

# Autoreferat:

---

(Załącznik 2)

**Dawid Walerych**

Pracownia Multi-omki Chorób Człowieka  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

**Warszawa, 2019**

**1. Imiona i nazwisko:** Dawid Włodzimierz Walerych

**2. Posiadane dyplomy:**

- Dyplom ukończenia studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w ramach Międzywydziałowych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (MiS MaP), 2002 rok. Tytuł pracy magisterskiej pod kierunkiem prof. Ewy Bartnik (Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego) „**Uzyskanie fuzyjnych dimerów ludzkiego białka p53 poprzez konstrukcję i ekspresję multigenów w *Escherichia coli*.**”. Uzyskany tytuł: **magister biologii, specjalizacja – biologia molekularna.**
- Dyplom doktora nauk biologicznych uzyskany w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w ramach Studium Medycyny Molekularnej (SMM), 2008 rok, promotor – prof. Alicja Żylicz (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie). Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Wspomaganie aktywności ludzkiego białka p53 przez białka opiekuńcze**”. Uzyskany stopień naukowy: **doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii.**

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:**

- **2002 - 2008** – doktorant w Zakładzie Biologii Molekularnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (w ramach Studium Medycyny Molekularnej – SMM).
- **2008 - 2010** – pracownik typu post-doc (badacz) w Zakładzie Biologii Molekularnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.
- **2011 - 2016** – pracownik typu post-doc (badacz) w Jednostce Onkologii Molekularnej, Laboratorio Nazionale Consorzio Interuniversitario per Biotecnologie (LNCIB) w Trieście, Włochy.
- **2016 - 2018** – Adiunkt w Zakładzie Chorób Neurozwyrodnieniowych CUN , Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.
- **Od 2018** – Kierownik Pracowni Multi-omki Chorób Człowieka, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

#### 4. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy

##### a. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

### Onkogenne funkcje, regulacja i terapeutyczne wykorzystanie zmienionego mutacjami białka p53 w chorobach nowotworowych człowieka

##### b. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

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

Opisane poniżej osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl prac oryginalnych definiujący zmutowane geny *TP53* jako onkogeny i przedstawiający nieznanie wcześniej onkogenne role oraz sposoby terapeutycznego wykorzystania białek p53 zmienionych przez mutacje w chorobach nowotworowych człowieka. Podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny jest następujący zbiór prac oryginalnych:

1. **Walerych D**, Napoli M, Collavin L, Del Sal G.\* The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 2007-17.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu zdecydowanej większości analizy dostępnej literatury, wyciągnięcia wniosków, na pisanie ok. 80 % treści publikacji i stworzenia ostatecznych wersji wszystkich rycin/tabel. Mój udział procentowy szacuję na 80 %.*

2. **Walerych D**, Lisek K, Sommaggio R, Piazza S, Ciani Y, Dalla E, Rajkowska K, Gaweda-Walerych K, Ingallina E, Tonelli C, Morelli MJ, Amato A, Eterno V, Zambelli A, Rosato A, Amati B, Wiśniewski JR, Del Sal G.\* Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nature Cell Biol*. 2016; 18: 897-909.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i bezpośrednim nadzorowaniu ciągu doświadczalnego, przeprowadzeniu własnoręcznie większości doświadczeń laboratoryjnych, przeprowadzeniu dużej części analiz bioinformatycznych, napisaniu większości treści zarówno wstępnie jak i przy rewizji pracy, przygotowaniu z własnych wyników ok. 75% wszystkich ilustracji zawartych w publikacji i jej suplemencie oraz koordynacji wszystkich współprac prowadzących do uzyskania wyników. Mój całkowity udział procentowy szacuję na 60 %.*

3. Lisek K, Campaner E, Ciani Y, **Walerych D\***, Del Sal G\*. Mutant p53 tunes the Nrf2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9: 20508-23.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na bezpośrednim nadzorowaniu pracy pierwszego autora publikacji (także jako opiekun pomocniczy doktoratu), w tym zaplanowaniu większości ciągu doświadczalnego, będącego kontynuacją poprzedniej publikacji cyklu (poz. 2). Mój wkład polegał też na zaplanowaniu, przeprowadzeniu i przygotowaniu do publikacji doświadczeń immunoprecypitacji chromatyiny (ChIP) zawartych na rycinie głównej 2 E,F, dodatkowej 3 F,G oraz doświadczeń konkurencji peptydów z aktywacją przez mutanty p53 ekspresji genów proteasomu (ryc. dodatkowa 3E). Ponadto brałem udział w pisaniu publikacji i przygotowaniu wszystkich rycin – zarówno na wstępnym etapie, jak i podczas rewizji. Podczas rewizji pracy przeprowadziłem też dodatkową analizę statystyczną danych zawartych na rycinach 1,2,3 i 5 oraz – jako autor korespondencyjny – brałem udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Swój udział procentowy szacuję na 35 %.*

4. **Walerych D\***, Pruszko M, Zyla L, Wezyk M, Gaweda-Walerych K, Zylicz A. Wild-type p53 oligomerizes more efficiently than p53 hot-spot mutants and overcomes mutant p53 gain-of-function via a “dominant-positive” mechanism. *Oncotarget*. 2018; 9: 32063-80.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu ciągu doświadczalnego i wykonaniu większości doświadczeń i obliczeń zawartych na wszystkich rycinach pracy, koordynacji pracy pozostałych współautorów, napisaniu wstępnej i zrewidowanej wersji publikacji i korespondencji z redaktorem czasopisma jako autor korespondencyjny - w tym odpowiedzi na uwagi recenzentów podczas rewizji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.*

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie prac objętych cyklem habilitacyjnym zawiera **Załącznik 7**.

Dodatkowo (poza osiągnięciem), następujące prace opublikowane po obronie pracy doktorskiej wnoszą wyniki i informacje uzupełniające, które zostały wykorzystane w poniższym opisie celów naukowych i otrzymanych wyników:

5. **Walerych D**, Olszewski MB, Gutkowska M, Helwak A, Zylicz M, Zylicz A.\* Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. *Oncogene*. 2009; 28: 4284-94.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu całości doświadczeń i obliczeń zawartych na rycinach 2-4, udziale w doświadczeniach zawartych na wszystkich pozostałych rycinach, napisaniu większości wstępnej i zrewidowanej wersji publikacji wraz z dr Maciejem Olszewskim, będącym równorzędnym, pierwszym współautorem tej pracy. Część moich wyników zawarta w tej pracy była wykorzystana w pracy doktorskiej - niezawarte w pracy doktorskiej były całe ryc. 1,2 i 5. Mój udział procentowy w całości pracy szacuję na 40 %.*

6. **Walerych D**, Gutkowska M, Klejman MP, Wawrzynow B, Tracz Z, Wiech M, Zylicz M, Zylicz A.\* ATP binding to Hsp90 is sufficient for effective chaperoning of p53 protein. *J Biol Chem*. 2010; 285: 32020-8.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu całości doświadczeń oraz obliczeń zawartych na rycinach 1, 3 i 5, udziale w doświadczeniach zawartych na wszystkich pozostałych rycinach, napisaniu większości wstępnej i zrewidowanej wersji publikacji. Część moich wyników zawarta w tej pracy była wykorzystana w pracy doktorskiej - niezawarte w pracy doktorskiej były Ryc. 1, 2 i 4 publikacji. Mój udział procentowy w całości szacuję na 60 %.*

7. Garibaldi F, Falcone E, Trisciuoglio D, Colombo T, Lisek K, **Walerych D**, Del Sal G, Paci P, Bossi G, Piaggio G, Gurtner A.\* Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex. *Oncogene*. 2016; 35: 3760-70.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu doświadczeń wykrywania interakcji między zmienionym mutacjami białkiem p53 a p72/p82 (rycina 3e oraz suplement pracy), udziale w napisaniu wstępnej i zrewidowanej wersji publikacji. Mój udział szacuję na 10 %.*

## **c. Omówienie celu naukowego/artystycznego powyższych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

### **1. Zmutowany gen *TP53* jako onkogen (wstęp)**

Od czasu odkrycia genu *TP53* i jego istotnej roli w powstawaniu chorób nowotworowych człowieka pod koniec lat 70. XX wieku, gen i kodowane przez niego białko p53, stały się jednymi z najpopularniejszych obiektów badawczych w naukach o życiu. Badania z lat 80. dowiodły, że dzięki wariant ludzkiego genu *TP53* czy jego mysli ontolog, są wydajnymi genami-supresorami nowotworowymi – po indukcji hamują rozwój komórek nowotworowych. W konsekwencji onkosupresorowa aktywność ludzkiego genu *TP53* jest wyjątkowo często inaktywowana przez mutacje w spontanicznych nowotworach różnych tkanek człowieka (Kandoth et al., 2013; Zehir et al., 2017). Do dziś, mimo dziesiątków tysięcy opublikowanych prac opisujących rozmaite aspekty *TP53*, badania nad nim prowadzą do odkrywania nowych jego funkcji i wzbudzają emocje. Proporcje ilościowe mutacji inaktywujących *TP53* w nowotworach są wyjątkowe wśród supresorów nowotworowych – są to przede wszystkim mutacje punktowe, typu zmiany sensu (ang. missense) – które nie prowadzą do absencji białka p53 w komórkach nowotworowych, ale do akumulacji jego zmienionych przez mutacje wariantów (Bouaoun et al., 2016). Te fakty, jak i szereg badań funkcjonalnych nad mutantami *TP53*, prowadzonych od lat 80. XX wieku, wskazują, iż najczęstsze mutacje *TP53* indukują onkogenne funkcje zmienionych mutacjami białek p53 (Mantovani et al., 2017; Walerych et al., 2012, Walerych et al., 2015). W związku z tym najczęstsze zmutowane warianty *TP53* spełniają wymogi klasycznej definicji onkogeny (Tsuchida et al., 2016) – są genami aktywnie promującymi transformację nowotworową komórek. Dzika forma *TP53* – obok definicji genu-supresora nowotworowego – spełnia jednocześnie definicję proto-onkogeny.

Fakt, iż częste mutanty punktowe *TP53* są onkogenami nie jest łatwy do zrozumienia dla naukowców i lekarzy, przyzwyczajonych do dobrze ugruntowanej książkowej wiedzy na temat onkosupresorowej roli dzikiego wariantu *TP53*. Niejasnościom sprzyja fakt, że w pierwszych latach badań nad *TP53* to jego dziki wariant był mylnie podejrzewany o właściwości onkogenne (Finlay et al., 1989). Dlatego zadaniem istotnym dla onkologii doświadczalnej i medycznej jest dokładne wyjaśnianie roli i możliwości terapeutycznego wykorzystania mutantów *TP53* – najczęściej aktywowanych przez mutacje onkogenów w chorobach nowotworowych, obecnych średnio w ponad 35% wszystkich powstających spontanicznie nowotworów człowieka (Bouaoun et al., 2016; Kandoth et al., 2013; Zehir et al., 2017).

### **2. Podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat onkogennej roli mutantów *TP53* i znalezienie najważniejszych jej braków (publikacja 1. osiągnięcia)**

Celem moich badań opisanych w poniższej rozprawie habilitacyjnej było zrozumienie mechanizmu funkcjonowania szeregu mutantów *TP53* jako onkogenów w raku piersi, zweryfikowanie uniwersalności uzyskanych wyników w innych nowotworach, znalezienie sposobów na terapeutyczne wykorzystanie obecności mutantów *TP53* w komórkach nowotworowych oraz określenie wzajemnej relacji dzikiego i zmutowanych wariantów białka p53 w przypadku współwystępowania w komórkach.

Pierwsza praca wchodząca w skład osiągnięcia w tej rozprawie jest pracą przeglądową (Walerych et al., 2012). Posłużyła do dokładnego podsumowania dotychczasowej wiedzy na temat onkogennej aktywności zmutowanych genów *TP53* i znalezienia najważniejszych braków w informacjach na jego temat. Było to kluczowe do zaplanowania i przeprowadzenia doświadczeń przedstawionych w kolejnych publikacjach doświadczalnych cyklu. W tytule tej pracy pojawia się jeden z pierwszych przypadków nazwania wprost zmutowanego *TP53* onkogenem w publikacjach naukowych. Praca ta jest do roku 2019 najczęściej cytowaną pracą mojego autorstwa z ponad 200 cytowaniami w bazie Google Scholar i ponad 150 cytowaniami w bazach Web of Science czy Scopus.

Najważniejszymi wnioskami wynikającymi z publikacji (Walerych et al., 2012) są:

- a) Wiedza zgromadzona w setkach publikacji poczynszy od końca lat 80. XX wieku na temat działania mutantów *TP53* w różnych nowotworach, w modelach doświadczalnych *in vitro*, *in vivo*, jak i w materiale od pacjentów z chorobami nowotworowymi, wskazuje jednoznacznie, że białka p53 zmienione mutacjami i zakumulowane w komórkach są aktywnymi onkoproteinami, mogącymi stymulować transformację nowotworową i podtrzymywać główne cechy fenotypowe komórek nowotworowych.
- b) Najpopularniejszym pod względem liczby opublikowanych badań modelem badawczym w molekularnych badaniach nad nowotworami jest rak piersi. W związku z tym najdokładniejsze do roku 2012 dane na temat onkogenności mutantów *TP53* pochodziły właśnie z tego rodzaju nowotworu, a w szczególności potrójnie negatywnego raka piersi (ang. TNBC), w którym częstość mutacji *TP53* jest największa wśród podtypów raka piersi. Stało się tak zarówno dzięki najliczniejszym wśród nowotworów badanym grupom pacjentek, jak i popularnym modelom komórkowym czy zwierzęcym. Dane te zostały zebrane i podsumowane w publikacji.
- c) Prowadzone do roku 2012 badania nad mechanizmem onkogennej aktywności mutantów *TP53* w większości wskazywały, że zmienione mutacjami, zakumulowane białko p53, pośrednio - poprzez inne czynniki transkrypcyjne - wiąże się z sekwencjami promotorowymi w genomie, w rejonach DNA innych niż dziki wariant p53 i reguluje ich aktywność, w ten sposób sprzyjając transformacji nowotworowej. W związku z tym w dalszych badaniach nad mutantami *TP53* jako punkt wyjścia można było zastosować metody tarskryptomiczne i badające wiązanie zmienionych mutacjami białek p53 do chromatyny.
- d) Podczas gdy liczne publikacje opisywały pojedyncze szlaki molekularne regulowane przez konkretne mutanty *TP53*, bardzo niewielka wiedza została zgromadzona na temat szerokiego wpływu mutantów *TP53* na genom, proteom i metabolom, a szczególnie wpływu, który byłby wspólny dla grupy najczęstszych mutacji *TP53*. Problem czy traktować najczęstsze mutacje w *TP53* jako funkcjonalnie odrębne onkogeny czy jeden onkogen był nierozwiązany i w związku z tym szczególnie warty kolejnych doświadczeń.
- e) Prowadzone do 2012 próby terapeutyczne związane z bezpośrednim lub pośrednim hamowaniem zmienionych mutacjami białek p53, czy reaktywacją supresorowych właściwości dzikiego wariantu p53, w większości nie dawały znaczących klinicznie efektów w monoterapiach. Strategią wartą dalszych badań było zatem racjonalne połączenie terapeutycznego wykorzystania mutantów *TP53* i innych leków przeciwnowotworowych.

Wnioski te były dalej poszerzane, udokładniane i aktualizowane w publikowanych w kolejnych latach krótszych pracach przeglądowych mojego autorstwa na temat mutantów *TP53* (Mantovani et al., 2017; Walerych et al., 2015; Walerych et al., 2016a) oraz w rozdziale książki „Mutant p53 and MDM2 in Cancer” (Girardini et al., 2014), często z uwzględnieniem wyników badań własnych, opisanych w kolejnych punktach poniższego autoreferatu.

### **3. Wspólny molekularny program mutantów *TP53* w komórkach nowotworowych (publikacja 2. osiągnięcia)**

Uporządkowanie wiedzy w publikacji (Walerych et al., 2012) pozwoliło na zaplanowanie i przeprowadzenie serii doświadczeń nad onkogeną rolą mutantów *TP53* (Walerych et al., 2016b). Ciąg doświadczalny opisany w tej publikacji był w całości zaplanowany przez mnie, prowadzony pod opieką i przy konsultacji z prof. Giannino Del Salem, kierownikiem Molecular Oncology Unit, Laboratoriorio Nazionale Consorzio Interuniversitario per Biotecnologie (LNCIB) w Treście, we Włoszech. Współautorami publikacji są osoby specjalizujące się w użyciu konkretnych metod, z ośrodków współpracujących we Włoszech, w Polsce i w Niemczech. Koordynacja tych współprac była prowadzona przeze mnie.

Najważniejszymi wnioskami wynikającymi z publikacji (Walerych et al., 2016b) są:

- a) Badanie transkrypcyjnego programu, kontrolowanego przez pięć różnych endogennych mutantów *TP53*, w pięciu liniach komórkowych potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC), wskazuje, że wspólna dla wszystkich badanych mutantów *TP53* część tego programu jest silniej zasocjowana z gorszą prognozą dla pacjentów raka piersi, niż części programu regulowane specyficznie przez konkretne mutacje *TP53*. To sugeruje że przynajmniej pięć badanych mutantów *TP53* zachowuje się w raku piersi bardziej jak pojedynczy onkogen, niż grupa onkogenów o odmiennych szlakach kontroli komórki nowotworowej.
- b) Najsilniej zasocjowaną ze znanymi szlakami molekularnymi ludzkiej komórki częścią programu wspólnego dla pięciu badanych mutantów *TP53* była grupa genów kodujących podjednostki proteasomu 26S. Proteasom był też najwyraźniej regulowanym komponentem subkomórkowym w przypadku multi-omicznej analizy jednego mutantu *TP53* – kodującego wariant R280K p53 w linii komórkowej MDA-MB-231 – zbadanego na potrzeby pracy metodami proteomiki, transkryptomiki (RNA-seq) i sekwencjonowania po immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-seq). Kontrola genów i aktywności proteasomu przez inne mutanty *TP53* została potwierdzona w tkankach pacjentek z rakiem piersi, w liniach komórkowych raka trzustki, jelita grubego, jajnika oraz wątroby, a także w tkankach mysiego modelu z wstawionym zmutowanym mysim genem *Trp53*, odpowiednikiem ludzkiego *TP53*.
- c) Za pośrednictwem maszyny proteasomu 26S mutanty *TP53* wpływają na znaczną populację białek proteomu komórki nowotworowej, co zostało w pracy zbadane metodami proteomiki. Zidentyfikowane i zbadane zostały szlaki molekularne wcześniej nie łączone z aktywnością proteasomu w komórkach nowotworowych – m.in. wpływ na metabolizm mitochondriów czy dojrzewanie onkosupresorowych mikroRNA. Ten ostatni proces, przebiegający poprzez degradowane przez proteasom białko KSRP, okazał się mieć najwyraźniejszy wpływ na fenotyp badanych komórek nowotworowych.
- d) Badania molekularne wskazały, że zmienione mutacjami białka p53 wiążą i aktywują promotory genów proteasomu za pośrednictwem białka NRF2 (NFE2L2) – wcześniej opisanego jako czynnik transkrypcyjny genów podjednostek proteasomu i znanego regulatora odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny.
- e) Powyższe wyniki pozwoliły na przeprowadzenie przedklinicznych prób terapeutycznych łączących hamowanie zmienionych mutacjami białek p53 i użycie innych leków antynowotworowych w potrójnie negatywnym raku piersi. Próby te są opisane w punkcie 4.

Wyniki z pracy (Walerych et al., 2016b) po raz pierwszy powiązały onkogeną aktywność proteasomu z mikro RNA, poprzez zależne od zmutowanego *TP53* i proteasomu w TNBC białko KSRP – regulujące dojrzewanie szeregu onkosupresorowych miRNA. Równocześnie brałem udział w projekcie instytutu badań nad chorobami nowotworowymi Regina Elena w Rzymie, we Włoszech, na temat bezpośredniego wpływu mutantów *TP53* na dojrzewanie mikro RNA. Wyniki zostały zebrane w publikacji (Garibaldi et al., 2016), wymienionej jako uzupełniająca do niniejszego cyklu publikacji. Główną konkluzją tej pracy jest pokazanie, że zmienione mutacjami białka p53 wiążą i hamują białko p72/p82, zakłócając tym samym pracę kompleksu białka Drosha z pri-miRNA i hamując dojrzewanie licznej populacji onkosupresorowych mikro RNA. W ten sposób publikacje (Walerych et al., 2016b) i (Garibaldi et al., 2016) pokazują odpowiednio pośredni (przez proteasom) i bezpośredni (poprzez wiązanie białka p72/p82) wpływ mutantów *TP53* na ogólną gospodarkę mikro RNA w komórkach nowotworowych. Dowodzi to, że onkogenna rola zmienionych mutacjami białek p53 spełniana jest równoległymi, uzupełniającymi się szlakami, prowadząc do ostatecznego efektu pronowotworowego.

#### 4. Terapeutyczne wykorzystanie programu molekularnego mutantów *TP53* do niszczenia komórek nowotworowych (publikacje 2. i 3. osiągnięcia)

W opisaney wyżej pracy (Walerych et al., 2016b) zostało pokazane, iż zmienione mutacjami białka p53 współpracują z białkiem NRF2 w reakcji kompensacyjnej na zahamowanie proteasomu (tzw. bounce-back). Skutkuje ona w potrójnie negatywnym raku piersi (TNBC) opornością na terapeutyczne inhibitory proteasomu - używane w klinice z powodzeniem w terapii szpiczaków Bortezomib i Carfilzomib. W związku z tym połączenie leku hamującego onkogeną aktywność mutantów *TP53* i reaktywującego część funkcji dzikiego białka p53 (APR-246/PRMIA-1MET) oraz inhibitora proteasomu (Carfilzomibu) dało efekt synergistyczny w zabijaniu komórek TNBC. Skuteczność tej kombinacji leków została w publikacji (Walerych et al., 2016b) potwierdzona *in vitro* na panelu linii komórkowych TNBC oraz *in vivo* na ortotopowych heteroprzeszczepach komórek raka piersi u myszy. Badania te zostały następnie rozszerzone o hamowanie innych aspektów współpracy między mutantami *TP53*, a białkiem NRF2 w publikacji (Lisek et al., 2018). Część badań przy rewizji pracy była prowadzona już w zakładanej przeze mnie w Polsce w roku 2018 Pracowni Multi-omiki Chorób Człowieka Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Najważniejsze wnioski wynikające z publikacji (Lisek et al., 2018) są następujące:

- a) Geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny NRF2 (NFE2L2), związane z jego reakcją na stres oksydacyjny, można podzielić na dwie grupy w zależności od wpływu mutantów *TP53* – hamowane i aktywowane przez zmienione mutacjami białka p53. Do genów aktywowanych przez kompleks zmutowany p53-NRF2 należą m.in. geny proteasomu 26S (zgodnie z publikacją (Walerych et al., 2016b)) czy geny systemu tioredoksyny (*TXN*, *TXNRD1*). Do genów hamowanych przez kompleks mutant p53-NRF2 należy m.in. gen hemooksygenazy I (*HMOX1*). Jest to odmienny efekt na działanie NRF2 od znanego wcześniej wpływu innych wiodących onkogenów w nowotworach człowieka – np. *K-RAS* czy *C-MYC* – które aktywują wszystkie zbadane geny zależne od NRF2.
- b) We wcześniejszej publikacji (Walerych et al., 2016b) została określona domena zmienionych mutacjami białek p53, odpowiadająca za interakcję z NRF2. Jest to centralna domena p53, wiążąca DNA (ang. DNA-binding domain, DBD). W pracy (Lisek et al., 2018), dzięki trzydziestoaminokwasowemu peptydom pokrywającym całą DBD białka p53, rejon interakcji obydwu białek został określony dokładniej – na pierwsze 30 aminokwasów DBD (aminokwasy 98-128 pełnej długości białka p53). Peptyd ten, przy silnej nadprodukcji ekotopowej, efektywnie konkurował z interakcją mutant p53 – NRF2 oraz z efektami funkcjonalnymi mutantów p53 na NRF2 – zarówno z aktywacją jak i hamowaniem genów zależnych od NRF2.
- c) Powyższy wynik wskazywał pośrednio, że zarówno aktywacja jak hamowanie genów zależnych od NRF2 przez zmienione mutacjami białka p53 mogą mieć znaczenie dla promowania onkogennych zmian komórek zależnych od mutantów *TP53*. Efekt ten został zbadany na przykładzie genów tioredoksyny (*TXN*, aktywowany przez mutanty *TP53*) i hemooksygenazy I (*HMOX1*, hamowany przez mutanty *TP53*). Białko *TXN* promowało żywotność i migrację badanych komórek nowotworowych potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC), podczas gdy białko HO-1 (kodowane przez *HMOX1*) hamowało żywotność i migrację tych samych komórek, szczególnie w obecności stresu oksydacyjnego. Wynik ten oznaczał, że mutanty *TP53* podtrzymują żywotność i migrację komórek specyficznie aktywując zależne od NRF2 geny sprzyjające przeżyciu komórek nowotworowych, jednocześnie hamując zależne od NRF2 geny mogące zabić te komórki. Efekt ten był szczególnie wyraźny w obecności stresu oksydacyjnego, indukowanego w doświadczeniach *in vitro* na podobnym poziomie jak naturalnie występujący w guzach nowotworowych.
- d) W celu terapeutycznego wykorzystania poznanego mechanizmu połączone zostały dwie substancje lecznicze – indukujący stres oksydacyjny Auranofin i hamujący onkogeną aktywność mutantów *TP53* APR-246 (PRMIA-1MET). Substancje wykazały synergistyczny efekt uśmiercania komórek *in vitro* zależny od stresu oksydacyjnego, specyficznie gdy był w nich obecny mutant *TP53*. Wyniki oznaczały to, że badane komórki nowotworowe TNBC, w których obecne są



mutanty *TP53*, nie mogą skutecznie bronić się przed stresem oksydacyjnym, gdy zahamuje się zmienione mutacją białko p53.

Podsumowując, w otrzymanych w tym cyklu publikacji wynikach opisane zostały przynajmniej trzy nieznanne wcześniej sposoby hamowania lub/i zabijania komórek nowotworowych z mutantami *TP53* – zastosowanie kombinacji inhibitora proteasomu Carfilzomibu i APR-246 (Walerych et al., 2016b), peptydu zawierającego aminokwasy 98-128 białka p53 (najtrudniejsze do ewentualnego zastosowania *in vivo* ze względu na konieczność wprowadzania do guza wektora kodującego peptyd) i kombinacji Auranofin + APR-246 (Lisek et al., 2018). Pierwszy z tych protokołów, ze względu na najdokładniejsze przetestowanie na heteroprzeszczepach u myszy, został przekazany do przeprowadzenia testu klinicznego u pacjentek TNBC na oddziale onkologicznym szpitala w Bergamo, Włochy.

Wyniki zawarte w pracy (Lisek et al., 2018) dodały też istotną wiedzę na temat funkcjonowania białka NRF2 w komórkach nowotworowych. Białko NRF2 jest znane zarówno z efektów hamujących rozwój guzów na wczesnym etapie, jak i wspomagania wzrostu i przerzutów rozwiniętych nowotworów (Menegon et al., 2016). Nasze badania pokazały po raz pierwszy jak zarówno pro- i antynowotworowe funkcje NRF2 mogą być różnicowo kierowane przez jedno onkogenne białko – zmienione mutacją punktową p53 – i wprowadzone na drogę promowania fenotypu nowotworowego.

#### **5. Relacja między dzikim wariantem białka p53 a jego wariantami zmienionymi przez mutacje – odkrycie efektu „pozytywnej dominacji” dzikiego wariantu p53 (publikacja 4. osiągnięcia)**

W okresie poprzedzającym powyższe badania prowadziłem funkcjonalne, biochemiczne doświadczenia nad dzikim wariantem białka p53. Większość badań biochemicznych z użyciem oczyszczonych białek, w warunkach *in vitro*, została zawarta w mojej pracy doktorskiej (uzyskana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, 2008). Po uzyskaniu stopnia doktora prowadziłem dodatkowe doświadczenia głównie nad relacją dzikiego i zmutowanych wariantów *TP53* w ludzkich komórkach. Sumarycznie wyniki te zawarte zostały w dwóch pracach wymienionych jako uzupełnienie głównego cyklu osiągnięcia (Walerych et al., 2010; Walerych et al., 2009). Zarówno wyniki wykorzystane pracy doktorskiej, jak uzyskane po jej otrzymaniu, przy współudziale innych autorów publikacji (dokładnie - niezawarte w pracy doktorskiej były: ryc. 1,2 i 5 publikacji (Walerych et al., 2009) oraz Ryc. 1,2 i 4 publikacji (Walerych et al., 2010)) wskazywały, że dziki wariant p53 podlega podobnym mechanizmom regulacji konformacji i aktywności, jak zmienione mutacjami warianty p53. Mechanizmy te mogą promować odpowiednio: wspomaganie onkosupresorowej funkcji dzikiego wariantu *TP53* lub onkogennej roli mutantów *TP53*. W wymienionych dwóch pracach zostało to pokazane na przykładzie białek opiekuńczych – z rodzin Hsp90, Hsp70 i Hsp40. Białka te potrafią skutecznie zapobiegać termicznej inaktywacji dzikiego wariantu białka p53 w warunkach fizjologicznych dla ludzkiej komórki (37°C), jak i w przypadku krótkotrwałego stresu termicznego. Gdy jednak wiążą zmienione mutacjami punktowymi warianty p53 – nie mogą przywrócić ich natywnej konformacji i aktywności, stabilizują je i przyczyniają się do wzmocnienia aktywności onkogennej zmutowanych wariantów genu *TP53* w komórkach (Walerych et al., 2010; Walerych et al., 2009).

Powyższe obserwacje spowodowały, że już przed rokiem 2010 rozpocząłem osobny projekt poświęcony relacji dzikich i zmienionych mutacjami białek p53, w przypadku gdy znajdują się jednocześnie w komórce – np. w sytuacji heterozygotycznej komórki +/-mut *TP53*. Celem projektu było wyjaśnienie jak wydajnie oligomeryzują dziki i zmienione mutacjami białka p53 oraz które z nich „przeważa” funkcjonalnie. Ze względu na słabą wiedzę na temat szczegółów mechanizmów uzyskiwania onkogennej funkcji przez mutanty *TP53* przed rokiem 2010, badania te udało się dokończyć dopiero dzięki innym publikacjom tego cyklu, a w szczególności pracy (Walerych et al., 2016b), która pokazała wspólny dla wielu mutantów *TP53* program molekularny (opisany wyżej, w punkcie 3). Całość wyników badań tego projektu, uzyskanych zarówno przed 2010 rokiem (żadne z nich nie zostały zawarte w pracy

doktorskiej), jak i w latach 2016-8, została ostatecznie opublikowana w manuskrypcie (Walerych et al., 2018).

Najważniejsze wnioski wynikające z publikacji (Walerych et al., 2018) są następujące:

- a) Wydajność specyficznej oligomeryzacji (dimeryzacji i tetrameryzacji) białek p53 z fluorescencyjnymi znacznikami molekularnymi CFP i YFP można zmierzyć ilościowo w żywych komórkach metodą bezpromienistego transferu energii – FRET (Forster Resonance Energy Transfer). Pomiarów można dokonywać zarówno na populacjach komórek w zawieszynie - za pomocą spektrofluorymetrii, jak w pojedynczych komórkach i ich kompartmentach - za pomocą mikroskopii konfokalnej.
- b) Pomiar wydajności FRET w ludzkich komórkach raka płuca wykazały po raz pierwszy, że dziki wariant białka p53 oligomeryzuje wydajniej niż warianty p53 zmienione mutacjami punktowymi, często występujące w nowotworach człowieka. Wynik ten został uzyskany poprzez bezpośrednie pomiary FRET, konkurencję z FRET nieznakowanymi wariantami p53 i potwierdzony metodą koimmunoprecypitacji.
- c) Funkcjonalnym skutkiem wydajniejszej oligomeryzacji dzikiego wariantu białka p53 jest nieopisany wcześniej efekt „dominacji pozytywnej” – inaktywacji onkogennych funkcji zmienionych mutacjami wariantów p53 przez dzikie białko p53. Onkogenny efekt funkcjonalny mutantów *TP53* został zmierzony m.in. dzięki monitorowaniu aktywacji transkrypcji genów proteasomu 26S, na podstawie metod z wcześniejszych publikacji (Lisek et al., 2017; Walerych et al., 2016b). „Dominacja pozytywna” współistnieje ze znanym w badaniach nad białkiem p53 efektem odwrotnym - „dominacją negatywną”, czyli hamowaniem dzikiego wariantu p53 przez warianty zmienione mutacjami. „Dominacja pozytywna” jest jednak wydajniejsza. „Dominacja pozytywna” zachodzi w sposób statystycznie znaczący już przy stosunku ilościowym ok. 1:1 dzikiego do zmutowanych p53 w komórce, podczas gdy wydajna „dominacja negatywna” wymaga przynajmniej dwukrotnej przewagi ilościowej zmienionych mutacjami wariantów p53.

Wyniki te po raz pierwszy pokazały, iż oligomeryzacja białka p53 nie jest jednakowo wydajna dla dzikich i zmienionych punktowymi mutacjami onkogennymi wariantów p53, a także, iż dzikie warianty p53 mogą inaktywować zmutowane. Ma to wiele punktów odniesienia i jest często potwierdzane w szeregu publikacji innych autorów opisanych w dyskusji pracy (Walerych et al., 2018). Publikacje te pokazują jak dziki wariant p53 przeważa funkcjonalnie nad zmutowanymi w mysich modelach nowotworzenia zależnych od mutacji w genie *Trp53*, oraz iż dziki allel *TP53* jest najczęściej inaktywowany przez mechanizmy utraty heterozygotyczności (LOH) u pacjentów z nowotworami zawierającymi mutacje *TP53*. Wnioski z publikacji (Walerych et al., 2018) w żaden sposób nie zaprzeczają silnej onkogennej roli mutantów *TP53* – pokazują jedynie, że funkcjonalna dominacja dzikiego wariantu p53 wymusza bardzo częstą w nowotworach akumulację zmienionych mutacjami białek p53 oraz eliminowanie z komórek nowotworowych dzikiego wariantu p53. Opisywany w licznych publikacjach efekt negatywnej dominacji mutantów *TP53* jest obecny, ale jedynie przy dużej przewadze ilościowej mutantów p53 nad dzikim p53 – podczas gry zwykle w komórkach nowotworowych dziki wariant p53 jest zupełnie eliminowany z komórek.

Wyższa wydajność oligomeryzacji i dominacja funkcjonalna dzikich wariantów p53 potwierdzają natomiast zasadność stosowania i poszukiwania sposobów na zahamowanie zmienionych częstymi mutacjami punktowymi wariantów p53, przy jednoczesnej reaktywacji antynowotworowych właściwości dzikiego wariantu białka p53. Takie właśnie cechy posiada lek APR-246 (PRMIA-1MET), którego użycie w nowych protokołach przedklinicznych zostało opisane w punkcie 4.

## 5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze:

**a) działalność dydaktyczna** - promotor pomocniczy w: pracy magisterskiej (mgr Łukasz Żyła, 2009, obroniona na SGGW, Warszawa), trzech pracach doktorskich obronionych (dr Carolina Marotta, dr Valeria Capaci, dr Kamil Lisek – Uniwersytet w Trieście, Włochy, 2013-15) i jednej pracy doktorskiej w toku (mgr Zuzanna Staszczak, IMDiK PAN, Warszawa). Prowadzenie cyklu wykładów o biologii molekularnej nowotworów dla studentów i doktorantów uniwersytetu w Trieście – język angielski i włoski (2012-2015). Doniesienia zjazdowe (plakaty lub/i seminaria) na ok. 20 międzynarodowych konferencjach naukowych w latach 2003-2018.

**b) działalność popularyzatorska** - prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla stypendystów Krajowej Fundacji na Rzecz Dzieci (2002-2006). Organizacja warsztatów i zajęć warszawskiego Festiwalu Nauki (m.in. pomysły i prowadzenie panelu „Ewolucja Życia na Ziemi – duchowni i naukowcy w dyskusji” oraz warsztatów – „Klonujemy gen” i „Zbadaj swój DNA” – lata 2000-2008). Tłumaczenie artykułów dla czasopisma „Świat nauki” (2005-2007). Przygotowanie pokazów popularyzatorskich dla szerokiej publiczności w ramach „Dnia otwartego” Jednostki Onkologii Molekularnej, LNCIB, Triest, Włochy (2012-2016).

**c) działalność organizacyjna** - Prowadzenie merytoryczne zespołu trojga badaczy/doktorantów w ramach Jednostki Onkologii Molekularnej, LNCIB, Triest, Włochy (2012-2016). Pomysł naukowy i zdobycie funduszy na założenie Samodzielnej Pracowni Multi-omiki Chorób Człowieka w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (2016-2018). Od roku 2018 – kierowanie Pracownią Multi-omiki Chorób Człowieka IMDiK PAN – zakup wyposażenia, zatrudnienie pracowników, organizacja współpracy naukowych, realizacja od 2018 roku jako kierownik łącznie 4 grantów z Narodowego Centrum Nauki i Komisji Europejskiej. Więcej informacji na stronie internetowej pracowni: <http://imdik.pan.pl/pl/dzialalnosc-naukowa/zaklady-badawcze/1067-pracownia-multi-omiki-chorob-czlowieka>

## Bibliografia:

Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., and Olivier, M. (2016). *TP53* Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC *TP53* Database and Genomics Data. *Hum Mutat* 37, 865-876.

Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.

Garibaldi, F., Falcone, E., Trisciuglio, D., Colombo, T., Lisek, K., Walerych, D., Del Sal, G., Paci, P., Bossi, G., Piaggio, G., and Gurtner, A. (2016). Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex. *Oncogene* 35, 3760-3770.

Girardini, J. E., Walerych, D., and Del Sal, G. (2014). Cooperation of p53 mutations with other oncogenic alterations in cancer. In *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*, (Springer Netherlands), pp. 41-70.

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339.

Lisek, K., Campaner, E., Ciani, Y., Walerych, D., and Del Sal, G. (2018). Mutant p53 tunes the Nrf2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget* 9, 20508-20523.

Lisek, K., Walerych, D., and Del Sal, G. (2017). Mutant p53-Nrf2 axis regulates the proteasome machinery in cancer. *Mol Cell Oncol* 4, e1217967.

Mantovani, F., Walerych, D., and Sal, G. D. (2017). Targeting mutant p53 in cancer: a long road to precision therapy. *FEBS J* 284, 837-850.

Menegon, S., Columbano, A., and Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol Med* 22, 578-593.

Tsuchida, N., Murugan, A. K., and Grieco, M. (2016). Kirsten Ras\* oncogene: significance of its discovery in human cancer research. *Oncotarget* 7, 46717-46733.

Walerych, D., Gutkowska, M., Klejman, M. P., Wawrzynow, B., Tracz, Z., Wiech, M., Zylicz, M., and Zylicz, A. (2010). ATP binding to Hsp90 is sufficient for effective chaperoning of p53 protein. *J Biol Chem* 285, 32020-32028.

Walerych, D., Lisek, K., and Del Sal, G. (2015). Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand. *Front Oncol* 5, 289.

Walerych, D., Lisek, K., and Del Sal, G. (2016a). Multi-omics reveals global effects of mutant p53 gain-of-function. *Cell Cycle* 15, 3009-3010.

Walerych, D., Lisek, K., Sommaggio, R., Piazza, S., Ciani, Y., Dalla, E., Rajkowska, K., Gaweda-Walerych, K., Ingallina, E., Tonelli, C., et al. (2016b). Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat Cell Biol* 18, 897-909.

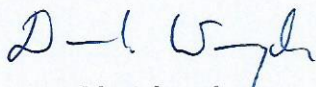
Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., and Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 33, 2007-2017.

Walerych, D., Olszewski, M. B., Gutkowska, M., Helwak, A., Zylicz, M., and Zylicz, A. (2009). Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. *Oncogene* 28, 4284-4294.

Walerych, D., Pruszko, M., Zyla, L., Wezyk, M., Gaweda-Walerych, K., and Zylicz, A. (2018). Wild-type p53 oligomerizes more efficiently than p53 hot-spot mutants and overcomes mutant p53 gain-of-function via a "dominant-positive" mechanism. *Oncotarget* 9, 32063-32080.

Zehir, A., Benayed, R., Shah, R. H., Syed, A., Middha, S., Kim, H. R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S. M., et al. (2017). Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23, 703-713.

**Z wyrazami szacunku;**



**Dawid Walerych**