

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO

Paweł Karol MAZUR

2. WYKSZTAŁCENIE I STOPNIE NAUKOWE

- 10.02.2010 *Dyplom Doktora nauk biologicznych* (Doktor der Naturwissenschaften).
Rozprawa doktorska na temat „*Roli receptorów Notch w rozwoju i karcynogenezie trzustki*” (ang. *The role of Notch signaling in development and tumorigenesis*) przedłożona dnia 10.02.2010 i obroniona dnia 22.11.2010 z najwyższym wyróżnieniem (*Summa cum laude*) na Monachijskim Uniwersytecie Technicznym (Technischen Universität München), Niemcy.
Promotorzy: Prof. Dr Michael Schemann, Prof. Dr Roland M. Schmid i PD Dr Jens T. Siveke.
Członkowie komisji: Prof. Dr Martin Klingenspor, Prof. Dr Martin Hrabé de Angelis, Prof. Dr Michael Schemann, Prof. Dr Roland M. Schmid.
- 2005-2010 *Studia doktoranckie* w Instytucie Biochemii im. Maxa Plancka i Monachijskim Uniwersytecie Technicznym – Szpital Uniwersytecki „Rechts der Isar”, Niemcy.
- 29.07.2005 *Dyplom magisterski* z zakresu biologii molekularnej z najwyższym wyróżnieniem (*Summa cum laude*). Praca magisterska wykonana pod opieką Prof. Dr. hab. Andrzeja Jerzmanowskiego.
- 17.06.2003 *Dyplom licencjacki* z zakresu biologii molekularnej z najwyższym wyróżnieniem (*Summa cum laude*). Praca licencjacka wykonana pod opieką Prof. Dr. hab. Andrzeja Jerzmanowskiego.
- 1996-2000 Liceum Ogólnokształcące im. Janka Bytnara w Kolbuszowej.

3. ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- od 9/2015 *Adiunkt* (non-tenured staff scientist), Uniwersytet Stanforda, Wydział Medycyny, Departament Genetyki i Departament Pediatrii, Kalifornia, USA
- 2010-2015 *Staż podoktorski*, Uniwersytet Stanforda, Wydział Medycyny, Departament Genetyki i Departament Pediatrii, Kalifornia, USA
- 2005-2010 *Doktorant* w Instytucie Biochemii Maxa Plancka i na Monachijskim Uniwersytecie Technicznym, Szpital Uniwersytecki „Rechts der Isar”, Niemcy
- 2001-2005 *Wolontariusz i stażysta* w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk i na Uniwersytecie Warszawskim, Laboratorium Prof. Dr. hab. Andrzeja Jerzmanowskiego, Warszawa

4. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.), wskazuję jednotematyczny cykl czterech publikacji, zatytułowany:

Identyfikacja molekularnych mechanizmów patogenezы i nowych celów terapeutycznych w raku trzustki

Cykl czterech publikacji pełnotekstowych opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (IF: 107,5; MNiSW: 195). Cykl ten obejmuje wyłącznie publikacje, w których jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Mój udział obejmował kierowanie zespołem badawczym, uzyskanie funduszy, planowanie i wykonanie eksperymentów, analiza wyników oraz pisanie manuskryptu.

4b. Lista artykułów pełnotekstowych tworzących cykl (autorzy, tytuły, czasopismo):

Opis mojego udziału, w tym procentowego, w wykonaniu poniższych prac zawiera załącznik 3. Oświadczenia współautorów publikacji znajdują się w załączniku 4. Kopie prac zostały zebrane w załączniku 5.

1. **Mazur PK#***, Herner A*, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sanchez-Rivera FJ, Lofgren S, Hahn SA, Vangala D, Trajkovic-Arsic M, Gupta A, Heid I, Noël PB, Braren R, Kuschma T, Sayles LC, Erkan M, Kleeff J, Sipos B, Heikenwälder M, Esposito I, Jacks T, Bradner JE, Khatri P, Sweet-Cordero EA, Attardi LD, Schmid RM, Schneider G, Sage J#, Siveke#. *contributed significantly; #co-corresponding authors

Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma.

Nature Medicine. 2015.

IF=28,2; MNiSW=50

2. **Mazur PK***, Reynoird N*, Khatri P, Jansen PW, Wilkinson AW, Liu S, Barbash O, Van Aller GS, Huddleston M, Dhanak D, Tummino PJ, Kruger RG, Garcia BA, Butte AJ, Vermeulen M, Sage J, Gozani O. *contributed significantly

SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer.

Nature. 2014.

IF=41,6; MNiSW=50

3. Jameson KL*, **Mazur PK***, Zehnder AM, Zhang J, Zarnegar B, Sage J, Khavari PA, *equally contributed

IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAPK-driven tumors.

Nature Medicine. 2013.

IF=28,1; MNiSW=50

Summaryczny współczynnik wpływu: IF=97,7

Summaryczna punktacja wg. klasyfikacji MNiSW: 150

4c. Opis celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania

Cel i zakres badań

Problematyka mojej pracy naukowej koncentruje się na procesach transformacji nowotworowej trzustki. Histopatologicznie zdecydowaną większość raków trzustki u ludzi stanowi gruczolak przewodowy trzustki (ang. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC). Gruczolakorak trzustki należy do nowotworów o najgorszym rokowaniu. Średni czas przeżycia od rozpoznania wynosi ok. 6 miesięcy i od czterech dekad nie uległ on większej zmianie (Mitry et al. 2008; Vincent et al. 2011). Znakomita większość (ok. 95%) przypadków PDAC jest powodowana aktywującymi mutacjami w gene *Kras*. GTPaza K-RAS uczestniczy w aktywacji wielu szlaków sygnalizacji komórkowej powodujących powstanie i agresywny wzrost raka trzustki. Zarówno K-RAS, jak i białka zależne są zatem potencjalnymi celami terapeutycznymi. Głównym celem moich badań jest odkrycie molekularnych mechanizmów patogenezy raka trzustki w celu identyfikacji nowych celów terapeutycznych i potwierdzenie ich użyteczności z wykorzystaniem przedklinicznych technik medycyny translacyjnej.

Streszczenie uzyskanych wyników

Moje badania, zebrane w przedstawionym poniżej cyklu publikacji, dostarczają kilku cennych odkryć w zakresie mechanizmów nowotworzenia. Najważniejsze to:

- I. Odkrycie synergii terapeutycznej pomiędzy inhibitorami białek BET i HDAC, biorących udział w regulacji epigenetycznej wraz z odkryciem mechanizmu molekularnego ich działania.**

Ostatnio opublikowane badania sekwencji genomowej komórek raka trzustki odkryły szereg mutacji w genach kodujących białka związane z regulacją epigenetyczną (Biankin et al. 2012; Witkiewicz et al. 2015). Sugeruje to ich ważną rolę jako potencjalnych celów interwencji terapeutycznej (McCleary-Wheeler et al. 2013).

Moje badania z wykorzystaniem ludzkich komórek raka trzustki oraz genetycznie zmodyfikowanych endogennych zwierzęcych modeli raka trzustki (modele omówione w pracy

poglądowej (Mazur and Siveke 2012)) pozwoliło zidentyfikować inhibitor - JQ1 jako potencjalny terapeutyk. JQ1 działa poprzez hamowanie aktywności białek z rodziny BET (ang. bromodomain and extraterminal protein, BET), (Delmore et al. 2011). Z kolei białka BET kontrolują „odczytywanie” znaków acetylacji histonów, czyli proces istotny w regulacji transkrypcji genów.

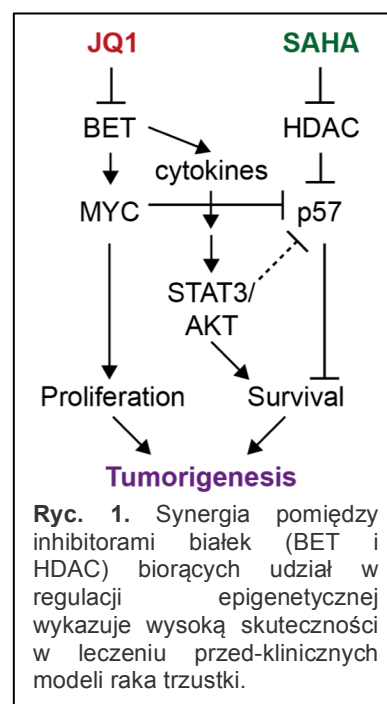
Szczegółowe badania wykazały, że JQ1 skutecznie blokuje inicjację nowotworów trzustki u myszy i hamuje proliferację komórek rakowych. Co istotne terapia inhibitorem JQ1 zaawansowanego endogennego raka trzustki u myszy powoduje statystycznie znaczące wydłużenie przeżywalności (o ok 60%) i zmniejszenie lub ograniczenie wzrostu objętości nowotworu mierzonej *in vivo* w czasie rzeczywistym metodą rezonansu magnetycznego (MRI) za pomocą sekwencji T2-zależnych.

Następnie analiza markerów nowotworowych i ekspresji genów z użyciem mikromacierzy pozwoliła na zidentyfikowanie molekularnych mechanizmów powodujących pozytywną odpowiedź terapeutyczną. Mechanizm działania JQ1 powoduje zahamowanie funkcji białek BET, co powoduje transkrypcyjną represję genów cytokin wywołujących proces zapalny, który związany jest ściśle z patogenezą raka trzustki. Ponadto JQ1 zmniejsza aktywności sygnalizacji MYC. Dalsze badanie z wykorzystaniem knockoutu genowego *Myc* zidentyfikowało szczególnie ważną rolę tego białka w procesie nowotworzenia trzustki.

Jednak, terapia z użyciem samego inhibitora JQ1 lub skojarzona z chemioterapeutyką gemcytabiną nie wykazała pełnej skuteczności, gdyż testowany model zwierzęcy rozwija szybką oporność.

W celu identyfikacji potencjalnej synergii terapeutycznej, przeprowadziłem badanie przesiewowe serii specyficznych inhibitorów w kombinacji z JQ1. Analiza wykazała silną synergię pomiędzy JQ1 a SAHA (Vorinostat) czyli inhibitorem deacetylazy histonowej (HDAC). Użycie kombinacji dwóch terapeutyków (JQ1+SAHA) w leczeniu przed-klinicznym modeli zwierzęcych raka trzustki wykazało ponad 3-krotny wzrost przeżywalności i remisję czyli ponad 30% zmniejszenie objętości nowotworu u wszystkich zwierząt. Nowotwór był mierzony nowatorską techniką rezonansu magnetycznego (MRI) za pomocą sekwencji T2-zależnych w czasie rzeczywistym.

Dalsze badania immunohistologiczne i biochemiczne wykazały znaczące zahamowanie proliferacji i indukcję apoptozy w nowotworach *in vivo* i komórkach rakowych *in vitro* leczonych terapią skojarzoną (JQ1+SAHA). Analiza markerów nowotworowych i ekspresji genów z użyciem



Ryc. 1. Synergia pomiędzy inhibitorami białek (BET i HDAC) biorących udział w regulacji epigenetycznej wykazuje wysoką skuteczności w leczeniu przed-klinicznych modeli raka trzustki.

mikromacierzy pozwoliła na zidentyfikowanie molekularnych mechanizmów powodujących pozytywną odpowiedź terapeutyczną, w tym odblokowanie ekspresji genu pro-apoptotycznego *p57/CDKN1C* (Vlachos et al. 2007). Dalsze badanie z zastosowaniem po raz pierwszy metody CRISPR (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) do edytowania DNA w trzustce myszy poprzez wirusowe wprowadzenie nukleazy Cas9 i sgRNA do tkanki zwierzęcia potwierdziły szczególnie ważną rolę *p57/CDKN1C* w odpowiedzi na terapię (**Ryc.1**)

Przedstawione powyżej odkrycie synergii terapeutycznej pomiędzy inhibitorami białek (BET i HDAC) biorących udział w regulacji epigenetycznej jest pierwszym, które wykazało wysoką skuteczność w leczeniu przed-klinicznych modeli raka trzustki. Ponadto po raz pierwszy zastosowano tu metodę CRISPR do wytworzenia mutacji w komórkach somatycznych w trzustce myszy co pozwoliło na sprawne potwierdzenie roli *p57* w odpowiedzi terapeutycznej.

Wyniki omówionych badań zostały opublikowane w: **Mazur PK et al.** *Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma.* **Nature Medicine.** 2015. IF=28,2 ; MNiSW=50

Wyniki tych badań były komentowane w:

- **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** Highlight: *Targeting chromatin remodeling proteins to treat pancreatic cancer* (Thomas 2015).
- **Cancer Discovery** Research Watch: *Combination therapy with the epigenetic drugs JQ1 and SAHA inhibits PDAC* (Editorial. 2015b).
- **Science Daily** News: *Combination drug therapy shrinks pancreatic tumors in mice* (Editorial. 2015a).

II. Odkrycie molekularnego mechanizmu działania metylotransferazy SMYD3 w regulacji szlaku sygnalizacji onkogennej K-Ras.

Mutacje aktywujące w onkogenie RAS są jednymi z najczęściej wykrywanych mutacji nowotworowych (dotyczą ponad 30% wszystkich nowotworów i 95% nowotworów trzustki). Z kolei kontrolowany przez RAS szlak sygnalizacji RAS-RAF-MEK-ERK jest jednym z najważniejszych celów terapeutycznych (Pylyayeva-Gupta et al. 2011). Jednak rozwój oporności i toksyczność są głównymi ograniczeniami dla stosowania inhibitorów sygnalizacji RAS. Rozwój nowych i komplementarnych terapii pozwalających skutecznie zablokować nowotwory niosące mutacje RAS stanowią pilną potrzebą kliniczną.

Aberracyjne zmiany w aparacie potranslacyjnej modyfikacji białek są charakterystyczną cechą komórek rakowych (Helin and Dhanak 2013). Zmiany we wzorze metylacji białek odgrywają tu szczególną rolę, ale mechanizmy działania metylaz lizyn białkowych (Lysine Methyltransferase, KMT) są słabo rozpoznane w procesach nowotworzenia. KMT są potencjalnie cennymi celami terapii przeciwnowotworowej, również ze względu na łatwość wytworzenia specyficznych inhibitorów.

Przeprowadziłem analizę ekspresji wszystkich metylotransferaz białkowych w raku trzustki i wykazałem, że najbardziej nadreprezentowaną w porównaniu z normalnym poziomem w trzustce jest metylaza białkowa SMYD3. SMYD3 jest enzymem o bardzo mało znanej roli i mechanizmie działania.

Moja analiza zwierzęcych modeli raka trzustki i niedrobnokomórkowego raka płuc z wykorzystaniem knockoutu w genie *Smyd3* i aktywującą mutacją *Kras* wykazały, że rozwój nowotworów jest zredukowany i powoduje znaczące wydłużenie przeżywalności w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Doświadczenia *in vivo* z ponownym wprowadzeniem dzikiego *Smyd3*-WT ale nie zmutowanego *Smyd3*-F183A genu (mutacja F183A pozbawia aktywności enzymatycznej) do komórek pozbawionych *Smyd3* przywraca pełną zdolność transformacji nowotworowej. Dowodzi to, że obserwowana rola SMYD3 jest wywołana funkcją enzymatyczną. Następnym etapem mojej pracy była identyfikacja substratu metylazy białkowej SMYD3. Użyłem macierzy białkowej (protein array) (Levy et al. 2011) w celu przebadania ponad 9000 białek jako potencjalnych substratów dla SMYD3. Pośród nich tylko kinaza białkowa MAP3K2 (Maruyama et al. 2010) została zidentyfikowana jako specyficzny substrat. Następnie rezultat badań został potwierdzony i dodatkowo rozpoznany jako potrójna metylacja lizyny 260 białka MAP3K2 K260 przez analizę w spektrometrze masowym. Kolejnym krokiem było wytworzenie przeciwciała rozpoznającego metyl-MAP3K2 K260 i potwierdzenie utraty tej specyficznej metylacji w nowotworach pozbawionych SMYD3.

W celu zbadania funkcji kinazy białkowej MAP3K2, której rola nie była rozpoznana w komórkach raka trzustki, przeprowadziłem szczegółowe badania. Analizy wykazały istotną rolę w aktywacji sygnalizacji RAS (m.in. wzrost aktywacji ERK1/2), proliferacji i potencjału nowotworowego.

Moje badania wykazały, że kontrolowana przez SMYD3 metylacja MAP3K2 podwyższa aktywność kinaz bezpośrednio fosforylowanych przez MAP3K2, ale co ciekawe nie zmienia wewnętrznej aktywności enzymatycznej MAP3K2. Dzięki badaniom z użyciem proteomiki ilościowej SILAC (ang. Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), wykryłem że niemetylowany, w przeciwieństwie do metylowanego, fragment MAP3K2 wiąże specyficznie holoezycznym fosfatazę PP2A poprzez jej regulatorową podjednostkę PPP2R2A (Eichhorn et al.

2009). Blokada fosfatazy PP2A poprzez inhibitor kantarydynę (ang. cantharidine), (Li and Casida 1992) wywołuje podobny efekt (tj. spadek MAP3K2) jak utrata SMYD3. To odkrycie zostało następnie potwierdzone biochemicznie dowodząc, że SMYD3 poprzez metylację kinazy MAP3K2 powoduje zmniejszenie jej powinowactwa do fosfatazy PP2A zwiększając tym samym aktywację onkogenego szlaku sygnalizacji RAS w komórkach raka (**Ryc. 2**).

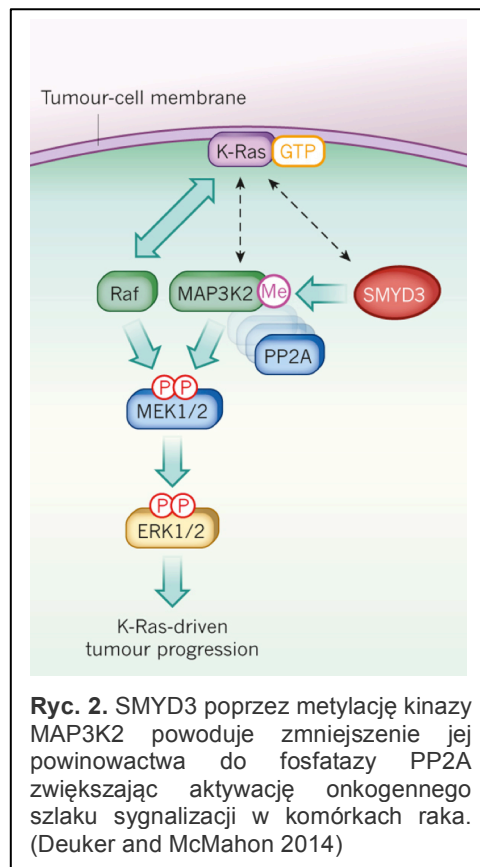
Zgodnie z odkrytym mechanizmem, genetyczna lub farmakologiczna blokada metylazy SMYD3 doprowadzi do obniżenia aktywności sygnalizacji RAS i zahamowania wzrostu nowotworu. A zatem istotnym zastosowaniem mojego odkrycia jest potencjalna synergia z innymi inhibitorami ścieżki sygnalizacji RAS. W celu potwierdzenia takiego zastosowania potencjalnych inhibitorów SMYD3, przeprowadziłem badania przed-kliniczne z użyciem genetycznie zmodyfikowanych zwierzęcych modeli raka trzustki z knockoutem w genie *Smyd3* i inhibitorem kinazy MEK (Tramatenib). Badanie wykazało, że nowotwory pozbawione SMYD3 są bardziej wrażliwe na inhibitor MEK. Ponadto, 10-krotne obniżenie ilości podanego inhibitora

MEK nadal wykazuje silne działanie terapeutyczne w nowotworach u myszy pozbawionych SMYD3, ale nie u zwierząt niezmodyfikowanych. Ponadto, doświadczenia z wykorzystaniem knockoutu w genie *Smyd3* wykazały, że zwierzęta pozbawione białka SMYD3 są w pełni zdrowe, co sugeruje małą toksyczność terapii z wykorzystaniem inhibitorów metylazy białkowej SMYD3.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w: Mazur PK et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature*. IF=41,5 ; MNiSW=50

Wyniki tych badań były komentowane w:

- **Nature News & Views: Cancer biology: Enzyme meets a surprise target** (Deuker and McMahon 2014).
- **Cell Research Highlight: Cancer signaling: when phosphorylation meets methylation** (Ying and DePinho 2014)
- **Science Signaling** Editors' choice: *MAPK Methylation Potentiates RAS Signaling* (Ferrarelli 2014).



- **Cancer Discovery** Research Watch: *Methylation of MAP3K2 by SMYD3 contributes to RAS-driven oncogenesis* (Editorial 2014).

III. Analiza funkcji i odkrycie zastosowania białka rusztowania IQGAP1 w celu blokady szlaku sygnalizacji RAS.

Kinazy aktywowane mitogenami (ang. Mitogen - Activated Protein Kinases, MAPK) to grupa kinaz białkowych serynowo-treoninowych, odgrywających rolę w regulacji odpowiedzi na sygnały zewnętrzne dochodzące do komórki (mitogeny). MAPK są aktywowane w wyniku interakcji z białkami należącymi do rodziny małych białek GTPazowych, takich jak RAS. Mutacje aktywujące MAPK, w tym onkogenu RAS są jednymi z najczęściej wykrywanych mutacji nowotworowych (ponad 30% wszystkich nowotworów i 95% nowotworów trzustki), a szlak sygnalizacji RAS-RAF-MEK-ERK jest jednym z najważniejszych celów terapeutycznych (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Zależność od aktywacji MAPK („oncogene addiction”) jest jednym z paradygmatów biologii nowotworów dobrze udokumentowanym na przykładzie czerniaka (melanoma), (Flaherty et al. 2010; Flaherty et al. 2012). Jednak silna i szybka remisja czerniaka (podobnie jak przypadku raka trzustki - obserwacje własne) w odpowiedzi na inhibitory RAF lub MEK jest równie szybko wytracana na skutek rozwoju oporności lekowej (Solit and Rosen 2011). W dodatku sygnalizacja MAPK jest ważna w normalnej homeostazie komórek, zatem wszelkie inhibitory niosą ze sobą niebezpieczeństwo toksyczności i szczególnie uciążliwych skutków ubocznych. Między innymi z tych powodów niedawno przeprowadzony eksperyment kliniczny z wykorzystaniem inhibitora MEK okazał się bezskuteczny w leczeniu raka trzustki (Infante et al. 2014). Istnieje zatem duża potrzeba rozwoju nowych terapii pozwalających skutecznie zablokować szlak sygnalizacji RAS-RAF-MEK-ERK.

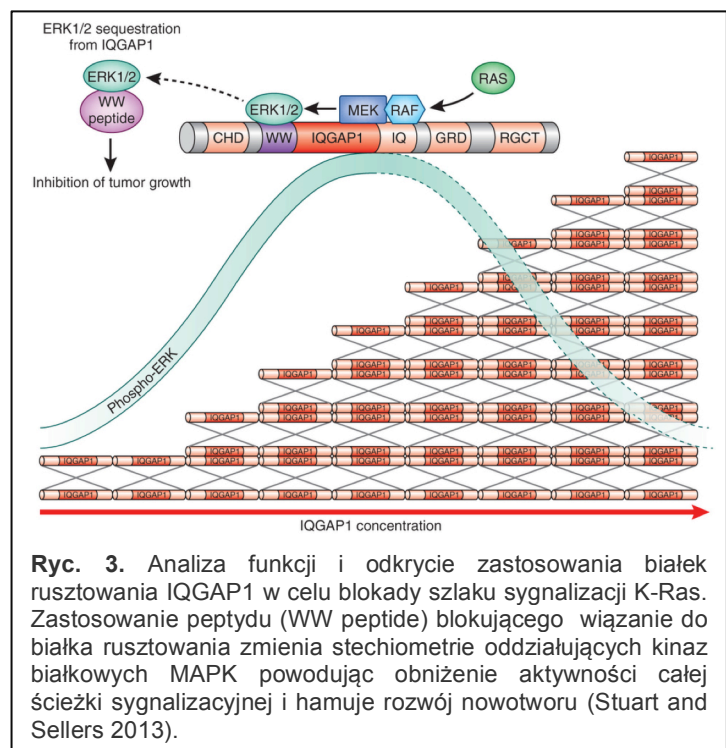
Białka rusztowania pełnią szczególną rolę organizacyjną poprzez wiązanie elementów kaskad sygnalizacyjnych, usprawniają ich funkcję i integrują przepływ sygnału w komórce (Langeberg and Scott 2015). Moja praca identyfikuje białko rusztowania IQGAP1 (IQ motif-containing GTPase activating protein 1) jako szczególnie ważne dla transformacji nowotworowej inicjowanej mutacjami w ścieżce sygnalizacji RAS. IQGAP1 wiąże kinazy RAF i MEK poprzez domenę IQ oraz kinazy ERK poprzez domenę WW powodując integrację sygnalizacji RAS-RAF-MEK-ERK (Johnson et al. 2009), (**Ryc. 3**).

Moje badania wykazały, że wprowadzenie zmiany w stechiometrycznym bilansie pomiędzy białkiem rusztowania a wiązany przez nie kinazami oferuje możliwość ingerencji terapeutycznej. Na przykład wykazałem, że zwierzęta pozbawione genu *Iqgap1* nie poddają się transformacji nowotworowej skóry. Z kolei nadekspresja samej domeny WW białka IQGAP1 (wiążącej kinazy ERK1 i ERK2) lub zastosowanie nowatorskiego peptydu (odpowiadającemu domenie WW) penetrującego komórkę blokuje pełną aktywację sygnalizacji ERK1/2 w komórkach rakowych trzustki i czerniaka. Ponadto użycie peptydu WW dootrzewnowo lub podskórnie z użyciem pompy osmotycznej skutecznie hamuje wzrost transplantowanych do myszy komórek czerniaka, jelita grubego i raka piersi niosącymi mutacje w genach kodujących kinazy MAPK. Co ważne peptyd WW nie hamuje wzrostu komórek rakowych niezmutowanych w genach MAPK, wskazując na precyzyjny i swoisty charakter terapii (**Ryc. 3**).

Następnie przeprowadziłem badania z użyciem przedklinicznych genetycznie zmodyfikowanych zwierzęcych modeli raka trzustki niosących mutacje w genie *Kras* i pozbawione supresora nowotworowego p53. Również te badania wykazały wysoką skuteczność samego peptydu WW lub terapii skojarzonej z chemoterapeutykami gemcytabiną. Leczenie zwierząt z zaawansowanym rakiem trzustki znacząco wydłużyło ich przeżywalność bez toksyczności obserwowanej podczas użycia inhibitorów MEK lub klasyczną chemioterapią.

Następnie wykazałem, że peptyd WW jest równie skuteczny w terapii czerniaka niosącego mutację *BRAF* i opornego na inhibitor kinazy BRAF (vemurafenib). To znacząco podnosi znaczenie mojej pracy dla pacjentów z zaawansowanymi i lekoopornymi nowotworami powodowanymi mutacjami w sygnalizacji MAPK.

Moje odkrycie peptydów blokujących wiązanie do białek rusztowania zmienia paradygmat myślenia o rozwoju nowych terapii poprzez bezpośrednie blokowanie kinaz (w tym MAPK) za pomocą inhibitorów. Ponadto doświadczenia z wykorzystaniem knockoutu w genie *Iqgap1* wykazały, że zwierzęta pozbawione białka IQGAP1 są w pełni zdrowe co sugeruje potencjalnie małą toksyczność nawet długiej terapii z wykorzystaniem peptydu WW.



Ryc. 3. Analiza funkcji i odkrycie zastosowania białek rusztowania IQGAP1 w celu blokady szlaku sygnalizacji K-Ras. Zastosowanie peptydu (WW peptide) blokującego wiązanie do białka rusztowania zmienia stechiometrię oddziałujących kinaz białkowych MAPK powodując obniżenie aktywności całej ścieżki sygnalizacyjnej i hamuje rozwój nowotworu (Stuart and Sellers 2013).

Wyniki badań zostały opublikowane w: **Jameson KL*, Mazur PK* et al.**, *IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAPK-driven tumors. Nature Medicine*. 2013. **equally contributed*. IF=28,1 ; MNiSW=50

Wyniki badań były też komentowane w:

- **Cancer Cell** Preview: *Mind the IQGAP* (Sanchez-Laorden et al. 2013).
- **Nature Medicine** News & Views: *Targeting RAF-MEK-ERK kinase-scaffold interactions in cancer* (Stuart and Sellers 2013).
- **Cancer Discovery** Research Watch: *Scaffold blockade inhibits oncogenic kinase signaling* (Editorial 2013)

Podsumowanie i kierunki kontynuacji badań

Gruczolakorak przewodowy trzustki, który jest moim głównym tematem badawczym, jest jednym z najgroźniejszych nowotworów człowieka. Ponad 75% chorych nie przeżywa pierwszych 12 miesięcy po rozpoznaniu, a 5-letnia przeżywalność oscyluje wokół 5% i nie uległa znaczącej zmianie od lat 70-tych ubiegłego wieku. W Europie i Stanach Zjednoczonych rak trzustki stanowi czwartą najczęstszą przyczynę zgonów z powodu nowotworów złośliwych. Niedawno przedstawiona analiza wskazuje, że do 2030 roku rak trzustki stanie się drugą, po raku płuc, przyczyną śmierci chorych onkologicznych wyprzedzając raka piersi i jelita grubego (Rahib et al. 2014). Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest wciąż brak jakiegokolwiek skutecznej terapii raka trzustki. Zauważając ten nabrzmiewający problem Prezydent i Parlament USA ustanowił nowe wytyczne (Ustawa o badaniach nowotworów nie poddających się terapii, ang. Recalcitrant Cancer Research Act) dla Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH). Zwiększają one nakłady finansowe i organizacyjne służące rozpoznaniu molekularnych mechanizmów i identyfikacji nowych celów terapeutycznych. Moje badania i plany wpisują się w ten wysiłek.

Używając precyzyjnych narzędzi medycyny translacyjnej, moim celem jest stworzenie precyzyjnych terapii (ang. precision medicine) przeciw rakowi trzustki i szybkie wprowadzenie ich do fazy badań klinicznych. Proponowana przeze mnie strategia zakłada działanie na czterech wzajemnie uzupełniających i wzmacniających się polach badawczych:

- I. Badanie dynamicznej odpowiedzi nowotworu na terapię i rozwój oporności lekowej z użyciem zwierzęcych modeli raka trzustki i tkanek rakowych transplutowanych od chorego do myszy (ang. Patient Derived tumor Xenograft, PDX), utrzymanych jako kopie

oryginalnego nowotworu pacjenta (ang. mouse avatars) (tak jak w mojej poprzedniej publikacji *Mazur et al., Nature Medicine, 2015*).

- II. Systematyczne poszukiwanie synergii lekowej z użyciem technik jednoczesnego (ang. multiplex assay) wyciszania genowego (ang. RNA interference, RNAi) dwóch sprzężonych ze sobą celów terapeutycznych lub połączonego z podaniem inhibitora w celu znalezienia skutecznego partnera terapeutycznego.
- III. Użycie metody CRISPR/Cas9 do budowy zwierzęcych modeli nowotworowych (metoda opracowana w mojej publikacji *Mazur et al., Nature Medicine, 2015*) w celu przeprowadzenia farmakogenetycznych badań przesiewowych. Ze względu na wąski indeks terapeutyczny wielu leków należy kompleksowo zbadać jakie zmiany mutacyjne predestynują do konkretnej terapii (ang. personalized medicine). Ponadto planuję przeprowadzić korelacje pomiędzy „molekularnymi rodzajami” raka trzustki powodowanymi specyficznym zestawem mutacji a stosowaniem konkretnych terapeutyków.
- IV. Zastosowanie zaawansowanych technik medycyny translacyjnej. Proponuję stworzenie „szpitala dla zwierzęcych modeli raka trzustki” w tym genetycznie zmodyfikowanych endogennych modeli mysich i tkanek rakowych transplutowanych od chorych do myszy (PDX). W celu precyzyjnej i dynamicznej kontroli rozwoju nowotworu planuję badać zwierzęta poddane terapii w czasie rzeczywistym metodą rezonansu magnetycznego (MRI) za pomocą sekwencji T2-zależnych w celu określenia objętości nowotworu i przypadków wystąpienia przerzutów.

Moje zamierzenia naukowe koncentrują się na budowie zespołu naukowego, który w sposób kompleksowy będzie odkrywał molekularne ścieżki sygnalizacji nowotworowej z użyciem genetycznie zmodyfikowanych zwierzęcych modeli raka trzustki. Uważam, że moje dotychczasowe doświadczenie i zdobyta wiedza pozwolą przełamać dotychczasowy impas w rozwoju terapii przeciwnowotworowych.

Bibliografia

- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu JM et al. 2012. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**: 399-405.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi JW, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J et al. 2011. BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell* **146**: 903-916.
- Deuker MM, McMahon M. 2014. Cancer Biology Enzyme Meets a Surprise Target. *Nature* **510**: 225-226.
- Editorial. 2013. Scaffold Blockade Inhibits Oncogenic Kinase Signaling. *Cancer Discov* **3**: 600-600.
- Editorial. 2014. Methylation of MAP3K2 by SMYD3 Contributes to RAS-Driven Oncogenesis. *Cancer Discov* **4**: 759.
- Editorial. 2015a. Combination drug therapy shrinks pancreatic tumors in mice, researchers say. *ScienceDaily*.
- Editorial. 2015b. Combination therapy with the epigenetic drugs JQ1 and SAHA inhibits PDAC. *Cancer Discov* **5**: 1119.
- Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. 2009. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Bba-Rev Cancer* **1795**: 1-15.
- Fernandez-Zapico ME. 2010. F1000Prime Recommendations, Dissents and Comments for [Mazur PK et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2010, 107(30):13438-43]. *F1000Prime* F1000Prime.com/4347956.
- Ferrarelli LK. 2014. MAPK Methylation Potentiates RAS Signaling. *Science Signaling* **7**: ec162-ec162.
- Helin K, Dhanak D. 2013. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* **502**: 480-488.
- Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM, Oh DY, Liu Y, Redhu S, Steplewski K et al. 2014. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* **50**: 2072-2081.
- Johnson M, Sharma M, Henderson BR. 2009. IQGAP1 regulation and roles in cancer. *Cell Signal* **21**: 1471-1478.
- Langeberg LK, Scott JD. 2015. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Bio* **16**: 232-244.
- Levy D, Liu CL, Yang Z, Newman AM, Alizadeh AA, Utz PJ, Gozani O. 2011. A proteomic approach for the identification of novel lysine methyltransferase substrates. *Epigenet Chromatin* **4**.
- Li YM, Casida JE. 1992. Cantharidin-Binding Protein - Identification as Protein Phosphatase-2a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 11867-11870.

- Maruyama T, Kadowaki H, Okamoto N, Nagai A, Naguro I, Matsuzawa A, Shibuya H, Tanaka K, Murata S, Takeda K et al. 2010. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *Embo J* **29**: 2501-2514.
- Mazur PK, Siveke JT. 2012. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**: 1488-1500.
- McCleary-Wheeler AL, Lombark GA, Weiss FU, Schneider G, Fabbri M, Poshusta TL, Duseti NJ, Baumgart S, Iovanna JL, Ellenrieder V et al. 2013. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis (vol 328, pg 212, 2012). *Cancer Lett* **337**: 143-144.
- Mitry E, Racht B, Quinn MJ, Cooper N, Coleman MP. 2008. Survival from cancer of the pancreas in England and Wales up to 2001. *Brit J Cancer* **99**: S21-S23.
- Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe MS et al. 2003. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**: 565-576.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* **11**: 761-774.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research* **74**: 2913-2921.
- Sanchez-Laorden B, Viros A, Marais R. 2013. Mind the IQGAP. *Cancer Cell* **23**: 715-717.
- Solit DB, Rosen N. 2011. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. *New Engl J Med* **364**: 772-774.
- Stuart DD, Sellers WR. 2013. Targeting RAF-MEK-ERK kinase-scaffold interactions in cancer. *Nat Med* **19**: 538-540.
- Thomas H. 2015. Targeting chromatin remodelling proteins to treat pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **12**.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* **378**: 607-620.
- Vlachos P, Nyman U, Hajji N, Joseph B. 2007. The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cell Death Differ* **14**: 1497-1507.
- Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, Mollaei M, Wagner KU, Koduru P, Yopp A et al. 2015. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* **6**.
- Ying HQ, DePinho RA. 2014. Cancer signaling: when phosphorylation meets methylation. *Cell Res* **24**: 1282-1283.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć nie wchodzących w skład habilitacji

Mój dorobek naukowy obejmuje: 18 prac eksperymentalnych (wszystkie z listy filadelfijskiej) oraz 3 prace przeglądowe i rozdział w podręczniku akademickim. W 10-ciu wymienionych publikacjach jestem pierwszym lub dodatkowo korespondencyjnym autorem. Ponadto, w moim dorobku naukowym znajduje się 15 streszczeń doniesień konferencyjnych publikowanych w czasopismach międzynarodowych oraz 4 referaty ustne na międzynarodowych konferencjach, 7 nagród za działalność naukową, kierownictwo 2 grantów na badania o łącznej wartości ca. 5 milionów złotych (1,25 mln USD) i współpraca w 3 grantach badawczych jako wykonawca (szczegółowa lista osiągnięć naukowych w załączniku nr 3).

Statystyka dorobku naukowego:

Liczba publikacji w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (*Journal Citation Reports*): **21**

Całkowity współczynnik wpływu (*Impact Factor, IF*): **270,37**

Całkowita liczba punktów wg. MNiSW: **789**

Całkowita liczba cytowań: **703**

Indeks Hirscha: **15**

Lista pozostałych publikacji nie wchodzących w skład habilitacji:

1. **Mazur PK**, Herner A, Neff F, Siveke JT. Podręcznik akademicki z serii **Methods in Molecular Biology** pt. Mouse Models of Cancer - Rozdział 9: *Current methods in mouse models of pancreatic cancer*, **Humana Press**, 2015
2. **Mazur PK**, Sage J. *Pancreatic cancer takes its Toll*. **J Exp Med**. 2015. IF=12,5; MNiSW=50
3. Chen R*, Khatri P*, **Mazur PK**, Polin M, Zheng Y, Vaka D, Hoang CD, Shrager J, Xu Y, Vicent S, Butte AJ, Sweet-Cordero EA. *A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma*. **Cancer Research**. 2014. *equally contributed, IF=9,3; MNiSW=45
4. Baumgart A*, **Mazur PK***, Anton M, Rudelius M, Schwamborn K, Feuchtinger A, Behnke K, Walch A, Braren R, Peschel C, Duyster J, Siveke JT, Dechow T. *Opposing role of Notch1 and Notch2 in a Kras(G12D)-driven murine non-small cell lung cancer model*. **Oncogene**. 2014 *equally contributed, IF=8,5; MNiSW=40

5. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, **Mazur PK**, Bielecki J. *Current methods in the molecular typing of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria*. **Biomed Res Int**. 2014. IF=2,7
6. Jahchan NS, Dudley JT*, Mazur PK*, Flores N, Yang D, Palmerton A, Zmoos AF, Vaka D, Tran KQ, Zhou M, Krasinska K, Riess JW, Neal JW, Khatri P, Park KS, Butte AJ, Sage J. *A drug repositioning approach identifies tricyclic antidepressants as inhibitors of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors*. **Cancer Discovery**. 2013 *equally contributed, IF=19,5; MNiSW=45
7. Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK, Lubeseder C, **Mazur PK**, Delgiorno KE, Carpenter ES, Halbrook CJ, Hall JC, Pal D, Briel T, Herner A, Trajkovic-Arsic M, Sipos B, Liou GY, Storz P, Murray NR, Threadgill DW, Sibilica M, Washington MK, Wilson CL, Schmid RM, Raines EW, Crawford HC, Siveke JT. *EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis*. **Cancer Cell**. 2012. IF=23,5; MNiSW=50
8. Grüner BM, Hahne H, **Mazur PK**, Trajkovic-Arsic M, Maier S, Esposito I, Kalideris E, Michalski CW, Kleeff J, Rauser S, Schmid RM, Küster B, Walch A, Siveke JT. *MALDI imaging mass spectrometry for in situ proteomic analysis of preneoplastic lesions in pancreatic cancer*. **PLoS One**. 2012. IF=3,2; MNiSW=40
9. Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, **Mazur PK**, Da Silva-Buttkus P, Bartsch DK, Langer P, Chiblak S, Dürr A, Höfler H, Klöppel G, Müller DK, Brielmeier M, Esposito I. *Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues*. **J Pathol**. 2012. IF=7,4; MNiSW=45
10. **Mazur PK**, Siveke JT. *Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology*. **Gut**. 2012. IF=14,7; MNiSW=45
11. **Mazur PK**, Riener MO, Jochum W, Kristiansen G, Weber A, Schmid RM, Siveke JT. *Expression and Clinicopathological Significance of Notch Signaling and Cell-Fate Genes in Biliary Tract Cancer*. **Am J Gastroenterology**. 2011. IF=10,8; MNiSW=45
12. Viatour P, Ehmer U, Saddic LA, Dorrell C, Andersen JB, Lin C, Zmoos AF, **Mazur PK**, Schaffer BE, Ostermeier A, Vogel H, Sylvester KG, Thorgeirsson SS, Grompe M, Sage J. *Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway*. **J Exp Med**. 2011. IF=12,5; MNiSW=50

13. Heid I, Lubeseder C, Sipos B, **Mazur PK**, Lesina M, Schmid RM, Siveke JT. *Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer. Gastroenterology*. 2011. IF=16,7; MNiSW=50
14. **Mazur PK**, Einwächter H, Lee M, Sipos B, Nakhai H, Rad R, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Klöppel G, Schmid RM, Siveke JT. *Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. IF=9,8; MNiSW=45
15. **Mazur PK**, Grüner BM, Nakhai H, Sipos B, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Schmid RM, Siveke JT. *Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras(G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo. PLoS One*. 2010. IF=3,2; MNiSW=40
16. Geisler F, Nagl F, **Mazur PK**, Lee M, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Schmid RM, Siveke JT. *Liver-specific inactivation of Notch2, but not Notch1, compromises intrahepatic bile duct development in mice. Hepatology*. 2008. IF=11,1; MNiSW=50
17. Nakhai H, Siveke JT, Klein B, **Mazur PK**, Algül H, Radtke F, Strobl L, Zimmer-Strobl U, Schmid RM. *Conditional ablation of Notch signaling in pancreatic development. Development*. 2008. IF=6,5; MNiSW=4

Podpis wnioskodawcy



Pawel K. Mazur
Stanford, 02.02.2015r.