGC a prawidłowymi próbkami w analizowanych kohortach nie dyskwalifikuje konceptu macierzystości, lecz pozwala na dalsze zagłębienie się w przyczyny tej obserwacji. Kompleksowe badania proteogenomiczne niejednokrotnie udowodniły, że zarówno PDA, jak i EOGC wykazują znaczną heterogeniczność wewnątrznowotworową, a różne regiony guza wykazują różne profile molekularne i fenotypy (214–216). Możliwe, że w tych typach nowotworów subpopulacje o cechach macierzystych współistnieją z subpopulacjami komórek, które są mniej podobne do macierzystych. Ta heterogeniczność może prowadzić do szerszego zakresu wartości PROTsi w próbkach guza i w próbkach prawidłowych, co skutkuje mniej wyraźną różnicą między nimi. Jak często podkreślają naukowcy, heterogeniczność wiąże się także z tzw. czystością guza (ang. *tumor purity*), która odnosi się do proporcji lub odsetka komórek nowotworowych w próbce guza w stosunku do innych składników obecnych w próbce, takich jak prawidłowe komórki, komórki zrębu, komórki odpornościowe lub inne komórki nienowotworowe i reprezentuje stopień zanieczyszczenia lub domieszki komórek nienowotworowych w próbce guza (217). W badaniu przeprowadzonym przez Lou i wsp. podkreślono rolę tzw. czystości guza i heterogeniczności komórek raka żołądka wskazując na to, że niska czystość guza i skorelowana z nią heterogeniczność mogą być odpowiedzialne za agresywny fenotyp i złe rokowanie w przypadku GC (218). Ponadto, mikrośrodowisko guza odgrywa kluczową

rolę w kształtowaniu zachowania komórek nowotworowych i ich właściwości macierzystych (219). W przypadku PDA i EOGC, specyficzne czynniki mikrośrodowiskowe obecne odpowiednio w trzustce i żołądku mogą wpływać na charakterystykę macierzystości komórek nowotworowych, przez co jednocześnie mogą modulować wartości PROTsi, czyniąc je mniej rozróżnialnymi pomiędzy próbkami nowotworowymi i prawidłowymi. Dodatkowo, jak wykazali badacze w ramach programu CPTAC, PDA i EOGC wykazują odmienne cechy molekularne i zachowania biologiczne w porównaniu z innymi typami nowotworów (48,49). Zmiany molekularne specyficzne dla tych nowotworów mogą przyczyniać się do innego wzorca ekspresji białek związanych z macierzystością, prowadząc w konsekwencji do mniej wyraźnych różnic w wartościach PROTsi między próbkami nowotworowymi i prawidłowymi. Zatem mniej wyraźną różnicę w wartościach PROTsi między próbkami nowotworowymi i prawidłowymi w PDA i EOGC można przypisać heterogeniczności guza, unikalnym wpływom mikrośrodowiska i biologii specyficznej dla choroby.

Analizując dalej wartości PROTsi dla próbek nowotworowych i próbek prawidłowych zaobserwowano niemal dwukrotnie wyższe wartości PROTsi próbek prawidłowego żołądka w porównaniu z pozostałymi próbkami prawidłowymi. Może to wskazywać na wyjątkowo macierzysty charakter EOGC oraz infiltrację komórek nowotworowych do otaczających prawidłowych tkanek. Inwazyjny charakter EOGC prowadzi do infiltracji komórek nowotworowych poza pierwotne miejsce guza, co skutkuje zajęciem sąsiednich prawidłowych tkanek (220,221). Ta infiltracja może prowadzić do zmian molekularnych w normalnej tkance, takich jak nabycie właściwości podobnych do macierzystych, co może być odzwierciedlone w podwyższonych wartościach PROTsi w tkance prawidłowej. Zrozumienie i terapeutyczne celowanie w te cechy ma zasadnicze znaczenie dla przezwyciężenia wyjątkowych wyzwań związanych z leczeniem EOGC i poprawy wyników leczenia pacjentów.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że agresywne podtypy molekularne, takie jak podstawnokomórkowy podtyp BR czy surowiczy podtyp UCEC mają najwyższe wartości PROTsi, co potwierdza ich wysoce agresywny i macierzysty charakter. Należy zauważyć, że mechanizmy molekularne leżące u podstaw agresywnych podtypów mogą być złożone i specyficzne dla każdego podtypu raka. Dlatego też, tak ważne jest przeprowadzanie wielkoskalowych badań opartych na technikach profilowania molekularnego, takich jak sekwencjonowanie genomu, proteomika i testy

funkcjonalne, by odkryć konkretne zmiany i ścieżki sygnałowe związane z macierzystością napędzające agresywny fenotyp obserwowany w tych podtypach.

Modyfikacje potranslacyjne odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu białek poprzez wpływ na ich właściwości fizyko-chemiczne, aktywność i stabilność. Jedną z PTMs jest fosforylacja, która reguluje różne funkcje komórkowe, takie jak wzrost komórek, różnicowanie czy apoptozę (222).

Rozwój terapii celowanych ukierunkowanych na hamowanie szlaków fosforylacji przyczynił się do zwiększenia możliwości skutecznego wyleczenia pacjentów z nowotworami. Obecnie stosuje się szereg inhibitorów fosforylacji w celu przeciwdziałania progresji nowotworów i poprawy wyników leczenia pacjentów. Jedną klasą inhibitorów, znana jako inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI), wykazała niezwykłą skuteczność w celowaniu w określone kinazy tyrozynowe zaangażowane w nieprawidłowe szlaki sygnałowe. Leki takie jak imatynib, erlotynib i lapatynib wykazały znaczną skuteczność w leczeniu różnych nowotworów złośliwych takich jak przewlekła białaczka szpikowa, NSCLC, PDA czy BR, poprzez blokowanie fosforylacji reszt tyrozynowych i zakłócanie dalszych kaskad sygnalizacyjnych (223–225). Co więcej, w 2022 roku przeprowadzono badanie, w którym imatynib skutecznie hamował szlak PDGFR/PI3K/AKT *in vivo*, a połączenie imatynibu z gemcytabiną wykazało efekt terapeutyczny w lekoopornym modelu PDX PDA (226). Ponadto inhibitory BRAF, w tym wemurafenib i dabrafenib, okazały się wysoce skuteczne w specyficznym celowaniu w mutację *BRAF* w czerniaku, oferując indywidualne podejście do leczenia (227,228). Rozwój inhibitorów MEK, takich jak trametynib i kobimetynib, zapewnił nowe możliwości interwencji w nowotworach związanych ze szlakiem MAPK, w tym czerniaku i NSCLC (229–232). Ponadto, pojawienie się inhibitorów CDK, takich jak palbociclib, ribociclib i abemaciclib, zaoferowało obiecującą strategię blokowania progresji cyklu komórkowego poprzez hamowanie określonych kinaz zależnych od cyklin w BR (233). Przykłady te podkreślają znaczący postęp w wykorzystaniu inhibitorów fosforylacji jako celowanych terapii przeciwnowotworowych. Jednakże, dalsze badania i próby kliniczne są uzasadnione, aby zbadać pełny potencjał tych inhibitorów i zidentyfikować dodatkowe cele dla skutecznego leczenia nowotworów.

Dlatego też, w celu odkrycia nowych celów terapeutycznych, które mają potencjał hamowania fenotypu macierzystego nowotworów, przeprowadzono analizę korelacji fosforylacji białek z PROTsi.

W wyniku tych korelacji, zidentyfikowano związane z macierzystością fosforylowane białka wraz z miejscami ich fosforylacji. Zidentyfikowane miejsca fosforylacji w białkach pozytywnie skorelowanych z macierzystością stanowią potencjalne cele dla interwencji terapeutycznych. Celowanie w te miejsca fosforylacji może prowadzić do osłabienia cech związanych z macierzystością nowotworu, które są związane z agresywnością guza i opornością na terapię. Ponadto, zrozumienie związku między fosforylacją białek a macierzystością może przyczynić się do opracowania spersonalizowanych strategii leczenia. Oceniając stan fosforylacji określonych białek u poszczególnych pacjentów, klinicyści mogą potencjalnie dostosować terapie, które są ukierunkowane na szlaki związane z macierzystością i poprawić wyniki leczenia pacjentów nowotworowych. Co więcej, identyfikacja miejsc fosforylacji związanych z macierzystością zapewnia cenny wgląd w mechanizmy molekularne leżące u podstaw macierzystości raka. Te miejsca fosforylacji mogą służyć jako biomarkery do przewidywania rokowania pacjentów i odpowiedzi terapeutycznej. Klinicyści mogą oceniać status fosforylacji tych białek w próbkach pobranych od pacjentów w celu stratyfikacji pacjentów na podgrupy o różnych wynikach klinicznych i kierować decyzjami dotyczącymi leczenia. Dodatkowo, korelacja między fosforylacją białek a macierzystością sugeruje, że połączenie terapii celowanych przeciwko określonym miejscom fosforylacji z istniejącymi metodami leczenia może poprawić skuteczność terapeutyczną. Poprzez jednoczesne ukierunkowanie zarówno na szlaki związane z macierzystością, jak i inne krytyczne szlaki sygnałowe, terapie skojarzone mogą potencjalnie zwiększyć skuteczność eliminacji nowotworowych komórek macierzystych i poprawić wyniki leczenia pacjentów. Powiązanie hamowania fosforylacji i macierzystości nowotworu sugerowano m.in. w badaniu przeprowadzonym przez Chang i wsp., w którym potwierdzono, że kukurbitacyna I, potencjalny środek terapeutyczny, hamuje szlak STAT3 i wykazuje działanie antyproliferacyjne i uwrażliwia na radio- i chemioterapię komórki rdzeniaka zarodkowego MB-CD133+, które mają wysoce agresywny charakter i posiadają właściwości nowotworowych komórek macierzystych (234).

Ponadto, analizy korelacji PROTsi i fosforylacji białek doprowadziły do niezwykle ciekawej obserwacji. Wykazały, że fosforylacja białka SRRM2 jest silnie związana z wysokimi wartościami PROTsi. Spośród wszystkich ośmiu typów nowotworów poddanych tejże analizie, korelację tę zaobserwowano jedynie w dwóch typach analizowanych nowotworów - w glejaku wielopostaciowym i pediatrycznych guzach mózgu. Jak wskazuje Atlas Białek Człowieka (ang. *The Human Protein Atlas*,

<https://www.proteinatlas.org/>), białko SRRM2 ulega ekspresji niemalże we wszystkich prawidłowych komórkach zdrowego organizmu, a jego rola opiera się na udziale w procesie splicingu (235). Według aktualnego stanu wiedzy, białko SRRM2 nie zostało jak dotąd szeroko powiązane z nowotworzeniem, a jego rolę udokumentowano jedynie w nowotworze tarczycy oraz zaburzeniach neurorozwojowych związanych z opóźnieniem rozwojowym, głównie w zakresie mowy, cech autystycznych lub zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, nadwagi i charakterystycznych rysów twarzy (236,237). Wykazana korelacja wskazuje na potencjalny związek między fosforylacją SRRM2 a fenotypem macierzystym. Fakt, że korelację tę zaobserwowano tylko w GBM i PBT sugeruje, że rola fosforylacji SRRM2 w regulacji macierzystości może być specyficzna dla tych konkretnych typów nowotworów. Warto zauważyć, że białko SRRM2 jest fosforylowane w wielu miejscach, co dodatkowo podkreśla złożoność jego mechanizmów regulacyjnych i potencjalny udział w procesach związanych z macierzystością.

Odkrycia dotyczące fosforylacji w badanych kohortach zapewniają cenny wgląd w mechanizmy molekularne leżące u podstaw macierzystości nowotworów. Zrozumienie roli fosforylacji białek w regulacji macierzystości może mieć wpływ na rozwój terapii celowanych i opracowywanie biomarkerów, potencjalnie oferując nowe możliwości interwencji terapeutycznych w nowotworach.

Integracja wskaźnika macierzystości opartego na ekspresji białek (PROTsi) z danymi wieloomicznymi, w tym zmiennością liczby kopii (CNV), metylacją DNA, ekspresją mRNA, miRNA i białek, dostarczyła cennych informacji na temat złożonego związku między macierzystością nowotworów a czynnikami molekularnymi w różnych typach nowotworów. To integracyjne podejście umożliwiło identyfikację białek i szlaków związanych z macierzystością, oferując nowe spojrzenie na biologię raka i potencjalne cele terapeutyczne.

Za pomocą analiz proteogenomicznych przeprowadzonych dla wielu typów nowotworów, zbadano korelację między wartościami PROTsi a różnymi cechami molekularnymi. Przeprowadzone analizy ujawniły różne wzorce i odchylenia od oczekiwanych powiązań między wartościami PROTsi a czynnikami molekularnymi. W większości przypadków wysokie wartości PROTsi były pozytywnie skorelowane z podwyższonymi poziomami ekspresji białek i mRNA, obniżoną ekspresją miRNA, hipometylacją DNA i zwiększoną liczbą zmian liczby kopii poprzez np. amplifikacje.

Tendencje te zaobserwowano w różnych próbkach nowotworowych we wszystkich badanych typach nowotworów. Jednakże, jak wykazano na mapach cieplnych, zaobserwowano również interesujące odchylenia od tych wzorców, sugerując obecność unikalnych mechanizmów regulacyjnych w określonych typach nowotworów. Na przykład, w przypadku HNSCC, wysokie wartości PROTsi korelowały z wysoką ekspresją białka DHX9, zwiększoną ekspresją mRNA, zwiększoną CNV, niską ekspresją miRNA i hipometylacją DNA. W przypadku innych białek, np. DYSF, wysokie wartości PROTsi korelowały z niską ekspresją białka, obniżoną ekspresją mRNA, wysoką ekspresją miRNA, zwiększoną CNV i hipermetylacją DNA. Podobnie, białka takie jak HEATR1, DDX5, TBC1D17 i UTP15, wykazywały różne wzorce ekspresji i powiązania z CNV, metylacją DNA i ekspresją miRNA, co sugeruje różne mechanizmy regulacyjne leżące u podstaw macierzystości. Co ciekawe, białko HEATR1 zidentyfikowane w HNSCC znalazło się także wśród 100 białek najbardziej związanych z macierzystością w CCRCC, LSCC, LUAD i UCEC, będąc w grupie białek pozytywnie skorelowanych z macierzystością. Jednakże, porównanie mechanizmów molekularnych, w które zaangażowane jest białko HEATR1 zwraca uwagę na różnice molekularne między tymi pięcioma nowotworami. Zaobserwowano, że dla HEATR1 wysokie wartości PROTsi korelują z wysoką ekspresją mRNA i białka we wszystkich pięciu nowotworach, zmniejszoną ekspresją miRNA w HNSCC i LSCC (dla CCRCC, LUAD i UCEC nie wykazano korelacji z miRNA), zwiększoną CNV we wszystkich pięciu nowotworach i hipermetylacją DNA w HNSCC i UCEC oraz hipometylacją DNA w CCRCC, LUAD i LSCC (choć w podtypie klasycznym LSCC zaobserwowano głównie hipermetylację).

Zaobserwowane różnice w mechanizmach molekularnych związanych z białkiem HEATR1 wśród pięciu analizowanych nowotworów (HNSCC, CCRCC, LSCC, LUAD i UCEC) podkreślają heterogeniczność i odrębną charakterystykę tych typów nowotworów. Na ogół wysokie wartości PROTsi we wszystkich pięciu nowotworach były związane ze zwiększoną ekspresją mRNA i białka HEATR1, co sugeruje potencjalny udział HEATR1 w szlakach związanych z macierzystością. Odkrycie to wskazuje, że regulacja HEATR1 w górę na poziomie zarówno mRNA jak i białka może przyczyniać się do macierzystych właściwości komórek nowotworowych w tych pięciu nowotworach złośliwych. Odnosząc się do ekspresji miRNA, zmniejszoną ekspresję miRNA zaobserwowano w próbkach HNSCC i LSCC z wysokimi wartościami PROTsi, co wskazuje na potencjalny mechanizm regulacyjny, w którym regulacja w dół miRNA (zmniejszenie ekspresji miRNA) może wiązać się ze zwiększoną ekspresją HEATR1

w tych dwóch nowotworach. I odwrotnie, nie zaobserwowano istotnej korelacji między wysokimi wartościami PROTsi a ekspresją miRNA dla HEATR1 w CCRCC, LUAD i UCEC, co sugeruje alternatywne mechanizmy regulacyjne lub udział innych czynników w modulowaniu ekspresji białka HEATR1 w tych typach nowotworów. Ponadto, zwiększona zmienność liczby kopii (CNV) była ściśle związana z wysokimi wartościami PROTsi dla HEATR1 we wszystkich pięciu nowotworach. Sugeruje to, że amplifikacje genomowe HEATR1 mogą przyczyniać się do jego zwiększonej ekspresji i potencjalnie napędzać szlaki związane z macierzystością. Co ciekawe, zaobserwowano różnice we wzorcach metylacji DNA związanych z ekspresją HEATR1 wśród nowotworów. W HNSCC i UCEC wysokie wartości PROTsi korelowały z hipermetylacją DNA HEATR1, wskazując na potencjalny mechanizm regulacji epigenetycznej prowadzący do jego obniżenia. W przeciwieństwie do tego, CCRCC, LUAD i LSCC wykazywały hipometylację DNA HEATR1 związaną z wysokimi wartościami PROTsi, co sugeruje inny krajobraz epigenetyczny i mechanizm regulacyjny. Co więcej, w klasycznym podtypie LSCC obserwowano głównie hipermetylację DNA, co wskazuje na potencjalną specyficzną dla podtypu epigenetyczną regulację ekspresji HEATR1. Podsumowując, odkrycia te podkreślają złożony charakter mechanizmów molekularnych w różnych typach nowotworów. Zaobserwowane różnice w ekspresji miRNA, wzorcach metylacji DNA i ich korelacji z wartościami PROTsi podkreślają heterogeniczność i unikalne cechy każdego nowotworu, odzwierciedlając różnorodne mechanizmy regulacyjne i biologię leżącą u podstaw tych nowotworów złośliwych.

Ponadto, analizy ujęte na mapach cieplnych ujawniły również związek między PROTsi a wynikami klinicznymi pacjentów, w tym całkowitym przeżyciem (OS) i przeżyciem wolnym od progresji (PFS), przedstawionymi jako współczynniki ryzyka (HR) wraz z ich istotnością statystyczną. Analiza ta zidentyfikowała białka o wartości prognostycznej, wskazując na ich potencjał jako biomarkerów do stratyfikacji pacjentów i przewidywania odpowiedzi na leczenie oraz progresji choroby. Jednakże, zaobserwowano, że nie wszystkie białka związane z macierzystością posiadają wartość prognostyczną w analizowanych kohortach. Brak wartości predykcyjnej niektórych białek związanych z macierzystością można przypisać kilku czynnikom. Po pierwsze, badacze zajmujący się macierzystością nowotworów podkreślają, że macierzystość jest złożoną cechą, na którą wpływa wiele czynników molekularnych (238). Podczas gdy niektóre białka mogą wykazywać korelację z macierzystością, ich indywidualny wkład w ogólną wartość predykcyjną PROTsi może zostać przyćmiony

przez połączony efekt innych białek lub czynników zaangażowanych w regulację macierzystości. Dlatego też moc predykcyjna pojedynczego białka może być ograniczona, biorąc pod uwagę wieloaspektowy charakter macierzystości w nowotworach. Po drugie, jak wskazuje m.in. Costoya i wsp. czy też Madsen, macierzystość w nowotworach jest regulowana przez skomplikowane sieci mechanizmów genetycznych, epigenetycznych i potranslacyjnych (239,240). Chociaż białko może być związane z macierzystością, na jego aktywność lub znaczenie funkcjonalne w szlakach związanych z macierzystością może wpływać wzajemne oddziaływanie różnych mechanizmów regulacyjnych. To wzajemne oddziaływanie może komplikować wartość predykcyjną pojedynczego białka, ponieważ jego działanie może być modulowane przez inne czynniki lub szlaki sygnałowe. Po trzecie, nowotwory należą do wysoce heterogenicznych chorób, składają się z różnych podtypów o odmiennych profilach molekularnych. Białka, które wykazują wartość predykcyjną w jednym podtypie raka, mogą nie wykazywać takiej samej wartości predykcyjnej w innym podtypie. Biologia i mechanizmy regulacyjne mogą różnić się w zależności od podtypu nowotworu, prowadząc do różnic w wartości predykcyjnej poszczególnych białek (241,242). I po czwarte, jak wskazuje wiele doniesień m.in. Hass i wsp. czy Li i wsp., funkcjonalna rola białka może się różnić w zależności od kontekstu komórkowego lub mikrośrodowiska guza (243,244). Białko, które jest skorelowane z macierzystością w jednym otoczeniu, może mieć inne funkcje lub wywoływać efekty w innym mikrośrodowisku (245). Specyficzne interakcje i wzajemne oddziaływania między białkami w złożonym mikrośrodowisku guza mogą wpływać na wkład poszczególnych białek w macierzystość i ogólną wartość predykcyjną PROTsi.

Podsumowując, ograniczoną wartość predykcyjną niektórych białek skorelowanych z macierzystością można przypisać złożonej naturze biologii nowotworów, wzajemnemu oddziaływaniu mechanizmów regulacyjnych, heterogeniczności podtypów nowotworów i zależnej od kontekstu funkcji białek.

Dodatkowo przypisano zidentyfikowane białka związane z macierzystością do odpowiadających im rodzin funkcjonalnych, zapewniając wgląd w role funkcjonalne i potencjalne interakcje tych białek.

Ponadto, analiza obecnych celów lekowych wykazała, że większość białek związanych z macierzystością nie jest obecnie celem istniejących terapii, co podkreśla ich potencjał jako nowych celów w leczeniu tych nowotworów.

Korelacja między wskaźnikiem macierzystości a ekspresją białek zaowocowała identyfikacją potencjalnych celów dla terapii przeciwnowotworowej, zarówno specyficznych dla konkretnych typów nowotworów, jak i wspólnych dla różnych typów nowotworów.

Kategoryzacja łącznie 700 białek najbardziej związanych z macierzystością zidentyfikowanych w CCRCC, GBM, HNSCC, LSCC, LUAD, PDA i UCEC na różne grupy jest cennym podejściem do uzyskania wglądu we wspólne i odrębne cechy molekularne macierzystości raka. Kategoryzując białka związane z macierzystością na grupy skupiające białka zidentyfikowane w 2 typach nowotworów, 3 typach nowotworów, grupę białek pannotworowych oraz grupę białek specyficznych dla konkretnych nowotworów, można dostrzec powtarzające się wzorce i zidentyfikować kluczowe czynniki, które przyczyniają się do regulacji macierzystości w różnych kontekstach.

Białka zidentyfikowane w 2 lub 3 nowotworach sugerują potencjalne wspólne mechanizmy regulacyjne i szlaki sygnałowe leżące u podstaw macierzystości w tych typach nowotworów. Białka te mogą stanowić ważne cele do dalszych badań i mogą mieć wpływ na rozwój strategii terapeutycznych ukierunkowanych na procesy związane z macierzystością wspólne dla tych typów nowotworów.

Szczególnie intrygujące są białka pannotworowe, które są związane z macierzystością w czterech lub więcej typach nowotworów. Białka te prawdopodobnie odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach związanych z macierzystością, które wykraczają poza określone konteksty nowotworowe. Badanie funkcji i mechanizmów regulacyjnych białek pannotworowych może zapewnić cenny wgląd w podstawowe szlaki macierzystości i potencjalne cele terapeutyczne, które mogą być stosowane w terapii wielu nowotworów, tak jak w przypadku inhibitorów PD-1/PD-L1, takich jak pembrolizumab i niwolumab, które są zatwierdzone do leczenia wielu typów nowotworów, w tym czerniaka, niedrobnokomórkowego raka płuc, raka nerkowokomórkowego, raka pęcherza moczowego czy chłoniaka Hodgkina (246).

Dodatkowo, identyfikacja specyficznych dla nowotworu białek związanych z macierzystością podkreśla unikalne cechy molekularne i sieci regulacyjne, które są charakterystyczne dla konkretnych typów nowotworów. Jednym z przykładów takich białek są kinazy tyrozynowe ALK i ROS1 będące celem inhibitorów takich jak crizotinib i ceritinib w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca z rearanżacjami ALK lub ROS1 (247–249). Badanie procesów, w których uczestniczą białka specyficzne dla nowotworów

może pomóc w dostosowaniu spersonalizowanych metod leczenia i poprawie naszego zrozumienia różnych mechanizmów molekularnych napędzających macierzystość w różnych typach nowotworów.

Podsumowując, kategoryzacja białek w oparciu o ich związek z macierzystością zidentyfikowany w jednym lub wielu typach nowotworów zapewnia kompleksowy obraz molekularnego krajobrazu macierzystości w nowotworach. Oferuje ona cenne informacje dla lepszego zrozumienia wspólnych i unikalnych mechanizmów leżących u podstaw macierzystości nowotworów, identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych i nadania kierunku badaniom w dziedzinie biologii i leczenia nowotworów.

W dalszej części rozważań nad macierzystością nowotworów przeprowadzono analizę immunohistochemiczną białek związanych z macierzystością. W wyniku walidacji wybranych białek związanych z macierzystością za pomocą IHC potwierdzono, że PROTsi stanowi efektywne narzędzie do selekcji markerów prognostycznych i terapeutycznych. W badanej kohorcie CCRCC ekspresja HEATR1, SNRNP200 i UHRF1 mierzona z wykorzystaniem techniki IHC była znacząco podwyższona w próbkach uzyskanych od pacjentów z przerzutami, co następnie znalazło odzwierciedlenie w analizie przeżycia wolnego od progresji Kaplana-Meiera. Wykazano, że pacjenci z wysoką ekspresją tych białek (czyli z wysokim wynikiem H-score), które uprzednio zidentyfikowano jako pozytywnie skorelowane z macierzystością za pomocą PROTsi, mają istotnie większe prawdopodobieństwo progresji nowotworu w postaci przerzutów. W podobny sposób potwierdzono również wartość predykcyjną białka negatywnie skorelowanego z macierzystością - SLC27A2, wykazując, że jego niska ekspresja (niski wynik H-score) jest istotnie skorelowana z krótszym czasem do pojawienia się przerzutów. Co więcej, analiza przewidywania ryzyka wykazała znacznie zwiększone ryzyko progresji raka przy wysokich poziomach ekspresji białek HEATR1, SNRNP200 i UHRF1 oraz przy niskim poziomie ekspresji SLC27A2. W związku z powyższym, przedstawiono solidne dowody na to, że białka HEATR1, SNRNP200, UHRF1 i SLC27A2 mają charakter markerów macierzystości w CCRCC i mogą służyć jako biomarkery prognostyczne progresji raka u pacjentów z CCRCC.

Co więcej, do walidacji IHC wybrano także białko UCHL1. Choć białko UCHL1 zostało umieszczone na liście najbardziej pozytywnie skorelowanych białek z macierzystością poza pierwszą 50, także zostało zidentyfikowane jako białko o wysokim potencjale macierzystym, ponieważ korelacja między wysoką ekspresją UCHL1

a wysokimi wartościami PROTsi była bardzo wyraźna. Zarówno pozytywna korelacja ekspresji tego białka z PROTsi, jak i jego wysoka wartość prognostyczna udokumentowana w wyniku analizy IHC potwierdzają funkcję PROTsi jako rzetelnego narzędzia do selekcji celów białkowych o wartości predykcyjnej.

Ponadto, warto też przyjrzeć się kontekstowi funkcjonalnemu wszystkich białek wybranych do walidacji IHC w CCRCC.

HEATR1 jest strukturalnym i funkcjonalnym homologiem drożdżowego białka U3 związanego z małym nukleolarnym RNA 10 (UTP 10) oraz jednym z czynników biogenezy rybosomów. Szerzej jego funkcje opisali Prieto i McStay, podkreślając, że HEATR1 jest wymagany do optymalnej transkrypcji pre-rybosomalnego RNA przez polimerazę RNA I (250). Badania wykazały wyraźny związek między dziedzicznymi i nabytymi nieprawidłowościami biogenezy rybosomów a zwiększonym ryzykiem raka. Poziom endogennego HEATR1 był znacznie wyższy w ludzkich liniach komórkowych raka w porównaniu z pierwotnymi nietransformowanymi komórkami i był związany z dużymi jąderkami, które stanowią jedno z kryteriów wyznaczania złośliwości nowotworów (251,252). Odkrycia te są zgodne ze zwiększoną ekspresją HEATR1 m.in. w płaskonabłonkowym raku jamy ustnej i gardła, glejaku wielopostaciowym czy też raku żołądka. Jednakże, zwiększona ekspresja HEATR1 w tych nowotworach łączona była z różnymi mechanizmami molekularnymi. W płaskonabłonkowym raku jamy ustnej i gardła (OSCC) dowiedziono, że zwiększona ekspresja HEATR1 wraz z RUVBL1 i RUVBL2 promuje proliferację OSCC poprzez aktywację mTOR i syntezę pre-RNA (253). Zwiększoną ekspresję HEATR1 stwierdzono również w GBM i komórkach macierzystych glejaków (254), co podkreśla związek HEATR1 z macierzystością. Wyniki badań nad GC dostarczyły dowodów na to, że HEATR1 ulegał wysokiej ekspresji w GC, a jego wyższa ekspresja w stosunku do komórek prawidłowych żołądka była związana z progresją raka i przerzutami. Dodatkowo, knockdown HEATR1 znacząco hamował proliferację komórek i tworzenie kolonii oraz promował apoptozę komórek (255), co łącznie również zaznacza związek HEATR1 z macierzystością. Z kolei w przypadku gruczolaka trzustki odkryto, że ekspresja HEATR1 w PDA jest zmniejszona w stosunku do prawidłowych komórek trzustki oraz że HEATR1 negatywnie reguluje aktywację Akt w szlaku sygnałowym mTOR, a regulacja aktywności Akt przez utratę HEATR1 w PDA może powodować oporność na chemioterapię (256).

Na podstawie analiz przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano, że białko HEATR1 ma związek z macierzystością nowotworów takich jak CCRCC, HNSCC, LSCC,

LUAD i UCEC. Jak wspomniano wyżej, zaobserwowane różnice w mechanizmach molekularnych związanych z białkiem HEATR1 wśród tych pięciu nowotworów podkreślają heterogeniczność i odrębną charakterystykę tych typów nowotworów. Ponadto, odkrycie białka HEATR1 jako związanego z procesami macierzystości w tych nowotworach jest nowatorskie, gdyż - według aktualnego stanu wiedzy - nie wykazano wcześniej takiego związku w wymienionych typach nowotworów. Co więcej, wykazano wartość HEATR1 jako markera prognostycznego w CCRCC.

SNRNP200 jest helikazą RNA i należy do rodziny małych jądrowych nukleoprotein (257). Badania nad funkcją SNRNP200 wykazały, że jest on zaangażowany w budowę, aktywację i degradację spliceosomu (258,259) oraz pośredniczy w zmianach w dynamicznej sieci oddziaływań RNA-RNA w spliceosomie (260). Choć funkcje biologiczne SNRNP200 związane z nowotworzeniem nie są szeroko opisane w literaturze, dowiedziono, że deregulacja procesu splicingu w PDA wiąże się ze zwiększoną ekspresją SNRNP200, co w konsekwencji prowadzi do gorszego rokowania u pacjentów PDA oraz progresji nowotworu - przerzutów i wznowy (261). W przypadku raka piersi odnotowano, że hamowanie ekspresji SNRNP200 wraz z innymi białkami biorącymi udział w aktywacji spliceosomu może być nową strategią terapeutyczną w leczeniu tego raka (262), jednak badania te nie zostały kontynuowane.

Przeprowadzone analizy molekularne i odkrycie związku SNRNP200 z macierzystością nowotworów wskazują zatem na możliwość wykorzystania SNRNP200 jako potencjalnego celu dla leków przeciwnowotworowych. Wykazano, że białko SNRNP200 znajduje się wśród białek najbardziej skorelowanych z macierzystością w 4 typach analizowanych nowotworów: CCRCC, GBM, LSCC i UCEC. W przypadku każdego z tych nowotworów wykazano pozytywną korelację między wysokimi wartościami PROTsi a zwiększoną ekspresją mRNA i białka oraz zwiększoną liczbą kopii SNRNP200, jednakże mechanizmy związane z miRNA i metylacją DNA różniły się między tymi nowotworami, wskazując na potencjalny udział SNRNP200 w różnych ścieżkach związanych z macierzystością i odmienną jego regulację w różnych nowotworach. Pozytywną korelację PROTsi ze zwiększoną ekspresją miRNA zaobserwowano w UCEC (choć niektóre próbki odbiegały od tego schematu), natomiast w przypadku CCRCC i LSCC nie wykazano takiej korelacji, a w GBM wysokie wartości wskaźnika macierzystości były wyraźnie związane ze zmniejszoną ekspresją miRNA. Biorąc pod uwagę metylację DNA, wysokie wartości PROTsi korelowały z hipometylacją

DNA w GBM i hipermetylacją DNA w LSCC, natomiast w pozostałych typach nowotworów nie zaraportowano korelacji.

Co więcej, oprócz wykazania, że SNRNP200 stanowi potencjalny cel dla leków w terapii przeciwnowotworowej, potwierdzono wartość kliniczną SNRNP200 jako markera progresji CCRCC.

UHRF1 jest białkiem wielodomenowym, zawiera domenę palca RING, a więc posiada aktywność E3 ligazy ubikwityny i pośredniczy w ubikwitynacji m.in. histonu H3 (263). Wykazano, że rola UHRF1 jako kluczowego czynnika epigenetycznego wynika z jego zaangażowania w utrzymanie metylacji DNA, interakcji z czynnikami modyfikacji histonów, wpływu na strukturę chromatyny i jego wkładu w regulację ekspresji genów. Uczestnicząc w tych procesach, UHRF1 pomaga ustanowić i zachować informacje epigenetyczne, odgrywając rolę w dziedziczeniu i utrzymywaniu stabilności epigenomów komórkowych (264). Nieprawidłowa ekspresja lub funkcja może zakłócać normalną regulację epigenetyczną, prowadząc do zmienionych wzorców ekspresji genów i przyczyniając się do stanów chorobowych, w tym nowotworzenia (265). W nie tak dawno przeprowadzonym badaniu dowiedziono, że UHRF1 pełni funkcję onkogenną w raku nerkowokomórkowym (RCC). Zwiększona ekspresja UHRF1 sprzyja progresji RCC, potencjalnie poprzez epigenetyczną regulację TXNIP, a testy funkcjonalne wykazały, że inhibicja aktywności UHRF1 może stanowić strategię hamowania wzrostu guza, tłumienia migracji i inwazji komórek RCC oraz promowania apoptozy (266).

UHRF1 jest zaangażowany w procesy epigenetyczne, w tym metylację DNA i modyfikacje histonów. Nowotworowe komórki macierzyste charakteryzują się specyficznymi sygnaturami epigenetycznymi, które przyczyniają się do ich samoodnowy i zdolności różnicowania. Rola UHRF1 w utrzymywaniu wzorców metylacji DNA i modyfikacji histonów może wpływać na epigenetyczny obraz nowotworowych komórek macierzystych, wpływając w ten sposób na ich właściwości macierzyste.

W wyniku przeprowadzonych w pracy analiz, podkreślono rolę białka UHRF1 w regulacji macierzystości CCRCC. W badanych próbkach CCRCC, wykazano, że wysokie wartości PROTsi korelują z wysoką ekspresją mRNA i białka UHRF1 oraz wysoką liczbą CNV, a także z hipometylacją DNA. Wyniki te sugerują, że próbki CCRCC z podwyższonymi wartościami PROTsi, a więc ze zwiększonym fenotypem macierzystym wykazują również podwyższone poziomy ekspresji genu *UHRF1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wysoka liczba CNV dla UHRF1 wskazuje, że próbki CCRCC z wysokimi wartościami PROTsi mają zwiększoną liczbę kopii genu *UHRF1*.

Gdy DNA jest hipometylowane, co oznacza spadek poziomu metylacji DNA, może to prowadzić do aktywacji lub zwiększonej regulacji ekspresji genów. Hipometylacja regionów regulatorowych genów, w szczególności promotorów, może skutkować zwiększoną dostępnością DNA m.in. do czynników transkrypcyjnych, ułatwiając ich wiązanie i inicjację transkrypcji genów, co w konsekwencji może prowadzić do zwiększenia produkcji mRNA, a następnie zwiększenia ekspresji białka (267). Zatem hipometylacja DNA genu *UHRF1* sugeruje, że regiony regulatorowe genu mogą mieć zmniejszoną metylację, co pozwala na zwiększoną transkrypcję i ekspresję białka UHRF1. Hipometylacja może więc przyczyniać się do obserwowanej wysokiej ekspresji UHRF1 w badanych próbkach.

Biorąc pod uwagę cechy molekularne UHRF1 i jego związek z macierzystością wykazany w CCRCC, UHRF1 wydaje się być doskonałym kandydatem na cel dla leków przeciwnowotworowych. Ponadto, przedstawione dowody wskazują, że UHRF1 jest także markerem prognostycznym progresji CCRCC.

Białko SLC27A2, znane również jako białko transportujące kwasy tłuszczowe 2, odgrywa biologiczną rolę w metabolizmie lipidów i transporcie kwasów tłuszczowych (268). Deregulacja SLC27A2, choć niedostatecznie zgłębniona jak dotąd w raku nerki, została powiązana z progresją nowotworu i przerzutami w kilku typach nowotworów. M.in. wykazano, że nadekspresja SLC27A2 jest związana ze zwiększonym wychwytem kwasów tłuszczowych, zwiększonym wzrostem raka piersi i przerzutami (269). Stwierdzono także nadekspresję SLC27A2 w niedrobnokomórkowym raku płuc, która jest związana ze zwiększonym metabolizmem lipidów i wzrostem NSCLC (270).

Otrzymane w pracy wyniki wskazują jednak na inną regulację macierzystości w CCRCC w porównaniu z omówionymi pokrótce badaniami nad rolą SLC27A2 w nowotworach. Wykazano, że w przypadku próbek ze zwiększonym charakterem macierzystym, a więc z większymi wartościami PROTsi dochodzi do zmniejszenia ekspresji mRNA i białka, zatem wysoka ekspresja SLC27A2 na poziomie białka wiąże się z mniej macierzystym i agresywnym fenotypem CCRCC. Analiza korelacji ekspresji SLC27A2 mierzonej za pomocą IHC potwierdziła związek zmniejszonej ekspresji SLC27A2 z występowaniem przerzutów u pacjentów z pierwotnym CCRCC, dowodząc charakteru macierzystości SLC27A2 przy jego zmniejszonej ekspresji. Ponadto, wysokie wartości PROTsi korelowały ze zwiększoną ekspresją miRNA przy jednoczesnym braku znaczącej korelacji z CNV i metylacją DNA, wskazując na potencjalną rolę ekspresji miRNA w regulacji macierzystości SLC27A2. Interpretacja wszystkich wyników

dotyczących związku macierzystości z ekspresją białka SLC27A2 dostarcza zatem dowodów na to, że SLC27A2 nie tylko wykazuje wartość prognostyczną w CCRCC, ale także jest kandydatem na cel lekowy w terapii przeciwko CCRCC.

Co ciekawe, badanie przeprowadzone przez Xu i wsp. wspiera wnioski przedstawione w niniejszej pracy, zwracając szczególną uwagę na związek SLC27A2 w EMT, procesie ściśle związanym z macierzystością. W badaniu Xu i wsp. dowiedziono, że ekspresja SLC27A2 była znacząco obniżona w próbkach klinicznych CCRCC i liniach komórkowych raka nerki, przewidując niekorzystne rokowanie. W badaniu tym stwierdzono, że zwiększona regulacja ekspresji SLC27A2 może znacząco hamować proliferację, migrację i inwazję linii komórkowych raka nerki. SLC27A2 może również wpływać na szlak sygnałowy EMT, związany z progresją i przerzutami raka nerki. Pod względem mechanizmu, SLC27A2 może dodatkowo hamować EMT poprzez negatywną regulację CDK3 sugerując, że funkcjonalne hamowanie osi SLC27A2-CDK3-EMT stanowi atrakcyjny cel terapeutyczny w przypadku przerzutów CCRCC (271).

Białko UCHL1 jest enzymem deubikwitynującym, który odgrywa różne role biologiczne w procesach komórkowych. UCHL1 bierze udział w przetwarzaniu i recyklingu ubikwityny, reguluje stabilność białek poprzez modulowanie ich statusu ubikwitynacji, a także jest zaangażowane w regulację rozwoju neuronów, funkcji synaptycznych i przeżycia neuronów (272).

Istnieje wiele dyskusji na temat roli UCHL1 w nowotworach, z doniesieniami sugerującymi rolę supresorową bądź onkogenną. Wykazano, że UCHL1 ma charakter supresorowy i jego ekspresja regulowana w dół (utrata ekspresji) wiąże się z progresją nowotworu i złym rokowaniem w przypadku raka wątroby (273), raka piersi (274), raka prostaty (275) i raka przetyku (276).

I odwrotnie, UCHL1 jest również zaangażowany w promowanie wzrostu guza i agresywności w pewnych kontekstach. Może przyczyniać się do progresji raka poprzez modulowanie stabilności białek onkogennych lub zakłócanie procesów komórkowych zaangażowanych w supresję guza. Rolę onkogenną związaną ze zwiększoną regulacją UCHL1 w górę zaraportowano w raku piersi ER (-) i raku piersi HER2(+) (277).

Ponadto, w najnowszym badaniu CPTAC w kohorcie zawierającej ponad 300 próbek CCRCC dowiedziono, że podwyższona ekspresja UCHL1 na poziomie mRNA i białka, mierzona za pomocą LC-MS/MS, a następnie potwierdzona przez analizę IHC,

jest biomarkerem dla guzów CCRCC o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (G3 i G4) z mutacją *BAP1*, niestabilnością genomową lub zwiększoną hipermetylacją guza, co może mieć wpływ na postępowanie kliniczne i terapeutyczne u tych pacjentów (30).

Zgodnie z wynikami najnowszego badania CPTAC przeprowadzonego przez Li i wsp., w którym badano ekspresję UCHL1 w CCRCC, w niniejszej pracy również zaobserwowano podobne trendy. Jednakże, praca ta koncentruje się w szczególności na kontekście macierzystości nowotworów. Podczas gdy w badaniu CPTAC badano ekspresję UCHL1 w odniesieniu do różnych cech molekularnych i histologicznych, w tej pracy zbadano związek między UCHL1 a macierzystością. Wykazano, że wysokie wartości PROTsi, które wskazują na zwiększoną macierzystość guza, były związane z podwyższoną ekspresją mRNA i białka UCHL1, a także delecjami i hipermetylacją. Odkrycia te sugerują związek między ekspresją UCHL1, macierzystością guza i leżącymi u jego podstaw zmianami genetycznymi i epigenetycznymi w CCRCC oraz podkreślają rolę UCHL1 jako celu lekowego w terapii przeciwnowotworowej. Wyniki te stanowią punkt wyjściowy do dalszych testów funkcjonalnych z wykorzystaniem inhibitorów UCHL1, np. inhibitora UCHL1 LDN-57444, który z powodzeniem spowodował zatrzymanie progresji zaawansowanego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej czy też właśnie CCCC (30,278).

Walidacja IHC potwierdziła także wartość prognostyczną UCHL1 jako markera wskazującego progresję CCRCC, wskazując na macierzysty charakter próbek nowotworowych z wysoką ekspresją UCHL1.

Chociaż UCHL1 nie może być uważany za konwencjonalny marker macierzystości, jego ekspresja w określonych populacjach komórek macierzystych, w tym neuronalnych komórkach macierzystych i spermatogonialnych komórkach macierzystych oraz w komórkach rozrodczych podczas wczesnego rozwoju embrionalnego, sugeruje potencjalną rolę w biologii komórek macierzystych (279–281). Powyżej przytoczone badania wraz z wynikami uzyskanymi w pracy podkreślają rolę UCHL1 w ścieżkach związanych z macierzystością i utrzymywaniu fenotypu macierzystości nowotworów.

Żeby odpowiedzieć na bardzo ciekawe pytanie badawcze, czy znane markery macierzystości, niewytypowane w wyniku analiz opartych na ekspresji białek wykazują charakter macierzysty na poziomie białka i posiadają znaczenie kliniczne, analizie IHC poddano również białka REX1 i SOX2. Dodatkowo, choć rola czynników

transkrypcyjnych REX1 i SOX2 jako markerów macierzystości jest znana (282), to na poziomie białka nie została odnotowana w HNSCC, stąd też pojawiło się duże zainteresowanie walidacją IHC właśnie tych markerów białkowych.

Jak wykazano, nie zaobserwowano związku wysokiej ekspresji REX1 i SOX2 mierzonej na poziomie białek za pomocą IHC z wartością prognostyczną w HNSCC. Choć zauważyć można było pewien trend wskazujący na pozytywną korelację między wysoką ekspresją REX1 i SOX2 a krótszym czasem wolnym od progresji, czyli w przypadku kohorty walidacyjnej HNSCC - wznową, wyniki te nie uzyskały odpowiedniej wartości istotności statystycznej pozwalającej na wyprowadzenie w pełni rzetelnych wniosków. Rozważając nad prawdopodobnymi czynnikami odpowiedzialnymi za niepowodzenie w wykazaniu wartości prognostycznej białek REX1 i SOX2, można wskazać ich szczególną biologię. REX1 i SOX2 znane są przede wszystkim jako czynniki transkrypcyjne, a więc silnie zaangażowane w procesy molekularne odbywające się na poziomie RNA. Ponadto, prawdopodobnie dlatego, że do ekspresji REX1 i SOX2 dochodzi głównie podczas transkrypcji, a więc podczas syntezy RNA, ich ekspresja nie została wykryta za pomocą LC-MS/MS. Dywagując dalej, brak detekcji białek przy użyciu LC-MS/MS, czyli techniki powszechnie stosowanej do analizy białek, można przypisać specyficznemu momentowi i naturze ekspresji REX1 i SOX2, która jest przede wszystkim związana z procesami na poziomie RNA.

Co więcej, analiza preparatów IHC pozwoliła na obserwację dość nietypowego wzoru ekspresji REX1, podając w wątpliwość zarówno samo przeprowadzenie procesu IHC pod kątem technicznym, jak i aktualną wiedzę o biologii REX1. Pojawienie się ekspresji REX1 zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie podczas barwienia IHC z użyciem przeciwciała przeciwko REX1 może mieć kilka możliwych wyjaśnień. Jak wskazują jeszcze nieopublikowane dane (manuskrypt w recenzji), przeprowadzanie analiz immunohistochemicznych z użyciem komercyjnych przeciwciał naukowych stanowi duże wyzwanie m.in. ze względu na optymalizację i specyfikę używanych przeciwciał, które nie są przeciwciałami odpowiednio zwalidowanymi. Ponadto, gen *REX1* posiada trzy transkrypty (według bazy danych Ensembl, <https://www.ensembl.org>) (283), co wskazuje, że gen kodujący białko REX1 może generować wiele wariantów mRNA poprzez alternatywny splicing. Alternatywny splicing to proces, w którym różne kombinacje eksonów są wybierane lub wykluczane podczas dojrzewania mRNA, co prowadzi do produkcji różnych izoform mRNA. Izofomy te mogą prowadzić do powstania białek o różnych właściwościach funkcjonalnych lub lokalizacji komórkowej (284). Dodatkowo,

modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja, acetylacja lub metylacja, mogą wpływać na lokalizację białek (285). Modyfikacje te mogą zmieniać dystrybucję komórkową REX1, umożliwiając mu przemieszczanie się między jądrem a cytoplazmą. Obecność specyficznych modyfikacji potranslacyjnych w komórkach HNSCC może zatem prowadzić do obserwowanego wzorca lokalizacji. Jak podkreślają Wang i Li, komórki nowotworowe mogą wykazywać nieprawidłową lokalizację białek z powodu rozregulowania procesów komórkowych. Rozregulowanie mechanizmów transportu białek, zmiany w szlakach sygnałowych lub mutacje genetyczne mogą powodować nieprawidłową lokalizację białek z ich typowych przedziałów (286). Możliwe, że komórki HNSCC wykazują zmiany, które prowadzą do nietypowej dystrybucji REX1, a które nie zostały odkryte w niniejszej pracy, a zatem stanowią niezwykle ciekawy materiał do dalszych badań.

Walidacja IHC białek w kohorcie walidacyjnej CCRCC potwierdziła rolę PROTsi, będącego narzędziem do selekcji białek o potencjale predykcyjnym. Różne wzorce lokalizacji tych białek dostarczają cennych informacji na temat ich dystrybucji subkomórkowej, co może mieć związek z ich funkcjonalną rolą w procesach związanych z macierzystością i ułatwić projektowanie leków celujących w hamowanie macierzystości tych białek. Ponadto, wyniki badań IHC przyczyniają się do lepszego zrozumienia charakterystyki molekularnej CCRCC, wspierając potencjalną użyteczność tych markerów białkowych jako celów diagnostycznych, prognostycznych lub terapeutycznych w tych konkretnych typach nowotworów. W dodatku, analiza IHC z użyciem przeciwciał przeciwko białkom REX1 i SOX2 dostarczyła dowodów na to, że proteomika nie jest konkurencyjną dziedziną w biologii w zestawieniu z genomiką, lecz równoważącą dyscypliną, wzajemnie uzupełniającą się z nią. Dlatego też, rozwój badań łączących proteomikę z genomiką, czyli badań proteogenomicznych stanowi klucz do odszyfrowania mechanizmów odpowiedzialnych za nowotworzenie i progresję nowotworów, a w konsekwencji, do wynalezienia skutecznych leków i terapii przeciwnowotworowych.

Jak wykazano powyżej, identyfikacja markerów białkowych za pomocą PROTsi umożliwia wskazanie białek predykcyjnych, ale też jednocześnie celów lekowych. Zidentyfikowane białka związane z macierzystością mogą być nie tylko bezpośrednimi celami dla leków, ale także umożliwiają odnalezienie specyficznych perturbagenów o potencjale hamującym macierzystość.

W oparciu o interakcje między białkami i celami lekowymi biorącymi udział w tych

samych ścieżkach sygnałowych oraz wzorem ekspresji zidentyfikowanych białek o cechach macierzystych, odkryto potencjalne inhibitory macierzystości wraz z ich specyficznymi celami w ścieżkach sygnalizacyjnych dzielonych z białkami związanymi z macierzystością. Zastosowane podejście CMap jest jedną z metod repozycjonowania leków bazujących na danych pochodzących z badań ekspresji genów i białek w różnych stanach chorobowych, w tym w nowotworach (206,287). Repozycjonowanie leków to alternatywna strategia mająca na celu znalezienie nowych zastosowań dla istniejących już leków. Proces repozycjonowania leków polega na wykorzystaniu istniejącego leku do leczenia choroby innej niż jego pierwotne lub początkowe przeznaczenie (288). W przypadku leków repozycjonowanych, całkowity koszt i czas związany z wykorzystaniem ich do leczenia innych chorób jest znacznie niższy niż w przypadku opracowywania nowego leku (289). Analiza podobieństwa profili molekularnych między danymi z bazy a danymi o ekspresji białek związanymi z macierzystością umożliwiła odszukanie związków, które mogą hamować macierzysty fenotyp nowotworowy. Dalsze, niezwykle interesujące badania funkcjonalne *in vitro* mogłyby obejmować podanie wybranych inhibitorów do komórek modeli nowotworowych takich jak np. ludzkie organoidy. Organoidy są trójwymiarowymi strukturami pochodzącymi z komórek macierzystych lub komórek progenitorowych specyficznych dla narządów, a ich hodowla przebiega w warunkach naśladujących środowisko *in vivo*. Organoidy mogą samoorganizować się i wykazywać złożoną organizację komórkową i funkcjonalność podobną do narządu, z którego pochodzą, takich jak jelita, wątroba, nerki, mózg i inne. Chociaż organoidy są hodowane *in vitro*, ich celem jest naśladowanie składu komórkowego i zachowania odpowiedniego organu *in vivo* (290,291). Sprawia to, że organoidy są cennym narzędziem do badania rozwoju narządów, mechanizmów chorobowych, w tym związanych z macierzystością nowotworów i spersonalizowanego podejścia terapeutycznego.

Rozdział VI

Wnioski

Wykorzystanie wskaźnika macierzystości opartego na ekspresji białek (PROTsi) stanowi efektywną strategię do oceny podobieństwa komórek nowotworowych do komórek macierzystych. Zdolność do ilościowego określenia cech macierzystych w komórkach nowotworowych przez PROTsi pozwala na głębsze zrozumienie biologii nowotworów i przybliżyć określenie mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworów i odpowiedzi na leczenie.

Integracja danych proteomicznych, w tym ekspresji białek, fosforylacji i interakcji białko-białko z PROTsi odzwierciedla skomplikowaną interakcję białek zaangażowanych w regulację macierzystości. Podejście to pozwala na bardziej precyzyjną charakterystykę stanu macierzystości w komórkach nowotworowych, umożliwiając lepszą prognozę, stratyfikację pacjentów i identyfikację celów terapeutycznych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że agresywne podtypy molekularne, takie jak podstawnokomórkowy podtyp BR czy surowiczy podtyp UCEC mają najwyższe wartości PROTsi, co potwierdza ich wysoce agresywny i macierzysty charakter.

W wyniku analizy korelacji PROTsi z fosforylacją białek, zidentyfikowano związane z macierzystością fosforylowane białka wraz z miejscami ich fosforylacji. Zidentyfikowane miejsca fosforylacji w białkach pozytywnie skorelowanych z macierzystością stanowią potencjalne cele dla interwencji terapeutycznych. Celowanie w te miejsca fosforylacji może prowadzić do osłabienia cech związanych z macierzystością nowotworu, które są związane z agresywnością guza i opornością na terapię. Ponadto, zrozumienie związku między fosforylacją białek a macierzystością może przyczynić się do opracowania spersonalizowanych strategii leczenia.

Za pomocą analiz proteogenomicznych przeprowadzonych dla wielu typów nowotworów, zbadano korelację między wartościami PROTsi a różnymi cechami molekularnymi. Przeprowadzone analizy ujawniły różne wzorce i odchylenia od oczekiwanych powiązań między wartościami PROTsi a czynnikami molekularnymi. W większości przypadków wysokie wartości PROTsi były pozytywnie skorelowane z podwyższonymi poziomami ekspresji białek i mRNA, obniżoną ekspresją miRNA, hipometylacją DNA i zwiększoną liczbą zmian liczby kopii poprzez np. amplifikacje. Tendencje te zaobserwowano w różnych próbkach nowotworowych we wszystkich

badanych typach nowotworów. Jednakże zaobserwowano również interesujące odchylenia od tych wzorców, sugerując obecność unikalnych mechanizmów regulacyjnych w określonych typach nowotworów.

Kategoryzacja białek w oparciu o ich związek z macierzystością zidentyfikowany w jednym lub wielu typach nowotworów zapewnia kompleksowy obraz molekularnego krajobrazu macierzystości w nowotworach. Oferuje ona cenne informacje dla lepszego zrozumienia wspólnych i unikalnych mechanizmów leżących u podstaw macierzystości nowotworów, identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych i nadania kierunku badaniom w dziedzinie biologii i leczenia nowotworów.

Analiza IHC z wykorzystaniem białek związanych z macierzystością (HEATR1, SNRNP200, SLC27A2, UHRF1 i UCHL1) w pierwotnych guzach CCRCC potwierdziła, że PROTsi jest także rzetelnym narzędziem do selekcji białkowych markerów predykcyjnych.

Analiza IHC z użyciem przeciwciał anti-REX1 i anti-SOX2 dostarczyła dowodów na to, że proteomika nie jest konkurencyjną dziedziną w biologii, lecz równoważącą dyscypliną, wzajemnie dopełniającą się z genomiką. Dlatego też, rozwój badań łączących proteomikę z genomiką, czyli badań proteogenomicznych stanowi klucz do odszyfrowania mechanizmów odpowiedzialnych za nowotworzenie i progresję nowotworów, a w konsekwencji, do wynalezienia skutecznych leków i terapii przeciwnowotworowych.

Identyfikacja markerów białkowych za pomocą PROTsi umożliwia wskazanie białek predykcyjnych, ale też jednocześnie celów lekowych. Zidentyfikowane białka związane z macierzystością mogą być nie tylko bezpośrednimi celami dla leków, ale także umożliwiają odnalezienie specyficznych perturbagenów o potencjale hamującym macierzystość.

Rozdział VII

Ograniczenia badania

W momencie przygotowywania rozprawy doktorskiej, ilość próbek zakwalifikowanych do kompleksowych badań proteogenomicznych była ograniczona (łącznie niemal 1500 próbek z rozpoznaniem histologicznym jednego z 12 typów nowotworów). Choć nadal jest to odpowiednio duża kohorta w kontekście badań wielkoskalowych, posiadała ona pewne ograniczenia. Przede wszystkim, dla próbek nowotworów najwcześniej przebadanych przez CPTAC, nie udostępniono wszystkich, w pełni zweryfikowanych i opracowanych danych dla analiz np. zmian liczby kopii czy ekspresji miRNA, stąd też dalsza część rozważań skupia się jedynie na siedmiu typach nowotworów, a nie na wszystkich dwunastu. Ponadto, pomimo staranności w doborze pacjentów do kohort CPTAC, zdecydowanie większą część pacjentów reprezentujących każdy z analizowanych typów nowotworów stanowili chorzy rasy kaukaskiej (oprócz jednolitej pod tym kątem kohorty EOGC), a jak wynika z wieloletnich badań nad różnicami molekularnymi pomiędzy rasami, idealna kohorta do badań (zwłaszcza proteogenomicznych) zawiera taką samą liczbę uczestników każdej rasy.

Bibliografia

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Krajowy Rejestr Nowotworów, <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>, data wejścia: 17.04.2023 r. [Internet]. [cited 2023 Apr 17]. Available from: <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>
3. Rudnick PA, Markey SP, Roth J, Mirokhin Y, Yan X, Tchekhovskoi DV, et al. A description of the clinical proteomic tumor analysis consortium (CPTAC) common data analysis pipeline. *J Proteome Res*. 2016 Mar 4;15(3):1023–32.
4. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011 Jun 29;474(7353):609–15.
5. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
6. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330–7.
7. Rodriguez H, Pennington SR. Revolutionizing Precision Oncology through Collaborative Proteogenomics and Data Sharing. *Cell*. 2018 Apr 19;173(3):535–9.
8. Ellis MJ, Gillette M, Carr SA, Paulovich AG, Smith RD, Rodland KK, et al. Connecting genomic alterations to cancer biology with proteomics: the NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. *Cancer Discov*. 2013 Oct;3(10):1108–12.
9. Bradshaw RA, Hondermarck H, Rodriguez H. Cancer proteomics and the elusive diagnostic biomarkers. *Proteomics*. 2019 Nov;19(21–22):e1800445.
10. Lindoso RS, Kasai-Brunswick TH, Monnerat Cahli G, Collino F, Bastos Carvalho A, Campos de Carvalho AC, et al. Proteomics in the world of induced pluripotent stem cells. *Cells*. 2019 Jul 11;8(7).
11. Suran M. After the Genome-A Brief History of Proteomics. *JAMA*. 2022 Sep 27;328(12):1168–9.
12. Schirle M, Bantscheff M, Kuster B. Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery. *Chem Biol*. 2012 Jan 27;19(1):72–84.
13. Chen C, Hou J, Tanner JJ, Cheng J. Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 20;21(8).
14. Meissner F, Geddes-McAlister J, Mann M, Bantscheff M. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Sep;21(9):637–54.

15. Christopher JA, Stadler C, Martin CE, Morgenstern M, Pan Y, Betsinger CN, et al. Subcellular proteomics. *Nat Rev Methods Primers*. 2021 Apr 29;1.
16. Müller JB, Geyer PE, Colaço AR, Treit PV, Strauss MT, Oroshi M, et al. The proteome landscape of the kingdoms of life. *Nature*. 2020 Jun 17;582(7813):592–6.
17. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic analysis in the age of human genome sequencing. *Cell*. 2019 Mar 21;177(1):70–84.
18. Dupree EJ, Jayathirtha M, Yorkey H, Mihasan M, Petre BA, Darie CC. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. *Proteomes*. 2020 Jul 6;8(3).
19. Kosti I, Jain N, Aran D, Butte AJ, Sirota M. Cross-tissue Analysis of Gene and Protein Expression in Normal and Cancer Tissues. *Sci Rep*. 2016 May 4;6:24799.
20. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet*. 2020 Oct;21(10):630–44.
21. Wang S, Osgood AO, Chatterjee A. Uncovering post-translational modification-associated protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 2022 Jun;74:102352.
22. Schubert OT, Röst HL, Collins BC, Rosenberger G, Aebersold R. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc*. 2017 Jul;12(7):1289–94.
23. Modell AE, Blosser SL, Arora PS. Systematic Targeting of Protein-Protein Interactions. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Aug;37(8):702–13.
24. Wang X-W, Madeddu L, Spirohn K, Martini L, Fazzone A, Becchetti L, et al. Assessment of community efforts to advance network-based prediction of protein-protein interactions. *Nat Commun*. 2023 Mar 22;14(1):1582.
25. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GNS. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics*. 2014 Feb 17;2014:147648.
26. Gulfidan G, Turanli B, Beklen H, Sinha R, Arga KY. Pan-cancer mapping of differential protein-protein interactions. *Sci Rep*. 2020 Feb 24;10(1):3272.
27. Doll S, Gnad F, Mann M. The Case for Proteomics and Phospho-Proteomics in Personalized Cancer Medicine. *Proteomics Clin Appl*. 2019 Mar;13(2):e1800113.
28. Hanna-Sawires RG, Schiphuis JH, Wuhrer M, Vasen HFA, van Leerdam ME, Bonsing BA, et al. Clinical perspective on proteomic and glycomic biomarkers for diagnosis, prognosis, and prediction of pancreatic cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 6;22(5).
29. Qiao X-W, Jiang J, Pang X, Huang M-C, Tang Y-J, Liang X-H, et al. The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front*

- Immunol. 2020 Sep 18;11:1721.
30. Li Y, Lih T-SM, Dhanasekaran SM, Mannan R, Chen L, Cieslik M, et al. Histopathologic and proteogenomic heterogeneity reveals features of clear cell renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer Cell*. 2023 Jan 9;41(1):139-163.e17.
 31. Raghunathan R, Turajane K, Wong LC. Biomarkers in neurodegenerative diseases: proteomics spotlight on ALS and parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 18;23(16).
 32. Vinaiphat A, Sze SK. Proteomics for comprehensive characterization of extracellular vesicles in neurodegenerative disease. *Exp Neurol*. 2022 Sep;355:114149.
 33. Joshi A, Rienks M, Theofilatos K, Mayr M. Systems biology in cardiovascular disease: a multiomics approach. *Nat Rev Cardiol*. 2021 May;18(5):313–30.
 34. Nicholas SB. Use of urinary proteomics in diagnosis and monitoring of diabetic kidney disease. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020 Apr;8(4):261–2.
 35. Bennis HJ, Wincott CJ, Tate EW, Child MA. Activity- and reactivity-based proteomics: Recent technological advances and applications in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*. 2021 Feb;60:20–9.
 36. Jiang Y, Sun A, Zhao Y, Ying W, Sun H, Yang X, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*. 2019 Mar;567(7747):257–61.
 37. Krug K, Jaehnig EJ, Satpathy S, Blumenberg L, Karpova A, Anurag M, et al. Proteogenomic landscape of breast cancer tumorigenesis and targeted therapy. *Cell*. 2020 Nov 25;183(5):1436-1456.e31.
 38. Gillette MA, Satpathy S, Cao S, Dhanasekaran SM, Vasaikar SV, Krug K, et al. Proteogenomic characterization reveals therapeutic vulnerabilities in lung adenocarcinoma. *Cell*. 2020 Jul 9;182(1):200-225.e35.
 39. Joshi SK, Nechiporuk T, Bottomly D, Piehowski PD, Reisz JA, Pittsenbarger J, et al. The AML microenvironment catalyzes a stepwise evolution to gilteritinib resistance. *Cancer Cell*. 2021 Jul 12;39(7):999-1014.e8.
 40. Clark DJ, Dhanasekaran SM, Petralia F, Pan J, Song X, Hu Y, et al. Integrated proteogenomic characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Cell*. 2019 Oct 31;179(4):964-983.e31.
 41. Dou Y, Kawaler EA, Cui Zhou D, Gritsenko MA, Huang C, Blumenberg L, et al. Proteogenomic characterization of endometrial carcinoma. *Cell*. 2020 Feb 20;180(4):729-748.e26.
 42. Wang L-B, Karpova A, Gritsenko MA, Kyle JE, Cao S, Li Y, et al. Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma. *Cancer Cell*. 2021 Apr 12;39(4):509-528.e20.

43. Petralia F, Tignor N, Reva B, Koptyra M, Chowdhury S, Rykunov D, et al. Integrated Proteogenomic Characterization across Major Histological Types of Pediatric Brain Cancer. *Cell*. 2020 Dec 23;183(7):1962-1985.e31.
44. Huang C, Chen L, Savage SR, Egeuz RV, Dou Y, Li Y, et al. Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2021 Mar 8;39(3):361-379.e16.
45. Satpathy S, Krug K, Jean Beltran PM, Savage SR, Petralia F, Kumar-Sinha C, et al. A proteogenomic portrait of lung squamous cell carcinoma. *Cell*. 2021 Aug 5;184(16):4348-4371.e40.
46. Vasaikar S, Huang C, Wang X, Petyuk VA, Savage SR, Wen B, et al. Proteogenomic analysis of human colon cancer reveals new therapeutic opportunities. *Cell*. 2019 May 2;177(4):1035-1049.e19.
47. Hu Y, Pan J, Shah P, Ao M, Thomas SN, Liu Y, et al. Integrated Proteomic and Glycoproteomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Cell Rep*. 2020 Oct 20;33(3):108276.
48. Cao L, Huang C, Cui Zhou D, Hu Y, Lih TM, Savage SR, et al. Proteogenomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell*. 2021 Sep 16;184(19):5031-5052.e26.
49. Mun D-G, Bhin J, Kim S, Kim H, Jung JH, Jung Y, et al. Proteogenomic Characterization of Human Early-Onset Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 2019 Jan 14;35(1):111-124.e10.
50. Gao Q, Zhu H, Dong L, Shi W, Chen R, Song Z, et al. Integrated Proteogenomic Characterization of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2019 Oct 3;179(2):561-577.e22.
51. Malta TM, Sokolov A, Gentles AJ, Burzykowski T, Poisson L, Weinstein JN, et al. Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):338-354.e15.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
53. Hanahan D. Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46.
54. Sabatier P, Beusch CM, Saei AA, Aoun M, Moruzzi N, Coelho A, et al. An integrative proteomics method identifies a regulator of translation during stem cell maintenance and differentiation. *Nat Commun*. 2021 Nov 12;12(1):6558.
55. Saygin C, Matei D, Majeti R, Reizes O, Lathia JD. Targeting cancer stemness in the clinic: from hype to hope. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan 3;24(1):25-40.
56. Wu J, Izpisua Belmonte JC. Stem cells: A renaissance in human biology research. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1572-85.

57. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol.* 2016 Jul 19;2016:6940283.
58. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells.* 2019 Aug 13;8(8).
59. Uman S, Dhand A, Burdick JA. Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *J Appl Polym Sci.* 2020 Jul 5;137(25):48668.
60. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):39–49.
61. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2019 Sep 2;21(9):1060–7.
62. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008 May 22;453(7194):519–23.
63. Worku MG. Pluripotent and multipotent stem cells and current therapeutic applications: review. *Stem Cells Cloning.* 2021 Apr 12;14:3–7.
64. Cho IJ, Lui PP, Obajdin J, Riccio F, Stroukov W, Willis TL, et al. Mechanisms, hallmarks, and implications of stem cell quiescence. *Stem Cell Reports.* 2019 Jun 11;12(6):1190–200.
65. van Velthoven CTJ, Rando TA. Stem cell quiescence: dynamism, restraint, and cellular idling. *Cell Stem Cell.* 2019 Feb 7;24(2):213–25.
66. Bayik D, Lathia JD. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2021 Aug;21(8):526–36.
67. Shimizu D, Taniue K, Matsui Y, Haeno H, Araki H, Miura F, et al. Pan-cancer methylome analysis for cancer diagnosis and classification of cancer cell of origin. *Cancer Gene Ther.* 2022 May;29(5):428–36.
68. Polak P, Karlić R, Koren A, Thurman R, Sandstrom R, Lawrence M, et al. Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer. *Nature.* 2015 Feb 19;518(7539):360–4.
69. Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol.* 2016 Apr;18(4):349–55.
70. Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol.* 2020 Feb;235(2):790–803.
71. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.* 2018 Mar 6;25(1):20.
72. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresh DA. Integrins and cancer:

- regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* 2015 Apr;25(4):234–40.
73. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
 74. Aramini B, Masciale V, Grisendi G, Bertolini F, Maur M, Guaitoli G, et al. Dissecting tumor growth: the role of cancer stem cells in drug resistance and recurrence. *Cancers (Basel).* 2022 Feb 15;14(4).
 75. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017 Oct 6;23(10):1124–34.
 76. Zhong Z, Yu J, Virshup DM, Madan B. Wnts and the hallmarks of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Sep;39(3):625–45.
 77. Makena MR, Ranjan A, Thirumala V, Reddy AP. Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Apr 1;1866(4):165339.
 78. Sokolov A, Paull EO, Stuart JM. One-class detection of cell states in tumor subtypes. *Pac Symp Biocomput.* 2016;21:405–16.
 79. Salomonis N, Dexheimer PJ, Omberg L, Schroll R, Bush S, Huo J, et al. Integrated Genomic Analysis of Diverse Induced Pluripotent Stem Cells from the Progenitor Cell Biology Consortium. *Stem Cell Reports.* 2016 Jul 12;7(1):110–25.
 80. Daily K, Ho Sui SJ, Schriml LM, Dexheimer PJ, Salomonis N, Schroll R, et al. Molecular, phenotypic, and sample-associated data to describe pluripotent stem cell lines and derivatives. *Sci Data.* 2017 Mar 28;4:170030.
 81. Fumagalli C, Barberis M. Breast Cancer Heterogeneity. *Diagnostics (Basel).* 2021 Aug 27;11(9).
 82. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
 83. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
 84. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist.* 2006 Sep;11(8):868–77.
 85. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, 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.* 2011 Aug;22(8):1736–47.

86. Sharma JD, Khanna S, Ramchandani S, Kakoti LM, Baruah A, Mamidala V. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Carcinoma and Its Comparison between Two Different Age Groups: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center of Northeast India. *South Asian J Cancer*. 2021 Dec 31;10(4):220–4.
87. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of breast cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022.
88. Cava C, Armaos A, Lang B, Tartaglia GG, Castiglioni I. Identification of long non-coding RNAs and RNA binding proteins in breast cancer subtypes. *Sci Rep*. 2022 Jan 13;12(1):693.
89. Loibl S, Treue D, Budczies J, Weber K, Stenzinger A, Schmitt WD, et al. Mutational diversity and therapy response in breast cancer: A sequencing analysis in the neoadjuvant geparsepto trial. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul 1;25(13):3986–95.
90. Fumagalli C, Ranghiero A, Gandini S, Corso F, Taormina S, De Camilli E, et al. Inter-tumor genomic heterogeneity of breast cancers: comprehensive genomic profile of primary early breast cancers and relapses. *Breast Cancer Res*. 2020 Oct 15;22(1):107.
91. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet*. 2017 Jun 17;389(10087):2430–42.
92. cBioPortal for Cancer Genomics [Internet]. [cited 2023 Apr 26]. Available from: <http://www.cbioportal.org/>
93. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 9;3:17009.
94. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan 12;71(1):7–33.
95. Motzer RJ, Jonasch E, Boyle S, Carlo MI, Manley B, Agarwal N, et al. NCCN guidelines insights: kidney cancer, version 1.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020 Sep;18(9):1160–70.
96. Mori K, Mostafaei H, Miura N, Karakiewicz PI, Luzzago S, Schmidinger M, et al. Systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma in the first-line setting: a systematic review and network meta-analysis. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Feb;70(2):265–73.
97. Atkins MB, Tannir NM. Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2018 Nov;70:127–37.
98. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017 Jan 26;376(4):354–66.

99. Powles T, Plimack ER, Soulières D, Waddell T, Stus V, Gafanov R, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Dec;21(12):1563–73.
100. Sanchez DJ, Simon MC. Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018 Aug;1870(1):23–31.
101. Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. The cancer genome atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma. *Cell Rep.* 2018 Apr 3;23(1):313-326.e5.
102. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, et al. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol.* 2013 Feb;14(2):159–67.
103. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013 Jul 4;499(7456):43–9.
104. Koskas M, Amant F, Mirza MR, Creutzberg CL. Cancer of the corpus uteri: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet.* 2021 Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):45–60.
105. Wortman BG, Nout RA, Bosse T, Creutzberg CL. Selecting adjuvant treatment for endometrial carcinoma using molecular risk factors. *Curr Oncol Rep.* 2019 Jul 31;21(9):83.
106. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013 May 2;497(7447):67–73.
107. Alexa M, Hasenburg A, Battista MJ. The TCGA molecular classification of endometrial cancer and its possible impact on adjuvant treatment decisions. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 23;13(6).
108. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2021 Jan;31(1):12–39.
109. Piątek S, Szewczyk G, Jalinik K, Sobiczewski P, Bidziński M. Postępowanie w raku trzonu macicy z uwzględnieniem klasyfikacji molekularnej — zalecenia ESGO/ESTRO/ESP 2020 | Piątek | Ginekologia i Perinatologia Praktyczna. *Ginekologia i Perinatologia Praktyczna.* 2021;
110. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):538–49.
111. Kanderi T, Gupta V. Glioblastoma Multiforme. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.*

112. Taylor OG, Brzozowski JS, Skelding KA. Glioblastoma multiforme: an overview of emerging therapeutic targets. *Front Oncol.* 2019 Sep 26;9:963.
113. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987–96.
114. Perry JR, Laperriere N, O’Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16;376(11):1027–37.
115. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017 Dec 19;318(23):2306–16.
116. Guo X, Yang X, Wu J, Yang H, Li Y, Li J, et al. Tumor-Treating Fields in Glioblastomas: Past, Present, and Future. *Cancers (Basel).* 2022 Jul 28;14(15).
117. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current state of immunotherapy for treatment of glioblastoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2019 Feb 21;20(3):24.
118. Wang H, Zhou H, Xu J, Lu Y, Ji X, Yao Y, et al. Different T-cell subsets in glioblastoma multiforme and targeted immunotherapy. *Cancer Lett.* 2021 Jan 1;496:134–43.
119. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061–8.
120. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013 Oct 10;155(2):462–77.
121. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathol.* 2018 Nov;136(5):805–10.
122. Abedalthagafi M, Mobark N, Al-Rashed M, AlHarbi M. Epigenomics and immunotherapeutic advances in pediatric brain tumors. *NPJ Precis Oncol.* 2021 Apr 30;5(1):34.
123. Hwang EI, Sayour EJ, Flores CT, Grant G, Wechsler-Reya R, Hoang-Minh LB, et al. The current landscape of immunotherapy for pediatric brain tumors. *Nat Cancer.* 2022 Jan 20;3(1):11–24.
124. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2017 Jul;18(7):958–

- 71.
125. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*. 2017 Jun 12;31(6):737-754.e6.
 126. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803–20.
 127. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):576–82.
 128. Cramer JD, Burtneess B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Nov;16(11):669–83.
 129. Argiris A, Harrington KJ, Tahara M, Schulten J, Chomette P, Ferreira Castro A, et al. Evidence-Based Treatment Options in Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Front Oncol*. 2017 May 9;7:72.
 130. Goh HKC, Ng YH, Teo DTW. Minimally invasive surgery for head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2010 Mar;11(3):281–6.
 131. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov 26;6(1):92.
 132. Li Q, Tie Y, Alu A, Ma X, Shi H. Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Jan 16;8(1):31.
 133. Seiwert TY, Burtneess B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):956–65.
 134. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856–67.
 135. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567–78.
 136. Ferris RL, Haddad R, Even C, Tahara M, Dvorkin M, Ciuleanu TE, et al. Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Ann Oncol*. 2020 Jul;31(7):942–50.
 137. Vermorken JB, Trigo J, Hitt R, Koralewski P, Diaz-Rubio E, Rolland F, et al. Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and

toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):2171–7.

138. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong K-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014 Aug;14(8):535–46.
139. Myers DJ, Wallen JM. Lung Adenocarcinoma. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
140. Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer*. 2017 Jul 27;41(5):328–39.
141. Rios Velazquez E, Parmar C, Liu Y, Coroller TP, Cruz G, Stringfield O, et al. Somatic mutations drive distinct imaging phenotypes in lung cancer. *Cancer Res*. 2017 Jul 15;77(14):3922–30.
142. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, Wala J, Berger AH, Peadarallu CS, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2016 Jun;48(6):607–16.
143. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511):543–50.
144. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018 Jan 24;553(7689):446–54.
145. Hughes PE, Caenepeel S, Wu LC. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy combinations for the treatment of cancer. *Trends Immunol*. 2016 Jul;37(7):462–76.
146. Peters S, Kerr KM, Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC: A focus on pembrolizumab. *Cancer Treat Rev*. 2018 Jan;62:39–49.
147. Ruiz-Ceja KA, Chirino YI. Current FDA-approved treatments for non-small cell lung cancer and potential biomarkers for its detection. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jun;90:24–37.
148. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):299–311.
149. Matikas A, Mistriotis D, Georgoulas V, Kotsakis A. Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history of failures and a future of hope for a diverse entity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Feb;110:1–12.
150. Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the “undruggable” cancer targets. *Nat Rev Cancer*. 2017 Aug;17(8):502–8.
151. Rotow J, Bivona TG. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat Rev Cancer*. 2017 Oct 25;17(11):637–58.

152. Quintanal-Villalonga Á, Chan JM, Yu HA, Pe'er D, Sawyers CL, Sen T, et al. Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jun;17(6):360–71.
153. Xu J-Y, Zhang C, Wang X, Zhai L, Ma Y, Mao Y, et al. Integrative proteomic characterization of human lung adenocarcinoma. *Cell*. 2020 Jul 9;182(1):245-261.e17.
154. Saab S, Zalzale H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A, Kadara H. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. *Front Immunol*. 2020 Feb 11;11:159.
155. Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell*. 2022 Nov 14;40(11):1279–93.
156. Paik PK, Pillai RN, Lathan CS, Velasco SA, Papadimitrakopoulou V. New treatment options in advanced squamous cell lung cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019 Jan;39:e198–206.
157. Karachaliou N, Fernandez-Bruno M, Rosell R. Strategies for first-line immunotherapy in squamous cell lung cancer: are combinations a game changer? *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Sep;7(Suppl 3):S198–201.
158. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan 12;72(1):7–33.
159. Puckett Y, Garfield K. *Pancreatic Cancer*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
160. Hruban RH, Gaida MM, Thompson E, Hong S-M, Noë M, Brosens LA, et al. Why is pancreatic cancer so deadly? The pathologist's view. *J Pathol*. 2019 Jun;248(2):131–41.
161. Van Cutsem E, Tempero MA, Sigal D, Oh D-Y, Fazio N, Macarulla T, et al. Randomized Phase III Trial of Pegvorhialuronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2020 Sep 20;38(27):3185–94.
162. Hecht JR, Lonardi S, Bendell J, Sim H-W, Macarulla T, Lopez CD, et al. Randomized Phase III Study of FOLFOX Alone or With Pegilodecakin as Second-Line Therapy in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer That Progressed After Gemcitabine (SEQUOIA). *J Clin Oncol*. 2021 Apr 1;39(10):1108–18.
163. Tempero M, Oh DY, Tabernero J, Reni M, Van Cutsem E, Hendifar A, et al. Ibrutinib in combination with nab-paclitaxel and gemcitabine for first-line treatment of patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: phase III RESOLVE study. *Ann Oncol*. 2021 May;32(5):600–8.
164. Thompson ED, Roberts NJ, Wood LD, Eshleman JR, Goggins MG, Kern SE, et

- al. The genetics of ductal adenocarcinoma of the pancreas in the year 2020: dramatic progress, but far to go. *Mod Pathol*. 2020 Dec;33(12):2544–63.
165. Cancer Genome Atlas Research Network., Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2017 Aug 14;32(2):185-203.e13.
 166. Xie W, Sun H, Li X, Lin F, Wang Z, Wang X. Ovarian cancer: epigenetics, drug resistance, and progression. *Cancer Cell Int*. 2021 Aug 17;21(1):434.
 167. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jul;69(4):280–304.
 168. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*. 2012 Mar;460(3):237–49.
 169. Devaja O, Papadopoulos A, editors. *Ovarian Cancer: From Pathogenesis to Treatment*. 2018.
 170. Peres LC, Cushing-Haugen KL, Köbel M, Harris HR, Berchuck A, Rossing MA, et al. Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Jan 1;111(1):60–8.
 171. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. 2021 Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):61–85.
 172. Bowtell DD, Böhm S, Ahmed AA, Aspuria P-J, Bast RC, Beral V, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Nov;15(11):668–79.
 173. Garsed DW, Pandey A, Fereday S, Kennedy CJ, Takahashi K, Alsop K, et al. The genomic and immune landscape of long-term survivors of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Genet*. 2022 Dec 1;54(12):1853–64.
 174. Basta A, Bidziński M, Bieńkiewicz A, Blecharz P, Bodnar L, Jach R, et al. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka jajnika. *Current Gynecologic Oncology*. 2017;
 175. Yang J-Y, Yoshihara K, Tanaka K, Hatae M, Masuzaki H, Itamochi H, et al. Predicting time to ovarian carcinoma recurrence using protein markers. *J Clin Invest*. 2013 Sep;123(9):3740–50.
 176. Zhang H, Liu T, Zhang Z, Payne SH, Zhang B, McDermott JE, et al. Integrated Proteogenomic Characterization of Human High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell*. 2016 Jul 28;166(3):755–65.
 177. McDermott JE, Arshad OA, Petyuk VA, Fu Y, Gritsenko MA, Clauss TR, et al. Proteogenomic characterization of ovarian HGSC implicates mitotic kinases, replication stress in observed chromosomal instability. *Cell Rep Med*. 2020 Apr

- 21;1(1).
178. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 May;70(3):145–64.
 179. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen Y-J, Ciombor KK, et al. Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021 Mar 2;19(3):329–59.
 180. Lotfollahzadeh S, Recio-Boiles A, Cagir B. *Colon Cancer.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
 181. Paschke S, Jafarov S, Staib L, Kreuser E-D, Maulbecker-Armstrong C, Roitman M, et al. Are colon and rectal cancer two different tumor entities? A proposal to abandon the term colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 30;19(9).
 182. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):338–45.
 183. Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: A systems oncology approach. *Int J Mol Sci.* 2015 Jun 15;16(6):13610–32.
 184. Singh MP, Rai S, Pandey A, Singh NK, Srivastava S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis.* 2021 Mar;8(2):133–45.
 185. Frąckowiak M, Lewandowski T, Stelmasiak P. Podtypy molekularne raka jelita grubego jako potencjalny czynnik prognostyczny i predykcyjny przy wyborze optymalnej strategii leczenia. *Oncol Clin Pract.* 2020 Jan 10;15(6):320–5.
 186. Ten Hoorn S, de Back TR, Sommeijer DW, Vermeulen L. Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2022 Apr 11;114(4):503–16.
 187. Sawayama H, Miyamoto Y, Ogawa K, Yoshida N, Baba H. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Ann Gastroenterol Surg.* 2020 Sep;4(5):528–39.
 188. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet.* 2020 Aug 29;396(10251):635–48.
 189. Richter P, Wallner G, Zegarski W, Sierżęga M, Kołodziejczyk P, Nasierowska-Guttmejer A, et al. Polski konsensus diagnostyki i leczenia raka żołądka – aktualizacja 2022 | Richter | Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory. *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory.* 2022;
 190. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, et al. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond

- differently to chemotherapy. *Gastroenterology*. 2011 Aug;141(2):476–85, 485.e1.
191. Lei Z, Tan IB, Das K, Deng N, Zouridis H, Pattison S, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. 2013 Sep;145(3):554–65.
 192. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim K-M, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015 May;21(5):449–56.
 193. Cheong J-H, Yang H-K, Kim H, Kim WH, Kim Y-W, Kook M-C, et al. Predictive test for chemotherapy response in resectable gastric cancer: a multi-cohort, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2018 May;19(5):629–38.
 194. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202–9.
 195. Merchant SJ, Kim J, Choi AH, Sun V, Chao J, Nelson R. A rising trend in the incidence of advanced gastric cancer in young Hispanic men. *Gastric Cancer*. 2017 Mar;20(2):226–34.
 196. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 4;21(11).
 197. Skierucha M, Milne AN, Offerhaus GJA, Polkowski WP, Maciejewski R, Sitarz R. Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 28;22(8):2460–74.
 198. Li J. Gastric Cancer in Young Adults: A Different Clinical Entity from Carcinogenesis to Prognosis. *Gastroenterol Res Pract*. 2020 Mar 2;2020:9512707.
 199. Yuan X-Y, Zhang Y, Zhao X, Chen A, Liu P. IL-1 β , an important cytokine affecting *Helicobacter pylori*-mediated gastric carcinogenesis. *Microb Pathog*. 2023 Jan;174:105933.
 200. Carvalho R, Milne ANA, van Rees BP, Caspers E, Cirnes L, Figueiredo C, et al. Early-onset gastric carcinomas display molecular characteristics distinct from gastric carcinomas occurring at a later age. *J Pathol*. 2004 Sep;204(1):75–83.
 201. Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, Afzal V, Alasoo K, Ashford S, et al. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):370–5.
 202. Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, et al. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D418–27.
 203. Ochoa D, Hercules A, Carmona M, Suveges D, Baker J, Malangone C, et al. The next-generation Open Targets Platform: reimaged, redesigned, rebuilt. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D1353–9.

204. Thike AA, Chng MJ, Fook-Chong S, Tan PH. Immunohistochemical expression of hormone receptors in invasive breast carcinoma: correlation of results of H-score with pathological parameters. *Pathology*. 2001 Feb;33(1):21–5.
205. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1929–35.
206. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, Peck DD, Natoli TE, Lu X, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles. *Cell*. 2017 Nov 30;171(6):1437-1452.e17.
207. Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer: Focus on Basal-Like Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2017 Sep 30;9(10).
208. Guo G, Zhuang J, Zhang K, Zhou Z, Wang Y, Zhang Z. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system in children: case reports and literature review. *Front Surg*. 2022 May 16;9:864518.
209. Hatoyama Y, Kanemaki MT. The assembly of the MCM2-7 hetero-hexamer and its significance in DNA replication. *Biochem Soc Trans*. 2023 May 5;
210. Zi Z, Zhang Y, Zhang P, Ding Q, Chu M, Chen Y, et al. A proteomic connectivity map for characterizing the tumor adaptive response to small molecule chemical perturbagens. *ACS Chem Biol*. 2020 Jan 17;15(1):140–50.
211. Suhre K, McCarthy MI, Schwenk JM. Genetics meets proteomics: perspectives for large population-based studies. *Nat Rev Genet*. 2021 Jan;22(1):19–37.
212. Hristova VA, Chan DW. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond. *Expert Rev Proteomics*. 2019 Feb;16(2):93–103.
213. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Feb 7;5(1):8.
214. Juiz NA, Iovanna J, Dusetti N. Pancreatic cancer heterogeneity can be explained beyond the genome. *Front Oncol*. 2019 Apr 5;9:246.
215. Connor AA, Gallinger S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nat Rev Cancer*. 2022 Mar;22(3):131–42.
216. Bergquist JR, Leiting JL, Habermann EB, Cleary SP, Kendrick ML, Smoot RL, et al. Early-onset gastric cancer is a distinct disease with worrisome trends and oncogenic features. *Surgery*. 2019 Oct;166(4):547–55.
217. Aran D, Sirota M, Butte AJ. Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nat Commun*. 2015 Dec 4;6:8971.
218. Lou S, Zhang J, Yin X, Zhang Y, Fang T, Wang Y, et al. Comprehensive characterization of tumor purity and its clinical implications in gastric cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:782529.

219. Yi L, Huang P, Zou X, Guo L, Gu Y, Wen C, et al. Integrative stemness characteristics associated with prognosis and the immune microenvironment in esophageal cancer. *Pharmacol Res.* 2020 Nov;161:105144.
220. Zhang AZ, Yuan X, Liang WH, Zhang HJ, Li Y, Xie YF, et al. Immune infiltration in gastric cancer microenvironment and its clinical significance. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:762029.
221. Rojas A, Araya P, Gonzalez I, Morales E. Gastric Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1226:23–35.
222. Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: implications in cancer. *Protein J.* 2017 Feb;36(1):1–6.
223. Abdelgalil AA, Al-Kahtani HM, Al-Jenoobi FI. Erlotinib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2020;45:93–117.
224. Longo DL. Imatinib Changed Everything. *N Engl J Med.* 2017 Mar 9;376(10):982–3.
225. Khan M, Zhao Z, Arooj S, Zheng T, Liao G. Lapatinib Plus Local Radiation Therapy for Brain Metastases From HER-2 Positive Breast Cancer Patients and Role of Trastuzumab: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020 Nov 6;10:576926.
226. Shi Y-H, Xu Q-C, Zhu Y-Q, Liu Z-D, Zhao G-Y, Liu Q, et al. Imatinib facilitates gemcitabine sensitivity by targeting epigenetically activated PDGFC signaling in pancreatic cancer. *Mol Ther.* 2023 Feb 1;31(2):503–16.
227. Schmitt AM, Dumas L, Larkin J. Atezolizumab, cobimetinib, and vemurafenib as first-line treatment for unresectable metastatic BRAF V600 mutated melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2022 Jan 2;22(1):17–25.
228. Dummer R, Brase JC, Garrett J, Campbell CD, Gasal E, Squires M, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib versus placebo in patients with resected, BRAFV600-mutant, stage III melanoma (COMBI-AD): exploratory biomarker analyses from a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Mar;21(3):358–72.
229. Ferrucci PF, Di Giacomo AM, Del Vecchio M, Atkinson V, Schmidt H, Schachter J, et al. KEYNOTE-022 part 3: a randomized, double-blind, phase 2 study of pembrolizumab, dabrafenib, and trametinib in BRAF-mutant melanoma. *J Immunother Cancer.* 2020 Dec;8(2).
230. Rosen LS, LoRusso P, Ma WW, Goldman JW, Weise A, Colevas AD, et al. A first-in-human phase I study to evaluate the MEK1/2 inhibitor, cobimetinib, administered daily in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2016 Oct;34(5):604–13.
231. Tabbò F, Pisano C, Mazieres J, Mezquita L, Nadal E, Planchard D, et al. How far we have come targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC).

- Cancer Treat Rev. 2022 Feb;103:102335.
232. Guaitoli G, Zullo L, Tiseo M, Dankner M, Rose AA, Facchinetti F. Non-small-cell lung cancer: how to manage BRAF-mutated disease. *Drugs Context.* 2023 May 2;12.
 233. Braal CL, Jongbloed EM, Wilting SM, Mathijssen RHJ, Koolen SLW, Jager A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs.* 2021 Feb;81(3):317–31.
 234. Chang C-J, Chiang C-H, Song W-S, Tsai S-K, Woung L-C, Chang C-H, et al. Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. *Childs Nerv Syst.* 2012 Mar;28(3):363–73.
 235. Xu S, Lai S-K, Sim DY, Ang WSL, Li HY, Roca X. SRRM2 organizes splicing condensates to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2022 Aug 26;50(15):8599–614.
 236. Tomsic J, He H, Akagi K, Liyanarachchi S, Pan Q, Bertani B, et al. A germline mutation in SRRM2, a splicing factor gene, is implicated in papillary thyroid carcinoma predisposition. *Sci Rep.* 2015 Jul 2;5:10566.
 237. Cuinat S, Nizon M, Isidor B, Stegmann A, van Jaarsveld RH, van Gassen KL, et al. Loss-of-function variants in SRRM2 cause a neurodevelopmental disorder. *Genet Med.* 2022 Aug;24(8):1774–80.
 238. La Porta CAM, Zapperi S. Complexity in cancer stem cells and tumor evolution: Toward precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2017 Jun;44:3–9.
 239. Costoya JA, Arce VM. Cancer cells escape the immune system by increasing stemness through epigenetic reprogramming. *Cell Mol Immunol.* 2023 Jan;20(1):6–7.
 240. Madsen RR. PI3K in stemness regulation: from development to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2020 Feb 28;48(1):301–15.
 241. Shafei MA, Flemban A, Daly C, Kendrick P, White P, Dean S, et al. Differential expression of the BCAT isoforms between breast cancer subtypes. *Breast Cancer.* 2021 May;28(3):592–607.
 242. Mercatelli D, Formaggio F, Caprini M, Holding A, Giorgi FM. Detection of subtype-specific breast cancer surface protein biomarkers via a novel transcriptomics approach. *Biosci Rep.* 2021 Dec 22;41(12).
 243. Hass R, von der Ohe J, Ungefroren H. Impact of the tumor microenvironment on tumor heterogeneity and consequences for cancer cell plasticity and stemness. *Cancers (Basel).* 2020 Dec 11;12(12).
 244. Li W, Li F, Zhang X, Lin H-K, Xu C. Insights into the post-translational modification and its emerging role in shaping the tumor microenvironment. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Dec 20;6(1):422.

245. Nayak A, Warriar NM, Kumar P. Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment: Targeting the Critical Crosstalk through Nanocarrier Systems. *Stem Cell Rev and Rep.* 2022 Oct;18(7):2209–33.
246. Sun L, Zhang L, Yu J, Zhang Y, Pang X, Ma C, et al. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020 Feb 7;10(1):2083.
247. Heigener DF, Reck M. Crizotinib. *Recent Results Cancer Res.* 2018;211:57–65.
248. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014 Nov 20;371(21):1963–71.
249. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: crizotinib and beyond. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2014 Jul;12(7):429–39.
250. Prieto J-L, McStay B. Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev.* 2007 Aug 15;21(16):2041–54.
251. Bursać S, Jurada D, Volarević S. New insights into HEATR1 functions. *Cell Cycle.* 2018 Jan 2;17(2):143–4.
252. Turi Z, Senkyrikova M, Mistrik M, Bartek J, Moudry P. Perturbation of RNA Polymerase I transcription machinery by ablation of HEATR1 triggers the RPL5/RPL11-MDM2-p53 ribosome biogenesis stress checkpoint pathway in human cells. *Cell Cycle.* 2018;17(1):92–101.
253. Nakamura A, Kakihara Y, Funayama A, Haga K, Mikami T, Kobayashi D, et al. HEATR1, a novel interactor of Pontin/Reptin, stabilizes Pontin/Reptin and promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Jun 11;557:294–301.
254. Wu ZB, Qiu C, Zhang AL, Cai L, Lin SJ, Yao Y, et al. Glioma-associated antigen HEATR1 induces functional cytotoxic T lymphocytes in patients with glioma. *J Immunol Res.* 2014 Jul 9;2014:131494.
255. Zhao J, Zhu Y, Fu Q, Zhu Y, Zhao G. HEATR1 promotes proliferation in gastric cancer in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2020 Sep 8;52(9):1030–9.
256. Liu T, Fang Y, Zhang H, Deng M, Gao B, Niu N, et al. HEATR1 negatively regulates akt to help sensitize pancreatic cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 2016 Feb 1;76(3):572–81.
257. Hahn D, Beggs JD. Brr2p RNA helicase with a split personality: insights into structure and function. *Biochem Soc Trans.* 2010 Aug;38(4):1105–9.
258. Santos KF, Jovin SM, Weber G, Pena V, Lührmann R, Wahl MC. Structural basis for functional cooperation between tandem helicase cassettes in Brr2-mediated remodeling of the spliceosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Oct

- 23;109(43):17418–23.
259. Zhang X, Yan C, Hang J, Finci LI, Lei J, Shi Y. An atomic structure of the human spliceosome. *Cell*. 2017 May 18;169(5):918-929.e14.
260. Liu S, Rauhut R, Vornlocher H-P, Lührmann R. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA*. 2006 Jul;12(7):1418–30.
261. Jiménez-Vacas JM, Herrero-Aguayo V, Montero-Hidalgo AJ, Gómez-Gómez E, Fuentes-Fayos AC, León-González AJ, et al. Dysregulation of the splicing machinery is directly associated to aggressiveness of prostate cancer. *EBioMedicine*. 2020 Jan 3;51:102547.
262. Sato N, Maeda M, Sugiyama M, Ito S, Hyodo T, Masuda A, et al. Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Med*. 2015 Feb;4(2):268–77.
263. Vaughan RM, Dickson BM, Whelihan MF, Johnstone AL, Cornett EM, Cheek MA, et al. Chromatin structure and its chemical modifications regulate the ubiquitin ligase substrate selectivity of UHRF1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Aug 28;115(35):8775–80.
264. Mancini M, Magnani E, Macchi F, Bonapace IM. The multi-functionality of UHRF1: epigenome maintenance and preservation of genome integrity. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jun 21;49(11):6053–68.
265. Ashraf W, Ibrahim A, Alhosin M, Zaayter L, Ouararhni K, Papin C, et al. The epigenetic integrator UHRF1: on the road to become a universal biomarker for cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 24;8(31):51946–62.
266. Jiao D, Huan Y, Zheng J, Wei M, Zheng G, Han D, et al. UHRF1 promotes renal cell carcinoma progression through epigenetic regulation of TXNIP. *Oncogene*. 2019 Jul;38(28):5686–99.
267. Greenberg MVC, Bourc’his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Oct;20(10):590–607.
268. Black PN, Ahowesso C, Montefusco D, Saini N, DiRusso CC. Fatty acid transport proteins: targeting FATP2 as a gatekeeper involved in the transport of exogenous fatty acids. *Medchemcomm*. 2016 Apr 1;7(4):612–22.
269. Liu W, Chakraborty B, Safi R, Kazmin D, Chang C-Y, McDonnell DP. Dysregulated cholesterol homeostasis results in resistance to ferroptosis increasing tumorigenicity and metastasis in cancer. *Nat Commun*. 2021 Aug 24;12(1):5103.
270. Chen Y, Zhao Y, Deng Y, Yang Y, Xu L, Fu J. FATP2 regulates non-small cell lung cancer by mediating lipid metabolism through ACSL1. *Tissue Cell*. 2023 May 6;82:102105.

271. Xu N, Xiao W, Meng X, Li W, Wang X, Zhang X, et al. Up-regulation of SLC27A2 suppresses the proliferation and invasion of renal cancer by down-regulating CDK3-mediated EMT. *Cell Death Discov.* 2022 Aug 4;8(1):351.
272. Graham SH, Liu H. Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging, neurodegenerative disease and cerebral Ischemia. *Ageing Res Rev.* 2017 Mar;34:30–8.
273. Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X, et al. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology.* 2008 Aug;48(2):508–18.
274. Xiang T, Li L, Yin X, Yuan C, Tan C, Su X, et al. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer. *PLoS ONE.* 2012 Jan 18;7(1):e29783.
275. Ummanni R, Jost E, Braig M, Lohmann F, Mundt F, Barrett C, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Mol Cancer.* 2011 Oct 14;10:129.
276. Yan W-J, Guo M-Z, Yang Y-S. [The role of hypermethylation in promoter region of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in human esophageal cancer]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2012 May;51(5):390–3.
277. Mondal M, Conole D, Nautiyal J, Tate EW. UCHL1 as a novel target in breast cancer: emerging insights from cell and chemical biology. *Br J Cancer.* 2022 Jan;126(1):24–33.
278. Kobayashi E, Hwang D, Bheda-Malge A, Whitehurst CB, Kabanov AV, Kondo S, et al. Inhibition of UCH-L1 Deubiquitinating Activity with Two Forms of LDN-57444 Has Anti-Invasive Effects in Metastatic Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 31;20(15).
279. Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J Cell Sci.* 2006 Jan 1;119(Pt 1):162–71.
280. Alpaugh WF, Voigt AL, Dardari R, Su L, Al Khatib I, Shin W, et al. Loss of Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1 Impairs Long-Term Differentiation Competence and Metabolic Regulation in Murine Spermatogonial Stem Cells. *Cells.* 2021 Aug 31;10(9).
281. Yang D, Lu Q, Peng S, Hua J. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1), a double-edged sword in mammalian oocyte maturation and spermatogenesis. *Cell Prolif.* 2023 Feb;56(2):e13347.
282. Kelly GM, Gatie MI. Mechanisms regulating stemness and differentiation in embryonal carcinoma cells. *Stem Cells Int.* 2017 Mar 8;2017:3684178.

283. Transcript: ENST00000326866.5 (ZFP42-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109 [Internet]. [cited 2023 May 22]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000179059;r=4:187995771-188005046;t=ENST00000326866
284. Marasco LE, Kornblihtt AR. The physiology of alternative splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023 Apr;24(4):242–54.
285. Ramazi S, Zahiri J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford).* 2021 Apr 7;2021.
286. Wang X, Li S. Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1846(1):13–25.
287. Musa A, Ghoraie LS, Zhang S-D, Glazko G, Yli-Harja O, Dehmer M, et al. A review of connectivity map and computational approaches in pharmacogenomics. *Brief Bioinformatics.* 2018 May 1;19(3):506–23.
288. Firoozbakht F, Rezaeian I, Rueda L, Ngom A. Computationally repurposing drugs for breast cancer subtypes using a network-based approach. *BMC Bioinformatics.* 2022 Apr 20;23(1):143.
289. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 Jan;18(1):41–58.
290. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018 Jul;18(7):407–18.
291. Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, van Werkhoven E, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med.* 2019 Oct 9;11(513).



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 302/21

Nu podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarza dentysty (tj. z dnia 28 lutego 2020 r., Dz.U. z 2020 r. poz. 514)z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 489); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (tj. z dnia 15 maja 2020 r. (Dz.U. z 2020 r. poz. 944)z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłoszenia niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (tj. z dnia 13 grudnia 2019 r., Dz.U. z 2020 r. poz. 186), z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (tj. tj. z dnia 4 maja 2020 r., Dz.U. z 2020 r. poz. 836) z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską Światowego Stowarzyszenia Lekarzy (WMA - World Medical Association) - Etyczne zasady prowadzenia badań medycznych z udziałem ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 08 kwietnia 2021 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia eksperymentu badawczego.

Kierownik projektu: dr hab. n. med. Maciej Wiznerowicz, prof. UM

Miejsce prowadzenia badań:

**Międzynarodowy Instytut Onkologii Molekularnej, ul. Krauthofera 23,
60-203 Poznań we współpracy z Katedrą Biotechnologii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w pozostałych ośrodkach objętych
opinią Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu**

Główny badacz: dr hab. n. med. Maciej Wiznerowicz, prof. UM

Członkowie zespołu

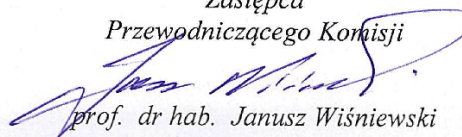
badawczego: Załącznik nr 1 do niniejszej Uchwały

Temat badań:

**„Konsorcjum Kliniczne Analiz Proteomiki Raka (Clinical Proteomic
Tumor Analysis Consortium, (CPTAC))”.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do
protokołu powyższego badania, polegających na poszerzeniu składu zespołu
badawczego i podjęciu współpracy z nowym ośrodkiem badawczym - Europejskie
Centrum Zdrowia Otwock oraz wydłużeniu realizacji projektu do 31.12.2025r.,
zgodnie z Aneks nr 5 z dnia 08.04.2021r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr
145/16 z dnia 06.04.2016r. (Aneks nr 1 z dnia 15.09.2016r., Aneks nr 2 z dnia
06.04.2017r., Aneks nr 3 z dnia 22.06.2017r., Aneks nr 4 z dnia 07.09.2017r.)**

Zastępca
Przewodniczącego Komisji


prof. dr hab. Janusz Wiśniewski