

AUTOREFERAT

dr Monika Jasek

Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

Polska Akademia Nauk

Wrocław, 29 stycznia 2016

1. Monika Jasek**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- 12.2005 Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt.: „Polimorfizm genu receptora Fc immunoglobuliny A i jego potencjalny związek z astmą oskrzelową”. Promotor w przewodzie doktorskim prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk.
- 06.1999 Magister, kierunek: biologia, specjalność: mikrobiologia, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, tytuł pracy magisterskiej: „Analiza funkcjonalna ORF-u *YPR 040w* z prawego ramienia XVI chromosomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”. Promotor pracy magisterskiej dr Gabriela Orłowska-Matuszewska.
- 06.1997 Licencjat, kierunek: biologia, specjalność: mikrobiologia, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych

Wykształcenie uzupełniające

- 07.2015 Świadectwo ukończenia podyplomowych studiów kształcenia tłumaczy specjalistycznych w zakresie języka angielskiego, Wyższa Szkoła Filologiczna we Wrocławiu, Wydział Neofilologii
- 07.2014 Licencjat, kierunek: filologia, specjalność: filologia angielska (studia niestacjonarne); Uniwersytet Wrocławski, Wydział Filologiczny
- 06.2014 Dyplom ukończenia Nauczycielskiego Kolegium Języków Obcych we Wrocławiu, specjalność język angielski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- 10.2007 – 10.2009 Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, USA
Department of Translational Hematology and Oncology Research
Post Doctoral Research Fellow
- 01.2006 – 10.2007 University of Pennsylvania, USA, School of Medicine,
Department of Medicine; Division of Hematology/Oncology
Visiting Scientist
- 05.2010 – obecnie Adiunkt; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
- 07.2005 – 05.2010 Asystent; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
- 03.2001 – 06.2005 Doktorantka; Studium Doktoranckie przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

4. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 4, objęty tytułem:

„Badania nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami wybranych nowotworów układu krwiotwórczego oraz chorób autoimmunizacyjnych”

a1) Publikacje dotyczące badań nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami wybranych nowotworów układu krwiotwórczego

1. **Jasek M**, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia*. 2010 Jan; 24(1):216-9.

IF¹=8.966, punkty MNiSW²= 32, **Liczba cytowań³=32**

Indywidualny wkład szacuję na 70%: wybór próbek do badania, wdrożenie metodyki wykrywania mutacji w genie TP53, wykonanie wszystkich eksperymentów prowadzących do identyfikacji mutacji w genie TP53, wiodący udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

2. Paquette RL, Nicoll J, Chalukya M, Gondek L, **Jasek M**, Sawyers CL, Shah NP, Maciejewski JP. Clonal hematopoiesis in philadelphia chromosome-negative bone marrow cells of chronic myeloid leukemia patients receiving Dasatinib. *Leuk Res*. 2010 Jun; 34(6):708-13.

IF=2.555, punkty MNiSW= 27, **Liczba cytowań=3**

Indywidualny wkład szacuję na 35%: wykonanie analizy mutacji w genie TP53, sekwencjonowanie DNA, cDNA, klonowanie produktów PCR do wektora, identyfikacja alternatywnego składania genu TP53 (Rycina 4), udział w pisaniu manuskryptu.

3. Viny A, Clemente MJ, **Jasek M**, Askar M, Ishwaran H, Nowacki A, Zhang A, Maciejewski JP. MICA polymorphism identified by whole genome array associated with NKG2D-mediated cytotoxicity in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1713-21.

IF=6.532, punkty MNiSW=32, **Liczba cytowań=11**

¹ Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania, w przypadku prac opublikowanych w roku 2015 podano IF dla roku 2014.

² Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism (MNiSW), zgodnie z rokiem opublikowania.

³ Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science (WoS, All databases), stan z dnia 29 stycznia 2016 r.

Indywidualny wkład szacuję na 30%: wdrożenie metodyki amplifikacji i sekwencjonowania genu MICA, wykonanie sekwencjonowania genu MICA dla 28 próbek pochodzących od pacjentów z T-LGL (T-cell large granular lymphocyte leukemia) oraz 12 próbek pochodzących od osób zdrowych, identyfikacja alleli MICA na podstawie wyników sekwencjonowania (analiza chromatogramów) (Rycina 1) (próbki z allelami określonymi na podstawie sekwencjonowania były używane jako referencyjne w genotypowaniu).

4. **Jasek M**, Wagner M, Sobczynski M, Wolowiec D, Kuliczkowski K, Woszczyk D, Kielbinski M, Kusnierczyk P, Frydecka I, Karabon L. Polymorphisms in genes of the BAFF/APRIL system may constitute risk factors of B-CLL - a preliminary study on a Polish population. *Tissue Antigens*. 2015 Oct;86(4):279-84. doi: 10.1111/tan.12641.

IF=2.137, punkty MNiSW= 20, **Liczba cytowań=0**

Indywidualny wkład szacuję na 80%: autor korespondencyjny, pomysłodawca całości przeprowadzonych badań (autorstwo koncepcji badań, napisanie grantu i pozyskanie funduszy na realizację projektu grant NCN N N402 680940), zaplanowanie metodyki przeprowadzonych badań, wykonawca większości przeprowadzonych badań, wiodący udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

a2) Publikacje dotyczące badań nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami chorób autoimmunizacyjnych (stwardnienie rozsiane)

5. Wagner M, Wiśniewski A, Bilińska M, Pokryszko-Dragan A, Nowak I, Kuśnierczyk P, **Jasek M**. ALCAM-novel multiple sclerosis locus interfering with HLA-DRB1*1501. *J Neuroimmunol*. 2013 May 15;258(1-2):71-6.

IF=2.786, punkty MNiSW=25, **Liczba cytowań=5**

Indywidualny wkład szacuję na 60%: autor korespondencyjny, pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań, zaplanowanie metodyki badań, wybór wariantów polimorficznych z wykorzystaniem analizy in silico oraz danych literaturowych, nadzór merytoryczny nad badaniami, nadzór nad planowaniem i poprawnością wykonanych badań, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz pisanie tekstu manuskryptu (wstęp, opis wyników, dyskusja) oraz udział we wszystkich etapach prowadzących do jego opublikowania, w tym przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

6. Wagner M, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A, Sobczynski M, Cyrul M, Kusnierczyk P, **Jasek M**. ALCAM and CD6-multiple sclerosis risk factors. *J Neuroimmunol*. 2014 Nov 15;276(1-2):98-103.

IF=2.467, punkty MNiSW=25, **Liczba cytowań=1**

Indywidualny wkład szacuję na 60%: autor korespondencyjny, pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań, zaplanowanie metodyki badań, wybór wariantów

polimorficznych z wykorzystaniem analizy *in silico* oraz danych literaturowych, nadzór merytoryczny nad badaniami, nadzór nad planowaniem i poprawnością wykonanych badań, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz pisaniu tekstu manuskryptu (wstęp, opis wyników, dyskusja) oraz udział we wszystkich etapach prowadzących do jego opublikowania, w tym przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

7. Wagner M, Wisniewski A, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A, Cyrul M, Kusnierczyk P, **Jasek M**. Investigation of gene-gene interactions between CD40 and CD40L in Polish multiple sclerosis patients. *Hum Immunol*. 2014 Aug;75(8):796-801.

IF=2.138, punkty MNiSW=20, **Liczba cytowań=4**

Indywidualny wkład szacuję na **50%**: autor korespondencyjny, pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań, zaplanowanie metodyki oraz nadzór merytoryczny nad badaniami, istotny udział w analizie oraz interpretacji wyników i pisaniu tekstu manuskryptu (sporządzenie planu manuskryptu, wielokrotne krytyczne sprawdzanie manuskryptu, istotny udział w pisaniu dyskusji, korekta oraz zatwierdzenie ostatecznej wersji maszynopisu), udział we wszystkich etapach prowadzących do opublikowania manuskryptu, w tym przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.

8. Wagner M, Sobczyński M, Bilińska M, Pokryszko-Dragan A, Cyrul M, Kuśnierczyk P, **Jasek M**. MS risk allele rs1883832T is associated with decreased mRNA expression of CD40. *J Mol Neurosci*. 2015 Jul;56(3):540-5.

IF=2.343, punkty MNiSW=20, **Liczba cytowań=0⁴**

Indywidualny wkład szacuję na **50%**: autor korespondencyjny, pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad badaniami, istotny udział w analizie oraz interpretacji wyników i pisaniu tekstu manuskryptu (sporządzenie planu manuskryptu, wielokrotne krytyczne sprawdzanie manuskryptu, istotny udział w pisaniu dyskusji, korekta oraz zatwierdzenie ostatecznej wersji maszynopisu), udział we wszystkich etapach prowadzących do opublikowania tekstu, w tym przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.

9. Wagner M, Sobczyński M, Karabon L, Bilińska M, Pokryszko-Dragan A, Pawlak-Adamska E, Cyrul M, Kuśnierczyk P, **Jasek M**. Polymorphisms in CD28, *CTLA-4*, *CD80* and *CD86* genes may influence the risk of multiple sclerosis and its age of onset. *J Neuroimmunol.*, 288; 79-86, 2015, doi:10.1016/j.jneuroim.2015.09.004.

IF=2.467, punkty MNiSW=25, **Liczba cytowań=0**

⁴ Zgodnie z bazą Scopus Elsevier artykuł został zacytowany w następującej publikacji: Panach L, Pineda B, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. The role of CD40 and CD40L in bone mineral density and in osteoporosis risk: A genetic and functional study. *Bone*. 2016 Feb;83:94-103. doi: 10.1016/j.bone.2015.11.002. Epub 2015 Nov 8 (cytowanie nie jest jeszcze podane w bazie WoS dlatego nie zostało uwzględnione w podsumowaniu cytowań).

Indywidualny wkład szacuję na 40%: autor korespondencyjny, pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań, nadzór merytoryczny nad częścią przeprowadzonych badań, istotny udział w analizie i interpretacji wyników oraz w pisaniu tekstu manuskryptu (sporządzenie planu manuskryptu, wielokrotne krytyczne sprawdzanie manuskryptu, udział w pisaniu dyskusji, korekta oraz zatwierdzenie jego ostatecznej wersji) oraz udział we wszystkich etapach prowadzących do jego opublikowania, w tym przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.

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

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl dziewięciu prac oryginalnych (Załącznik 4) poświęconych badaniom nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami wybranych nowotworów układu krwiotwórczego oraz chorób autoimmunizacyjnych. Poznawcze i praktyczne znaczenie przeprowadzonych badań, przedstawionych w pracach wybranych do oceny, wiąże się z wykryciem nowych wariantów genetycznych oraz mechanizmów molekularnych zaangażowanych w patogenezę badanych chorób, które mogą zostać w przyszłości wykorzystane dla celów medycyny spersonalizowanej.

Genetyczne i molekularne czynniki mają istotny wpływ na ryzyko wystąpienia oraz przebieg wielu chorób człowieka, włączając w to nowotwory układu krwiotwórczego oraz choroby autoimmunizacyjne. Stanowią one istotny aspekt badań prowadzonych nad patogenezą tych chorób w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Uzyskane wyniki niejednokrotnie oprócz znaczenia poznawczego mają wymiar praktyczny, przekładający się na opracowywanie nowoczesnych schematów diagnostyczno-terapeutycznych, czy systemów klasyfikacji jednostek chorobowych.

Dalekosiężnym celem badań nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami chorób jest medycyna spersonalizowana, która umożliwi leczenie pacjenta w oparciu o indywidualne, precyzyjne rozpoznanie i prognozę kliniczną, z odpowiednio dobraną, zindywidualizowaną i skuteczną terapią o minimalnych skutkach ubocznych.

Zasadniczo w badaniach nad genetycznymi uwarunkowaniami chorób stosuje się dwie metody, badanie genu „kandydata” (candidate gene) oraz przeszukiwanie całego genomu (genome-wide search).

Badanie genu-kandydata jest podejściem, w którym gen wyłaniany jest do badania na podstawie znajomości funkcji kodowanego przez niego białka, sugerującej jego potencjalny udział w patogenezie choroby. W genie takim, w zależności od typu choroby, poszukuje się

nabytych lub dziedziczonych zmian genetycznych, np. mutacji punktowych⁵, aberracji chromosomowych (np. delecji, duplikacji) lub polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, single nucleotide polymorphism). Jeśli w badanym genie zostanie znaleziona zmiana genetyczna, w następnym etapie należy udowodnić jej związek z chorobą, np. wykazując jej częstsze występowanie w grupie chorych w porównaniu do grupy kontrolnej⁶ dla wariantów dziedziczonych lub w populacji komórek nowotworowych⁷ dla zmian nabytych. Ostatni, najtrudniejszy etap polega na zbadaniu funkcjonalnego/biologicznego znaczenia takiej zmiany, jej wpływu na przebieg procesu chorobowego czy oporność/wrażliwość na leczenie, jej ewentualnych oddziaływań z innymi wariantami genetycznymi (gene-gene interaction) lub czynnikami środowiska (gene-environment interactions).

Jak wspomniano wcześniej, drugą z najczęściej stosowanych metod jest przeszukiwanie genomu. Ukończenie projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu wraz z rozwojem nowych technologii wykorzystujących techniki mikromacierzy, w tym mikromacierzy opartych na analizie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP-A, Single Nucleotide Polymorphism Array) zrewolucjonizowało badania nad genetycznymi uwarunkowanymi chorobami człowieka oraz przyczyniło się do odkrycia nowych czynników genetycznych zaangażowanych w ich patogenezę. Technika ta jest wykorzystywana między innymi w badaniach asocjacyjnych w skali całego genomu (GWAS, Genome Wide Association Study), co umożliwia analizę całego genomu w celu identyfikacji alleli związanych z badanymi chorobami.

W GWAS setki tysięcy polimorfizmów rozmieszczonych w całym genomie są genotypowane w grupie chorych oraz w kontroli. Niezrównoważenie sprzężeń, które jest charakterystyczną cechą ludzkiego genomu, pozwala na genotypowanie relatywnie małej liczby ściśle sprzężonych ze sobą wariantów polimorficznych. Z jednej strony jest to niewątpliwa korzyść ze względu na ilość danych do analizy i koszty badania, z drugiej jednak strony utrudnia to interpretację wyników, gdyż w badaniach tego typu rzadko identyfikowane są pojedyncze warianty związane z chorobą. Najczęściej prowadzą one do wykrycia grupy ściśle powiązanych ze sobą wariantów pokrywających regiony genomu zawierające wiele genów i sekwencji regulatorowych. W tym kontekście identyfikacja wariantu lub wariantów rzeczywiście odpowiedzialnych za ten związek, a nawet genów zaangażowanych w etiologię

⁵ Jednym z kryteriów odróżniających zmianę polimorficzną od mutacji dziedziczonej jest częstość jej występowania. Jeśli w populacji zmiana taka występuje z częstością alleliczną wyższą niż 1%, wtedy uznaje się ją za utrwaloną zmianę polimorficzną.

⁶ Case-control association study

⁷ Np. dla schorzeń mieloidalnych porównanie występowania mutacji lub aberracji chromosomowych między komórkami pełnego szpiku a limfocytami CD3⁺ danego pacjenta

choroby, stanowi wyzwanie [1,2]. Dlatego wyniki GWAS wymagają potwierdzenia w niezależnych badaniach na odpowiednio licznych grupach pochodzących z różnych populacji ludzkich. Pomimo tych trudności wykorzystanie badań typu GWAS niewątpliwie przyczyniło się do wykrycia licznych, nowych wariantów genetycznych oraz regionów genomu związanych z różnymi chorobami.

Technologia SNP-A jest między innymi wykorzystywana jako narzędzie generujące hipotezy, gdyż pozwala ona na identyfikację nowych genów i szlaków sygnałowych, które mogą być dalej badane z wykorzystaniem innych metod biologii molekularnej. Dla porównania, wieloletnie badania nad genami kandydatami tylko w niewielkim stopniu przyczyniły się do wykrycia alleli istotnie związanych z chorobami, co wskazuje, że wybór ten był bardzo ograniczony ze względu na naszą wiedzę na temat patogenezы tych chorób [1, 2].

Jak opisano powyżej, technologia SNP-A może być wykorzystywana do analizy całego genomu. Takie jej zastosowanie ma na celu wykrycie nowych wariantów związanych z chorobą, jest ono obiektywne i nie opiera się na wcześniejszej wiedzy na temat funkcji i udziału żadnego z genów w powstawaniu choroby [3].

Technologia SNP-A, wprowadzona pierwotnie na potrzeby przeszukiwania genomu, została zaadaptowana dla celów analizy chromosomalnej (karyotyping). Ze względu na dużą rozdzielczość, możliwość analizy ilościowej liczby kopii DNA oraz informacji o rodzajach genotypów dostarczanej przez polimorficzne markery SNP, metoda ta jest z powodzeniem wykorzystywana jako dopełnienie zarówno metod cytogenetyki klasycznej jak i techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Do ograniczeń tej techniki należy zaliczyć możliwość wykrywania jedynie niezrównoważonych aberracji oraz zawodność tej metody w rozróżnianiu pomiędzy wieloma dużymi klonami komórkowymi (mozaicyzm klonalny vs. złożone aberracje chromosomowe). Do niewątpliwych zalet SNP-A należy zaliczyć możliwość badania komórek interfazowych oraz materiału archiwalnego, dużą rozdzielczość, a także możliwość jednoczesnej analizy genotypów pozwalającej na wykrycie utraty heterozygotyczności z zachowaniem liczby kopii genu (CN-LOH, a copy number-neutral loss of heterozygosity). Aberracja typu CN-LOH nie jest związana ze zmianą liczby kopii genów. CN-LOH jest mechanizmem chromosomowym, w wyniku którego homozygotyczne mutacje mogą być nabywane w rozwoju procesu nowotworowego. Mechanizm ten jest częsty dla nowotworów układu krwiotwórczego. Występowanie nabytego CN-LOH (a CN-LOH, acquired CN-LOH) w określonych regionach chromosomów może wskazywać lokalizację

genów z nabytymi, homozygotycznymi mutacjami, np. CN-LOH9p i *JAK2*; CN-LOH13q i *FLT-3* ITD, CN-LOH11q i *C-CBL*.

Oprócz wykorzystania SNP-A w diagnostyce cytogenetycznej, technika ta może służyć jako narzędzie do mapowania. Umożliwia ona dokładne wyznaczenie regionów genomowych, w których dochodzi do częstych delecji lub duplikacji oraz do identyfikacji wcześniej nieznanymi aberracji w tym mikroduplikacji, mikrodelecji czy CN-LOH [4-6]. Dla przykładu zastosowanie SNP-A do mapowania i analizy utraty heterozygotyczności, w tym CN-LOH, przyczyniło się do identyfikacji związku LOH4q24 i mutacji w genie *TET2* z nowotworami mielodysplastycznymi-mieloproliferacyjnymi [7].

Wykorzystanie współcześnie dostępnych technologii otworzyło nowy rozdział w badaniach nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami wielu chorób, rozdział ten uzupełniany jest ciągle o nowe odkrycia. Pomimo niewątpliwego postępu w tej dziedzinie, wiele z uzyskanych wyników wymaga potwierdzenia w niezależnych badaniach oraz odpowiedzi na pytanie, jaka jest funkcjonalna rola wykrytych wariantów w patogenezie danej choroby.

Tematyka realizowanych przeze mnie projektów badawczych zgodna jest z moimi zainteresowaniami naukowymi związanymi z genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami chorób człowieka, zwłaszcza nowotworów układu krwiotwórczego oraz chorób autoimmunizacyjnych. Wynika to między innymi z faktu, iż u chorych na schorzenia autoimmunizacyjne obserwuje się zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów, w tym często nowotworów układu krwiotwórczego (reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, pierwotny zespół Sjögrena - chłoniaki nieziarnicze i chłoniak Hodgkina [8], stwardnienie rozsiane - chłoniak Hodgkina, makroglobulemia Waldenströma [9-10]). Przykładowo geny oraz ich produkty białkowe należące do szlaku kostymulującego (CD28/CTLA4-CD80/86) oraz szlaku BAFF/APRIL odgrywają rolę zarówno w patogenezie nowotworów układu krwiotwórczego, jak i chorób autoimmunizacyjnych, w tym stwardnienia rozsianego [11-18].

Na wybór jednostek chorobowych, oprócz zainteresowań badawczych, miała także wpływ dostępność materiału od chorych oraz danych klinicznych, uzyskanych w wyniku współpracy nawiązanej z ośrodkami klinicznymi, które wykazały zainteresowanie tematyką moich badań. Przy wyborze genów starałam się połączyć opisane powyżej strategie wykorzystywane w badaniach nad genetycznymi i molekularnymi uwarunkowaniami chorób. Takie podejście

pozwoliło na uzyskanie wyników, które zostały opublikowane w cyklu prac przedłożonych do oceny.

Pierwszy z realizowanych przeze mnie tematów badawczych dotyczy genetyczno-molekularnych uwarunkowań nowotworów układu krwiotwórczego.

Badania tego typu są bardzo ważne, ponieważ ich rezultaty mogą zostać wykorzystane między innymi do oceny indywidualnych czynników ryzyka wystąpienia nowotworu. Ponadto mogą one być pomocne w postawieniu bardziej precyzyjnej diagnozy i prognozy klinicznej, a także umożliwić zastosowanie terapii celowanej. Systemy klasyfikacji tych nowotworów są obecnie modyfikowane w oparciu o wyniki badań nad ich molekularnymi uwarunkowaniami. Powołanie do życia hematologii molekularnej, jako nowego działu badań naukowych w hematologii, stanowi potwierdzenie dla znaczenia tego rodzaju badań [19]. Zakres moich badań dotyczy zarówno nabytych, somatycznych zmian genetycznych (mutacji i aberracji), jak i mniej zbadanego, dziedzicznego podłoża tych schorzeń.

Jak wspomniano powyżej, technika SNP-A jest z powodzeniem wykorzystywana do przeprowadzenia analizy chromosomalnej. W naszych badaniach użyliśmy jej do analizy próbek DNA, pochodzących od 379 pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem mielodysplastycznym lub ostrą białaczką szpikową, w celu wykrycia obszarów utraty heterozygotyczności (LOH), ze szczególnym uwzględnieniem tych z zachowaną liczbą kopii genu (CN-LOH) w obrębie 17 chromosomu. U 5,5% pacjentów wykryliśmy występowanie LOH w regionie krótkiego ramienia chromosomu 17 (LOH17p), z czego delecje stanowiły 3,7%, a somatyczne CN-LOH 1,8%. Pacjenci, u których stwierdziliśmy obecność LOH17p, mieli szereg cech wspólnych, takich jak kariotyp złożony, współwystępowanie aberracji w obrębie chromosomu 5 i/lub 7, złe rokowania ze średnim czasem przeżycia 6 miesięcy dla pacjentów z del(17p) oraz 3 miesięcy dla pacjentów z somatycznym CN-LOH17p. W przeważającej większości przypadków (19/21) LOH17p obejmowało *locus* genu *TP53*. Spodziewaliśmy się, że u większości z tych pacjentów znajdziemy mutacje w tym genie. Zgodnie z naszymi oczekiwaniami, stwierdziliśmy obecność homozygotycznych mutacji w genie *TP53* u 5 na 6 (83%) pacjentów z CN-LOH17p, natomiast u 7 na 9 (78%) pacjentów z del(17p) znaleźliśmy mutacje hemizygotyczne w tym genie. Dla porównania, dodatkowa analiza 40 pacjentów z MDS⁸ lub AML⁹, bez stwierdzonych aberracji chromosomu 17, ujawniła tylko dwa przypadki (5%) z heterozygotycznymi mutacjami w genie *TP53*.

⁸ Zespoły mielodysplastyczne (MDS, myelodysplastic syndromes)

⁹ Ostra białaczka szpikowa (AML, acute myeloid leukemia)

W oparciu o nasze obserwacje zaproponowaliśmy dwa mechanizmy, w wyniku których oba allele genu *TP53* ulegają inaktywacji. W przypadku delecji 17p, jeden z allele zostaje inaktywowany przez mutacje, natomiast allele typu dzikiego ulega delecji. W przypadku CN-LOH17p może zachodzić dodatkowy proces, mianowicie reduplikacja zmutowanego allele *TP53*, wynikająca z próby naprawy utraconej części chromosomu. Faktycznie, taki mechanizm został wcześniej zaproponowany dla wyjaśnienia obecności homozygotycznych mutacji w genie *TP53* u pacjentów bez stwierdzonej aberracji chromosomu 17 i z obecnością dwóch prawidłowych sygnałów dla *TP53* w analizie FISH. Ponadto stwierdzona przez nas obecność heterozygotycznych mutacji *TP53* u pacjentów bez wykrytego w badaniu cytogenetycznym i przez SNP-A LOH17p sugeruje, że mutacja w genie *TP53* pojawia się wcześniej niż LOH17p. Nasze wyniki mogą również wyjaśniać obserwowane wcześniej u pacjentów z del5/5q- i del7/7q- współwystępowanie mutacji w genie *TP53* bez rozpoznanej del17p, w komórkach białaczkowych tych pacjentów mogło występować CN-LOH17p.

Podsumowując, nasze badania wykazały częste występowanie CN-LOH17p u pacjentów z zaawansowaną postacią zespołu mielodysplastycznego lub wtórną postacią ostrej białaczki szpikowej oraz ze złożonym kariotypem, co związane było z obecnością homozygotycznych mutacji w obrębie genu *TP53*. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Leukemia* (pozycja 1 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Przewlekła białaczka szpikowa¹⁰ jest nowotworem mieloproliferacyjnym stanowiącym około 15% wszystkich białaczek rozpoznawanych u dorosłych. Jednym z podstawowych kryteriów rozpoznania tej jednostki jest stwierdzenie obecności chromosomu Filadelfia (Ph) w komórkach szpiku, który jest wykrywany u ponad 90% pacjentów z CML, w badaniu cytogenetycznym lub w badaniu genu BCR/ABL metodą FISH lub PCR [19,20]. U niektórych pacjentów z CML pozostających w fazie przewlekłej, leczonych inhibitorami kinazy tyrozynowej oraz pozostających w całkowitej remisji cytogenetycznej, stwierdza się obecność dodatkowych zaburzeń chromosomowych¹¹ w komórkach szpiku niezawierających chromosomu Ph (Ph-ujemnych).

Metody SNP-A oraz HUMARA¹² zostały przez nas wykorzystane do identyfikacji rozrostu klonalnego (clonal hematopoiesis), jako uzupełnienie metod konwencjonalnej

¹⁰ Przewlekła białaczka szpikowa (CML, chronic myeloid leukemia)

¹¹ CCA, clonal cytogenic abnormalities

¹² The Human Androgen Receptor Gene assay

cytogenetyki u pacjentów chorych na CML leczonych dazatynibem i pozostających w całkowitej remisji cytogenetycznej¹³. Zastosowanie wszystkich 3 metod pozwoliło nam na stwierdzenie dodatkowych zaburzeń chromosomowych w Ph-ujemnych komórkach u 8 na 27 analizowanych pacjentów (30%) (wyraz ewolucji klonalnej). U jednego z pacjentów, u których nie stwierdzono dodatkowych zaburzeń chromosomowych w badaniu cytogenetycznym szpiku, analiza SNP-A wykazała obecność CN-LOH17p. Kierując się wynikami naszej poprzedniej pracy, która wykazała związek pomiędzy CN-LOH17p a homozygotycznymi mutacjami w genie *TP53*, wykonaliśmy analizę mutacji genu *TP53* u tego pacjenta. Sekwencjonowanie genu *TP53* ujawniło obecność 5-nukleotydowej delecji w komórkach pochodzących ze szpiku tego pacjenta, która powodowała zniszczenie 5' miejsca splicingowego eksonu 6, co skutkowało wycięciem tego eksonu. Przewidywane dalsze konsekwencje to: zmiana ramki odczytu, wprowadzenie przedwczesnego kodonu stop, a w konsekwencji powstanie нефunkcjonalnego białka p53. W komórkach CD3⁺ pochodzących od tego samego pacjenta nie stwierdziliśmy obecności 17pCN-LOH ani delecji, co potwierdza somatyczny charakter tych zmian.

Podsumowując, przeprowadzone badania pokazały, że metody konwencjonalnej cytogenetyki oraz analiz SNP-A i HUMARA wzajemnie się uzupełniają w wykrywaniu i charakteryzowaniu dodatkowych klonów komórkowych u pacjentów z CML, niemniej jednak czułość tych testów jest zbyt niska i nie doszacowują one ich rzeczywistej częstości. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Leukemia Research* (pozycja 2 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Metoda SNP-A została przez nas również wykorzystana z powodzeniem do zweryfikowania hipotezy zakładającej, że predysponujące czynniki genetyczne mogą odgrywać rolę w patogenezie białaczki z dużych ziarnistych limfocytów T¹⁴. T-LGL jest nowotworem cechującym się klonalnym rozrostem cytotoksycznych limfocytów T [20]. Ze względu na rzadkie występowanie oraz współwystępowanie chorób autoimmunizacyjnych można zakładać istnienie somatycznego bądź wrodzonego genetycznego wariantu o wysokim stopniu penetracji zaangażowanego w patogenezę T-LGL. Wariant taki może zostać wykryty mimo prowadzenia badań na ograniczonej liczbie próbek. Spodziewaliśmy się, że zastosowanie SNP-A jako narzędzia generującego hipotezy pozwoli nam zidentyfikować gen/geny potencjalnie zaangażowane w patogenezę tej choroby.

¹³ McyR, a major cytogenic remission

¹⁴ Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów T (T-LGL, T-cell large granular leukemia)

W pierwszym etapie, na podstawie analizy wyników uzyskanych z SNP-A, wytypowaliśmy pięć genów kandydatów zlokalizowanych w dwóch różnych regionach chromosomowych: 8p21.3 (*ATP6V1B2* i *SLC18A1*) oraz 6p21.32-33 (*MICA*, *C6orf10* i *LOC442200*) do dalszej analizy. Dane uzyskane z GWAS oraz biologiczna rola produktu białkowego genu *MICA*, którym jest MICA, nieklasyczna cząsteczka MHC należąca do klasy Ib (ang. MHC class-I related-chain A, MICA) zainspirowały nas do podjęcia dalszych badań nad rolą tej cząsteczki w patogenezie T-LGL. Wyniki przeprowadzonego przez nas sekwencjonowania oraz genotypowania wykazały częstsze występowanie allelu *MICA**00801/A5.1 wśród pacjentów z T-LGL w porównaniu do kontroli (64% vs. 41%, $p < 0,001$; częstość homozygot wynosiła odpowiednio 40% vs. 15%, $p < 0,001$). *MICA* jest ligandem dla cząsteczki NKG2D należącej do grupy receptorów lektynowych, która funkcjonuje jako receptor aktywujący. Cząsteczka NKG2D w postaci homodimeru występuje na komórkach NK, limfocytach T $\gamma\delta$ i LGL. Aby stwierdzić, czy *MICA* ma znaczenie w przebiegu białaczki T-LGL, zbadaliśmy poziom powierzchniowej ekspresji cząsteczek *MICA* oraz NKG2D z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Stwierdziliśmy podwyższoną ekspresję *MICA* na granulocytach izolowanych z krwi pacjentów z T-LGL, u których stwierdzono również neutropenię, w porównaniu do granulocytów pochodzących od osób zdrowych ($p = 0,033$). Nie zaobserwowaliśmy natomiast różnic w ekspresji NKG2D pomiędzy białaczkowymi i normalnymi limfocytami LGL CD57+. W analizie dwuczynnikowej uwzględniającej poziom ekspresji *MICA* oraz całkowitą liczbę neutrofilów odnotowaliśmy odwrotną korelację ($R^2 = 0,50$, $p = 0,035$). Ta obserwacja wskazywała na udział oddziaływań *MICA*-NKG2D jako na jedną z możliwych przyczyn prowadzących do neutropenii. Została ona przez nas potwierdzona w szeregu przeprowadzonych testów cytotoksyczności limfocytów, wykonanych zarówno na granulocytach izolowanych od pacjentów, jak i z użyciem modelowej linii komórkowej Ba/F3 ekspresjonującej ludzką cząsteczkę *MICA**019. Limfocyty LGL izolowane od pacjentów wykazywały zależną od dawki aktywność cytotoksyczną względem komórek linii Ba/F3-*MICA**019, podczas gdy komórki dzikiego typu nie były zabijane ($p < 0,001$). Ponadto w testach z zastosowaniem przeciwciał blokujących anty-NKG2D obserwowaliśmy statystycznie istotne zmniejszenie efektu cytotoksycznego, co potwierdza jednoznacznie specyficzny udział oddziaływań *MICA*-NKG2D w tym procesie ($p = 0,033$).

Podsumowując, nasze badania ujawniły związek polimorfizmów w genie *MICA* z T-LGL. Dalsze doświadczenia pozwoliły na zasugerowanie udziału oddziaływań *MICA*-

NKG2D w patogenezie tej choroby. Dodatkowo, w wyniku przeprowadzonych badań wykryliśmy dwa nowe warianty wcześniej opisanych alleli *MICA* 002/A9 i 008/A5.1 w grupie chorych. Ich sekwencje po zgłoszeniu do WHO Nomenclature Committee For Factors of the HLA System zostały oficjalnie zarejestrowane jako allele *MICA**00203 i *MICA**058. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Haematologica* (pozycja 3 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Przewlekła białaczka limfocytowa/chłoniak z małych limfocytów¹⁵ jest najczęstszą postacią białaczki w Europie i Ameryce Północnej. Badania nad rodzinami chorych z CLL wykazały, że u osób z pierwszym stopniem pokrewieństwa występuje 3- do 8-krotnie wyższe ryzyko zachorowania w porównaniu do osób niespokrewnionych. Pomimo występującej silnej rodzinnej predyspozycji, przeprowadzone dotychczas przeszukiwania genomu nie doprowadziły do opisanego genu silnie predysponującego do choroby. Obecnie wydaje się, że współdziedziczenie wielu wariantów niskiego ryzyka ($OR^{16}=1,1-1,5$) jest prawdopodobnym modelem genetycznej predyspozycji do CLL w rodzinie. Mimo, iż efekt pojedynczego allelu jest niewielki, wspólny efekt wielu alleli może mieć istotne znaczenie dla warunkowania ryzyka wystąpienia CLL w rodzinie. Ich współwystępowanie może także odpowiadać ze zwiększone ryzyko rozwoju CLL w części populacji ogólnej [21].

Badanie 500 polimorfizmów znacznikowych¹⁷ zlokalizowanych w 48 genach kandydatach (kodujących cząsteczki należące między innymi do rodzin: TNF, TNFR, FAS, TRAF czy NFκB), przeprowadzone przez Wang i wsp. [22], wskazało między innymi dwa geny, *TNFSF13B* oraz *TNFRSF13C*, jako potencjalnie związane z ryzykiem wystąpienia chłoniaków nieziarniczych. Dodatkowo gen *TNFSF13B* był związany specyficznie z ryzykiem wystąpienia CLL. Pierwszy z tych genów (*TNFSF13B*) koduje cząsteczkę BAFF (B cell activating factor), a drugi (*TNFRSF13C*) specyficzny dla niej receptor BAFF-R (BAFF receptor). Sekwencja białkowa BAFF jest w około 50% homologiczna z sekwencją cząsteczki APRIL (a proliferation-inducing ligand), która tak jak BAFF należy do nadrodziny cząsteczek czynnika martwicy nowotworów. Wykazując tak wysoką homologię, BAFF i APRIL mają dwa wspólne receptory BCMA (B-cell maturation antygen) oraz TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor). W innym badaniu wykorzystującym SNP-A jako narzędzie generujące hipotezy, biorącym pod uwagę między innymi geny zaangażowane w proces apoptozy, odpowiedzi immunologicznej

¹⁵ Przewlekła białaczka limfocytowa/chłoniak z małych limfocytów (CLL/SLL, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma)

¹⁶ Odds Ratio

¹⁷ Tag SNP

czy naprawy DNA, wykazano związek między haplotypem złożonym z czterech wariantów polimorficznych, zlokalizowanym w genie *TACI* (*TNFRSF13B*) a ryzykiem wystąpienia CLL [23]. Kierując się powyższymi przesłankami, postanowiliśmy zbadać związek genów należących do ścieżki BAFF/APRIL z ryzykiem wystąpienia oraz przebiegiem CLL.

Zbadaliśmy 20 SNP, zlokalizowanych w genach kodujących cząsteczki BAFF i APRIL oraz w genach kodujących ich receptory BAFF-R, TACI i BCMA. Dwa z badanych genów *APRIL* (17p13.1) i *TACI* (17p11.2) zlokalizowane są na chromosomie 17. Delecja w obrębie krótkiego ramienia tego chromosomu del(17p) jest stwierdzana u około 3-8% nieleczonych pacjentów i nawet u 30% pacjentów z zaawansowanym stopniem choroby. W celu odróżnienia hemizygot od homozygot przeprowadziliśmy badanie liczby kopii genów¹⁸ dla *APRIL* i *TACI*. U 4,45% pacjentów stwierdziliśmy występowanie pojedynczej kopii genu *APRIL*. Natomiast jedna kopia genu *TACI* wystąpiła u 1,98% chorych. Próbkę z pojedynczą kopią genu *APRIL* i/lub *TACI* zostały wykluczone z dalszej analizy. Ostatecznie analizą objęliśmy grupę 187 pacjentów oraz grupę 296 osób zdrowych. Dla trzech z analizowanych SNP: rs9514828 (-871C>T; *BAFF*), rs3803800 (Asn96Ser; *APRIL*), rs4985726 (intron 1; *TACI*) stwierdziliśmy różnice w rozkładzie genotypów między osobami zdrowymi a pacjentami (odpowiednio $p=0,047$; $p=0,008$ i $p=0,029$). Ponadto wykazaliśmy, że pacjenci o genotypie rs3803800AA mają wyższe ryzyko zachorowania na CLL w porównaniu do pacjentów będących nosicielami allelu G (rs3803800AG oraz rs3803800GG) (OR=2,49; CI95%=1,10;5,68; $p=0,0249$). Nie wykazaliśmy istotnych różnic w rozkładzie haplotypów pomiędzy porównywanymi grupami. Analiza oddziaływań między poszczególnymi genami (ligand-receptor) nie ujawniła istnienia takich zależności. Żaden z analizowanych SNP nie był również związany ze stopniem Rai¹⁹. Odnotowaliśmy natomiast ciekawą interakcję pomiędzy dwoma wariantami *rs9514828(BAFF) × rs11570136(BCMA)*, związaną z wiekiem diagnozy. Pacjenci o genotypie rs9514828CT/rs11570136AA byli diagnozowani 12 lat później (średnia wieku 75,2) niż pozostali pacjenci (średnia wieku 63,37).

Podsumowując, wyniki naszych badań wskazują na potencjalny udział genów ze ścieżki BAFF/APRIL w warunkowaniu predyspozycji i przebiegu CLL. Pozwoliły one również na identyfikację nowych wariantów potencjalnie związanych z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem tej choroby. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Tissue Antigens* (pozycja 4 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

¹⁸ CNV, copy number variation analysis

¹⁹ Stopień zaawansowania klinicznego CLL oceniany według klasyfikacji Rai

W ramach kontynuacji badania nad tymi genami zostały przeprowadzone na liczniejszych grupach chorych (439) i zdrowych (477) i skorelowane z poziomem białek BAFF, APRIL i TACI oraz danymi klinicznymi²⁰. Wyniki te będą zaprezentowane w dwóch publikacjach, jedna publikacja wkrótce zostanie wysłana do recenzji, druga jest w trakcie opracowywania. W przyszłości chciałabym zbadać związek genów ze ścieżki BAFF/APRIL oraz ich produktów białkowych ze stwardnieniem rozsianym.

Drugi z moich tematów badawczych dotyczy genetyczno-molekularnych uwarunkowań chorób autoimmunizacyjnych²¹, w tym stwardnienia rozsianego. Obecnie uważa się, że wysoce prawdopodobnym modelem genetycznej predyspozycji do SM²², podobnie jak wielu innych chorób o podłożu wielogenowym, jest współdziedziczenie wielu wariantów niskiego ryzyka oraz ich wzajemne oddziaływanie. Wykrycie związku między wariantem niskiego ryzyka a chorobą jest trudne, dlatego wydaje się, że badanie szeregu wariantów polimorficznych genów kodujących cząsteczki należące do określonego szlaku sygnałowego lub cząsteczki regulujące określony mechanizm mający istotne znaczenie w patogenezie danej choroby, zwiększa w znacznym stopniu prawdopodobieństwo zaobserwowania takich zależności.

Do chwili obecnej na całym świecie przeprowadzono około 14 badań typu GWAS dla SM [1] w ramach których wytypowano liczne regiony i geny jako potencjalnie związane z tą chorobą, a wśród nich region 3q13, gdzie zlokalizowane są, między innymi, następujące geny: gen *ALCAM* kodujący cząsteczkę ALCAM/CD166 oraz geny kodujące cząsteczki CD80/B7-1 i CD86/B7-2. Innym regionem wytypowanym przez GWAS jako potencjalnie związanym z SM jest region 20q13. Jednym z genów zlokalizowanych w tym obszarze jest gen *TNFRSF5* kodujący cząsteczkę CD40.

W oparciu o powyższą wiedzę oraz znajomość patomechanizmu SM przeprowadziliśmy badania związku polimorfizmów genów kodujących cząsteczki zaangażowane w proces aktywacji limfocytów T i B - CD28, CTLA-4, CD80, CD86, CD40, CD40L z tą chorobą. Dodatkowo do naszych badań wybraliśmy geny *ALCAM* i *CD6*.

Jak wspomniano powyżej, gen *ALCAM* zlokalizowany jest w regionie chromosomowym wytypowanym przez GWAS, jako potencjalnie związany ze stwardnieniem rozsianym. ALCAM oddziałuje z wysokim powinowactwem z receptorem CD6. Dla przebiegu SM ważna jest rola oddziaływań ALCAM-CD6 w transmigracji

²⁰ Badania wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Immunologii Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Katedrą i Kliniką Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

²¹ Badania wykonano we współpracy z Kliniką Neurologii, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu

²² Stwardnienie rozsiane (SM, Sclerosis Multiplex)

leukocytów przez barierę krew mózg (BBB), a także w regulacji aktywacji limfocytów T [24,25].

Wobec braku doniesień literaturowych na temat związku genu *ALCAM* ze stwardnieniem rozsianym i nielicznych dotyczących genu *CD6* zdecydowaliśmy się na przeprowadzenie takich badań.

Celem pierwszej z dwóch publikacji dotyczącej tych genów, było zweryfikowanie naszej hipotezy na temat związku genu *ALCAM*, kandydata pozycyjnego i funkcjonalnego z ryzykiem wystąpienia i przebiegu SM. Badaniami objęliśmy grupę 304 pacjentów oraz 323 osób zdrowych. Wyboru pięciu SNP dokonaliśmy w oparciu o analizę *in silico* oraz dane literaturowe. Dodatkowo, w celu zwiększenia prawdopodobieństwa identyfikacji nowych miejsc polimorficznych, przeprowadziliśmy stratyfikację badanych grup ze względu na obecność allelu *HLA-DRB1*15:01* (*HLA-DRB1*15:01+* vs. *HLA-DRB1*15:01-*), uznawanego obecnie za główny czynnik warunkujący podatność na SM w populacjach europejskich [1].

W pierwszym etapie porównaliśmy częstości występowania genotypów dla wybranych SNP między badanymi grupami, co ujawniło związek z ryzykiem wystąpienia choroby dla promotorowego wariantu rs6437585 C>T genu *ALCAM*. Heterozygoty CT miały ponad dwukrotnie wyższe ryzyko zachorowania na SM niż homozygoty CC (OR=2,34; 95CI%=1,22-4,51; $p=0,011$). Efekt ten był niezależny od obecności allelu *HLA-DRB1*15:01*. Ponadto zaobserwowaliśmy, że dwa inne warianty polimorficzne, rs11559013 i rs34926152, chociaż same niezwiązane z SM, modyfikowały efekt obecności allelu *HLA-DRB1*15:01*. Osoby posiadające allel *HLA-DRB1*15:01* i będące jednocześnie heterozygotami GA w miejscu polimorficznym rs11559013 G>A, miały pięć razy niższe ryzyko zachorowania w porównaniu do homozygot GG (OR=0,22; 95%CI=0,05-0,97; $p=0,047$). Podobną interakcję zauważyliśmy dla wariantu rs34926152 G>T. Osoby o genotypie *rs34926152GT/HLA-DRB1*15:01+* miały około 5 razy niższe ryzyko zachorowania niż osoby o genotypie *rs34926152GG/HLA-DRB1*15:01+* (OR=0,20; 95%CI=0,05-0,93; $p=0,027$). Zaobserwowane przez nas różnice w częstości haplotypów pomiędzy grupą chorych i zdrowych (LRS_{df=10}=31,40; $p=0,0005$), stanowiło dodatkowe potwierdzenie dla zaobserwowanego związku polimorfizmu rs6437585 C>T z ryzykiem wystąpienia choroby, gdyż haplotyp GTCGA (rs11559013, rs6437585, rs1044243, rs34926152, rs1044240) występował blisko 7 razy częściej wśród pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnił się on od dzikiego haplotypu GCCGA, najczęstszego w obu

grupach, tylko obecnością T w drugiej pozycji, która odpowiada wariantowi polimorficznemu rs6437585 związanemu z chorobą. Następnie przeprowadziliśmy analizę zależności pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi a wybranymi parametrami klinicznymi: wiekiem diagnozy²³, długością trwania fazy nawracająco-ustępującej²⁴, a także progresją choroby wyrażonej stopniem w rozszerzonej skali niewydolności ruchowej²⁵ oraz w skali ciężkości stwardnienia rozsianego²⁶. Zauważyliśmy związek wieku diagnozy z wariantem polimorficznym rs6437585 C>T. Średni wiek diagnozy dla homozygot CC był około 2 lata i 3 miesiące późniejszy w porównaniu do heterozygot CT (95%CI=0,16-4,41; $p=0,036$). Analiza czynników związanych z progresją choroby pokazała również związek polimorfizmu rs6437585 C>T ze stopniem niepełnosprawności. Heterozygoty CT miały niższe wartości MSSS, a co z tego wynika niższy stopień niepełnosprawności w porównaniu do homozygot CC, dodatkowo związek ten był niezależny od płci ($\lambda_{\text{Pillai}}=0,041$; $p=0,026$).

Podsumowując, praca ta była pierwszym doniesieniem literaturowym na temat związku wariantów polimorficznych genu *ALCAM* z ryzykiem i progresją stwardnienia rozsianego. Ponadto nasze wyniki stanowią dodatkowy dowód, potwierdzający istotny udział oddziaływań gen-gen (*ALCAM-HLA-DRB1*15:01*) w patogenezie chorób o podłożu wielogenowym, takich jak stwardnienie rozsiane. Wyniki te zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Neuroimmunology* (pozycja 5 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Wyniki opisane w powyższej pracy zachęciły nas do kontynuowania i rozszerzenia zakresu badań nad związkiem genu *ALCAM* ze stwardnieniem rozsianym poprzez włączenie dodatkowego wariantu polimorficznego genu *ALCAM*, rs579565G>A. Ponadto, ze względu na ważność oddziaływań *ALCAM*-CD6 dla przebiegu SM oraz ze względu na fakt, że wariant polimorficzny CD6 rs17824933 C>T został wskazany w meta analizie [26] jako związany z tą chorobą [26], postanowiliśmy włączyć do badań również ten gen.

Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniej opisany przez nas związek wariantu rs6437585 C>T genu *ALCAM* z chorobą, na nieco większej grupie 336 pacjentów. Jeśli chodzi o gen *CD6*, dla jednego (rs12360861G>A) z dwóch badanych wariantów, stwierdziliśmy różnice w rozkładzie genotypów między pacjentami a osobami zdrowymi ($\chi^2_{df=1}=7,223$; $p=0,027$). Heterozygoty GA miały około 1,3 raza niższe ryzyko rozwoju stwardnienia rozsianego w porównaniu do homozygot GG (OR=0,78; 95%CI=0,57;1,09),

²³ Age at diagnosis

²⁴ RR, relapsing-remitting

²⁵ EDSS, expanded disability status scale

²⁶ MSSS, multiple sclerosis severity scale

podczas gdy ryzyko to dla homozygot AA było prawie trzykrotnie niższe w porównaniu do genotypu GG (OR=0,34; 95%CI=0,12;0,81). Ochronne działanie allelu A było niezależne od obecności allelu *HLA-DRB1*15:01*.

Analiza związku danych klinicznych z badanymi polimorfizmami, potwierdziła wcześniej opisany wcześniejszy wiek diagnozy dla heterozygot rs6437585CT (*ALCAM*) (95%CI= -6,21; -1,16; $p=0,004$). Zaobserwowaliśmy również, że obecność allelu A (GA lub AA), w miejscu rs579565G>A, była związana z obniżonym o około 2,5 roku wiekiem diagnozy (CI95= -4,41; -0,70; $p=0,007$). Grupą porównawczą w obu przypadkach były osoby o genotypie *HLA-DRB1*15:01*-/rs6437585CC/rs579565GG. Potwierdziliśmy także związek polimorfizmu rs6437585 (*ALCAM*) z progresją choroby. Podobną zależność zaobserwowaliśmy również dla wariantu rs17824933C>G genu *CD6*, który był związany z progresją choroby wyrażoną w skali EDSS i MSSS ($\lambda_{\text{Pillai}}=0,0253$; $p=0,014$). Pacjenci z SM posiadający genotyp CG lub GG w tym miejscu polimorficznym wykazywali wyższe wartości w skali MSSS, w porównaniu do homozygot CC. W ramach niniejszej pracy zbadaliśmy również poziom ekspresji (mRNA) genów *ALCAM* i *CD6*. Odnotowaliśmy niższy poziom ekspresji mRNA dla genu *CD6* w grupie pacjentów w porównaniu ze zdrową kontrolą ($T^2_{2,74}=6,678$; $p=0,002$). Nie było natomiast różnic w poziomie ekspresji genu *ALCAM* między porównywanymi grupami. Nie stwierdziliśmy również korelacji pomiędzy poziomami mRNA dla obu genów.

Na uwagę zasługuje fakt, że opisany przez nas w poprzedniej pracy wariant rs6437585 C>T genu *ALCAM* jako związany z chorobą, zlokalizowany jest w sekwencji DRE (dioxin-responsive element), która odpowiedzialna jest za przyłączanie receptora węglowodorów arylowych (AhR, aryl hydrocarbon receptor) [27]. W ostatnich latach, AhR został rozpoznany jako ważny regulator układu immunologicznego, a motywy DRE znaleziono w promotorach wielu genów, których produkty zaangażowane są w procesy immunologiczne [28]. Zhou i wsp. [29], wykazali w teście lucyferazowym, że allel T tego polimorfizmu związany był z prawie dwukrotnie wyższą ekspresją genu *ALCAM* w porównaniu do allelu C. Ze względu na powyższe przeanalizowaliśmy również poziom ekspresji genów *ALCAM* i *CD6* w zależności od genotypów badanych wariantów polimorficznych, oddzielnie dla każdego z genów. Na podstawie przytoczonej powyżej argumentacji spodziewaliśmy się, że heterozygoty rs6437585CT będą charakteryzowały się wyższą ekspresją mRNA dla genu *ALCAM* w porównaniu do homozygot CC. Niestety nie zaobserwowaliśmy takiej zależności, najprawdopodobniej ze względu na brak możliwości poddania analizie homozygot TT,

których nie stwierdziliśmy w badanych grupach, ze względu na bardzo niską częstość występowania allelu T w populacji polskiej. Nie wykazaliśmy związku pomiędzy żadnym innym badanym SNP w genach *ALCAM* i *CD6* a poziomem ekspresji mRNA dla tych genów.

Podsumowując, uzyskane w tej pracy wyniki dostarczyły nowych obserwacji potwierdzających udział cząsteczek ALCAM i CD6 w rozwoju i przebiegu stwardnienia rozsianego. Ponadto część z uzyskanych danych i postawionych hipotez (np. hipoteza na temat ochronnego działania allelu A w miejscu polimorficznym rs12360861 opisanej w dyskusji w tej publikacji) wyznacza nowe i interesujące kierunki badawcze, które planujemy realizować w naszym laboratorium. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Neuroimmunology* (pozycja 6 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Jak wspomniano wcześniej, region 20q13, w którym zlokalizowany jest między innymi gen kodujący białko CD40, został również wytypowany w GWAS jako potencjalnie związany z SM. Ligandem dla tej cząsteczki jest cząsteczka CD40L/CD154. Oddziaływania CD40-CD40L odgrywają istotną rolę, zarówno w odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej. Oba rodzaje odpowiedzi są istotne dla rozwoju i przebiegu stwardnienia rozsianego. Należy tutaj wspomnieć, że kobiety chorują na stwardnienie rozsiane dwa razy częściej i dlatego geny zlokalizowane na chromosomie X, takie jak CD40L (Xq26), brane są pod uwagę jako potencjalnie związane z tą chorobą. Przytoczone powyżej argumenty zdecydowały o podjęciu przez nas badań nad rolą genów *CD40* (*TNFRSF5*) i *CD40L* w rozwoju i przebiegu stwardnienia rozsianego.

Z pięciu zbadanych przez nas polimorfizmów, trzech dla genu *CD40* i dwóch dla *CD40L*, zaobserwowaliśmy związek z SM tylko dla wariantu rs1883832 C>T genu *CD40*, zlokalizowanego w pozycji -1, w sekwencji Kozak. Nosiciele allelu T wykazywali wyższe ryzyko zachorowania w porównaniu do homozygot CC (dla genotypu CT: OR=1,44; 95%CI=1,03-2,1; $p=0,032$; dla genotypu TT OR=2,36; 95%CI=1,19-4,78; $p=0,014$). Zgodnie z wynikami uzyskanymi z analizy genotypów, analiza haplotypów ujawniła częstsze występowanie haplotypu CTC (rs752118 rs1883832 rs11569343) (druga pozycja odpowiada wariantowi rs1883832) wśród pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza związku danych klinicznych z badanymi polimorfizmami ujawniła związek wariantu rs1883832 z wiekiem diagnozy oraz z długością trwania fazy RR. Nosiciele allelu T (CT i TT) wykazywali wyższe ryzyko zachorowania, natomiast choroba była u nich diagnozowana

w późniejszym wieku i dłużej pozostawali oni w fazie RR choroby. Nie zaobserwowaliśmy związku oddziaływań gen-gen pomiędzy badanymi polimorfizmami w genach *CD40* i *CD40L* z ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane.

Publikacja ta była pierwszym w literaturze doniesieniem, w którym zbadano interakcje gen-gen pomiędzy polimorfizmami zlokalizowanymi w genach *CD40* i *CD40L* w stwardnieniu rozsianym, a także pierwszą publikacją opisującą związek polimorfizmu genu *CD40* z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem stwardnienia rozsianego dla populacji polskiej. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Human Immunology* (pozycja 7 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Uzyskane wyniki skłoniły nas do kontynuacji naszych badań w tym zakresie, które poszerzyliśmy o analizę poziomu ekspresji mRNA dla obu genów. Nie zaobserwowaliśmy różnic w poziomie mRNA między pacjentami, a zdrową kontrolą dla genu *CD40*. Natomiast analiza poziomu mRNA w zależności od genotypu dla 3 badanych SNP wykazała związek obecności allelu T (genotypy CT+TT) w miejscu polimorficznym rs1883832 z niższą ekspresją mRNA dla *CD40* (CC vs CT+TT; $T^2_{df=2,76}=4,702$; $p=0,012$). Tak jak wspomniano wcześniej, gen *CD40L* zlokalizowany jest na chromosomie X (Xq26), dlatego poziom ekspresji *CD40L* był analizowany w zależności od płci. Zaobserwowaliśmy około 20% wyższą ekspresję mRNA dla tego genu w grupie kobiet zdrowych w porównaniu do kobiet chorych ($p=0,014$). Ponadto, biorąc pod uwagę tylko osoby zdrowe, odnotowaliśmy, że mężczyźni mieli o około 30% niższą ekspresję *CD40L* mRNA niż kobiety ($p=0,001$). Żaden z polimorfizmów genu *CD40L* nie był związany z poziomem mRNA. Przeanalizowaliśmy również korelacje między poziomami ekspresji obu genów. W grupie pacjentów, niezależnie od płci, nie stwierdziliśmy zależności między poziomami ekspresji obu genów. Natomiast w grupie zdrowych, zarówno kobiety jak i mężczyźni, z wyższą ekspresją mRNA dla *CD40*, mieli również wyższą ekspresję mRNA dla *CD40L*.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują na związek wariantu polimorficznego rs1883832 C>T genu *CD40* z poziomem mRNA oraz po raz pierwszy na potencjalne znaczenie zaburzonych oddziaływań *CD40-CD40L* w rozwoju stwardnienia rozsianego. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Molecular Neuroscience* (pozycja 8 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe). W przyszłości,

kierując się przesłankami literaturowymi^{27,28}, chciałabym zbadać związek genów *CD40* i *CD40L* oraz ich produktów białkowych z ryzykiem i przebiegiem CLL.

Do optymalnej aktywacji limfocytów T potrzebne są dwa sygnały - pierwszy, przenoszony przez TCR oraz drugi, pochodzący od cząsteczek kostymulujących. Równowaga pomiędzy aktywacją (CD28-CD80/CD86) i inhibicją (CTLA-4-CD80/CD86) limfocytów T jest bardzo istotna dla utrzymania tolerancji immunologicznej. Geny kodujące cząsteczki CD80/CD86 zlokalizowane są, podobnie jak *ALCAM*, w regionie 3q13 wyłonionym w GWAS jako potencjalnie związany z SM. Cząsteczki CD80 i CD86 są ligandami dla cząsteczek CD28 i CTLA-4. Liczne doniesienia literaturowe sugerują związek wariantów polimorficznych genu *CTLA-4* z SM. Należy jednak zwrócić uwagę na rozbieżności w wynikach tych badań. Dane literaturowe na temat związku wariantów polimorficznych w genach kodujących pozostałe cząsteczki z tego szlaku (CD28, CD80, CD86) są nieliczne. Biorąc pod uwagę powyższe, wydało nam się interesującym zbadanie znaczenia wariantów polimorficznych w genach kodujących cząsteczki szlaku CD28/CTLA-4-CD80/86 dla ryzyka rozwoju i przebiegu stwardnienia rozsianego.

Przeprowadziliśmy genotypowanie 11 wariantów polimorficznych wybranych na podstawie literatury oraz analizy *in silico*. Zaobserwowaliśmy związek między allelem G w miejscu polimorficznym rs231775 A>G (+49; Thr17Ala) genu *CTLA-4* a podwyższonym ryzykiem zachorowania u osób nieposiadających allelu *HLA-DRB1*15:01* ($\chi^2_{df=1}=4,66$; $p=0,031$). Ponadto wykazaliśmy również związek wariantu polimorficznego rs2715267 T>G (-3479 T>G; miejsce potencjalnego przyłączania czynnika transkrypcyjnego GATA oraz białka wiążącego element TATA) genu *CD86* z ryzykiem zachorowania na SM. Stwierdziliśmy, że nosiciele allelu G wykazywali wyższe ryzyko zachorowania, które dla homozygot GG było 1,58 razy wyższe w porównaniu do homozygot TT (OR=1,58; 95%CI=0,99-2,53). Natomiast obecność allelu A w miejscu polimorficznym rs1599795 T>A (zlokalizowanym w miejscu potencjalnego przyłączania cząsteczek miRNA) w genie *CD80* miało działanie ochronne (pierwsze doniesienie w literaturze). Analiza danych klinicznych z badanymi polimorfizmami ujawniła interakcję między trzema wariantami polimorficznymi: rs3116496T>C (*CD28*), rs6641T>G (*CD80*) i rs17281995G>C (*CD86*) a wiekiem diagnozy.

²⁷ Ferrer G, Bosch R, Hodgson K, Tejero R, Roué G, Colomer D, Montserrat E, Moreno C. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *Br J Haematol*. 2014 Feb;164(4):570-8.

²⁸ A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. Skibola CF, Nieters A, Bracci PM, Curry JD, Agana L, Skibola DR, Hubbard A, Becker N, Smith MT, Holly EA. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4348-54.

Podsumowując, nasze wyniki wykazały związek wariantów polimorficznych genów kodujących cząsteczki ze szlaku CD28/CTLA-4-CD80/86 z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem SM. Ponadto potwierdziliśmy, że stratyfikacja badanych grup ze względu na obecność allelu *HLA-DRB1*15:01* może przyczynić się do identyfikacji nowych miejsc polimorficznych związanych ze stwardnieniem rozsianym. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Neuroimmunology* (pozycja 9 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Za najważniejsze uzyskane wyniki uważam:

1. Wykazanie częstego występowania utraty heterozygotyczności z zachowaną liczbą kopii genu w regionie krótkiego ramienia chromosomu 17 (CN-LOH17p) związanego z obecnością homozygotycznych mutacji w genie *TP53* wśród pacjentów z karyotypem złożonym oraz z zaawansowaną postacią MDS lub wtórną postacią AML.
2. Wykrycie somatycznej zmiany typu CN-LOH17p związanej z 5-nukleotydową delecją w obrębie genu *TP53* jako jednego z możliwych dodatkowych zaburzeń chromosomowych obecnych w komórkach szpiku pacjenta z CML, niezawierających chromosomu Filadelfia.
3. Wykazanie częstszego występowania allelu *MICA*00801/A5.1* wśród pacjentów z T-LGL oraz udziału oddziaływań MICA-NKG2D w patogenezie tej choroby.
4. Wskazanie na potencjalny udział genów ze ścieżki BAFF/APRIL w warunkowaniu predyspozycji do CLL oraz w warunkowaniu przebiegu tej choroby.
5. Wykazanie szeregu nowych czynników związanych z ryzykiem wystąpienia SM lub/i przebiegiem tej choroby:
 - pierwsze doniesienie literaturowe dotyczące udziału wariantów polimorficznych genu *ALCAM* w warunkowaniu podatności i przebiegu SM;
 - wykazanie związku polimorfizmu oraz poziomu ekspresji genu *CD6* z SM;
 - pierwsza publikacja dotycząca związku polimorficznych wariantów genów *CD40* i *CD40L* oraz ich wzajemnych oddziaływań z podatnością i przebiegiem SM w populacji polskiej.
6. Wskazanie na potencjalny udział zaburzonych oddziaływań CD40-CD40L w patogenezie stwardnienia rozsianego.
7. Wykrycie nowych oddziaływań gen-gen związanych z ryzykiem lub przebiegiem SM (*ALCAM* i *HLA-DRB1*15:01*; *CTLA4* i *HLA-DRB1*15:01*; *CD28*, *CD80* i *CD86* z wiekiem diagnozy).

8. Potwierdzenie, że stratyfikacja badanych grup ze względu na obecności allelu *HLA-DRB1*15:01* może przyczynić się do identyfikacji nowych miejsc polimorficznych związanych ze stwardnieniem rozsianym.

Piśmiennictwo uzupełniające do autoreferatu:

1. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 2014 Jul;13(7):700-9.
2. Craig J. Complex diseases: Research and applications. *Nature Education* 2008 1(1):184.
3. Crowther-Swanepoel D, Houlston RS. Genetic variation and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol.* 2010 Dec;20(6):363-9.
4. Maciejewski JP, Tiu RV, O'Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2009 Sep;146(5):479-88.
5. Makishima H1, Maciejewski JP. Pathogenesis and consequences of uniparental disomy in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Jun 15;17(12):3913-23
6. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood.* 2010 Apr 8;115(14):2731-9.
7. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009 Jun 18;113(25):6403-10.
8. Smedby KE, Askling J, Mariette X, Baecklund E. Autoimmune and inflammatory disorders and risk of malignant lymphomas-an update.
9. Deftereos S, Farmakis D, Papadogianni A, et al. Waldenström's macroglobulinemia developing in a patient with multiple sclerosis: coincidence or association? *Mult Scler.* 2004;10(5):598-600.
10. Hjalgrim H, Rasmussen S, Rostgaard K, et al. Familial clustering of Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(10):780-784.
11. Karabon L, Pawlak-Adamska E, Tomkiewicz A, Jedynek A, Kielbinski M, Woszczyk D, Potoczek S, Jonkisz A, Kuliczowski K, Frydecka I. Variations in suppressor molecule *ctla-4* gene are related to susceptibility to multiple myeloma in a polish population. *Pathol Oncol Res.* 2012 Apr;18(2):219-26
12. Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M, Pawlak E, Ciszak L, Jedynek A, Jonkisz A, Noga L, Pokryszko-Dragan A, Koszewicz M, Frydecka I. The CTLA-4 gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology.* 2009 Sep;128(1 Suppl):e787-96.
13. Suwalska K, Pawlak E, Karabon L, Tomkiewicz A, Dobosz T, Urbaniak-Kujda D, Kuliczowski K, Wolowiec D, Jedynek A, Frydecka I. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. *Hum Immunol.* 2008 Mar;69(3):193-201
14. Nezos A, Papageorgiou A, Fragoulis G, Ioakeimidis D3, Koutsilieris M, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Voulgarelis M, Mavragani CP. B-cell activating factor genetic variants in lymphomagenesis associated with primary Sjogren's syndrome. *J Autoimmun.* 2014 Jun;51:89-98.
15. Pérez-García A1, Brunet S, Berlanga JJ, Tormo M, Nomdedeu J, Guardia R, Ribera JM, Heras I, Llorente A, Hoyos M, Esteve J, Besalduch J, Bueno J, Sierra J, Gallardo D. CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy. *Leukemia.* 2009 Mar;23(3):486-91.
16. Bolkun L, Lemancewicz, Jablonska E, Szumowska A, Bolkun-Skornicka U, Ratajczak-Wrona W, Dzieciol J, Kloczko J. The impact of TNF superfamily molecules on overall survival in acute myeloid leukaemia: correlation with biological and clinical features. *Ann Hematol.* 2015 Jan;94(1):35-43.
17. Zhai K, Tian X, Wu C, Lu N, Chang J, Huang L, Zhang T, Zhou Y, Qiao Y, Yu D, Tan W, Chen J, Lin D. Cytokine BAFF gene variation is associated with survival of patients with T-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2012 Apr 15;18(8):2250-6.
18. Krumbholz M, Meinl E. B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy. *Semin Immunopathol.* 2014 May;36(3):339-50
19. „Hematologia molekularna, patogeneza, patomechanizmy, metody badawcze” pod redakcją M. Witt, T. Szczepański, M. Dawidowska; Ośrodek Wydawnictw Naukowych, 2009.
20. „Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2011” pod redakcją prof. dr hab. Andrzeja Szczekilika.
21. Churpek JE, Onel K. Heritability of hematologic malignancies: from pedigrees to genomics. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Oct;24(5):939-72.
22. Wang SS, Purdue MP, Cerhan JR et al. Common gene variants in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamilies and NF-κB transcription factors and non-Hodgkin lymphoma risk, *PLoS one*, 4 (2009) e5360.

23. Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F et al. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10178-86.
24. Cayrol R, Wosik K, Berard JL et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol.* 2008 Feb;9(2):137-45.
25. Pinto M, Carmo AM. CD6 as a therapeutic target in autoimmune diseases: successes and challenges. *BioDrugs.* 2013 Jun;27(3):191-202.
26. De Jager PL, Jia X, Wang J, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):776-82.
27. Tan F, Mbunkui F, Ofori-Acquah SF. Cloning of the human activated leukocyte cell adhesion molecule promoter and identification of its tissue-independent transcriptional activation by Sp1. *Cell Mol Biol Lett.* 2012 Dec;17(4):571-85.
28. Pot C. Aryl hydrocarbon receptor controls regulatory CD4+ T cell function. *Swiss Med Wkly.* 2012 May 31;142:w13592.
29. Zhou P, Du LF, Lv GQ, et al. Functional polymorphisms in CD166/ALCAM gene associated with increased risk for breast cancer in a Chinese population. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jul;128(2):527-34.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 26 anglojęzycznych pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, w tym, po uzyskaniu stopnia doktora, w 22 pracach oryginalnych (pierwszy autor - 3 prace; autor korespondencyjny - 6 prac, ostatni autor - 5 prac) oraz 19 komunikatów naukowych. Sumaryczny współczynnik wpływu (*Impact Factor*, IF) prac oryginalnych wynosi 74,981 (punkty MNiSW=624). Do dnia 29 stycznia 2016 roku, według bazy Web of Science (WoS, All databases), prace były cytowane 339 razy (wyłączono autocytowania), a indeks Hirsh'a wynosi 10. Łączny IF dziewięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 32,391 (punkty MNiSW=226; liczba cytowań=56). W ramach działalności naukowej byłam do tej pory także kierownikiem 1 projektu własnego, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Uczestniczyłam także w realizacji 2 grantów przyznanych przez Komitet Badań Naukowych. Obecnie jestem wykonawcą w dwóch grantach OPUS z Narodowego Centrum Nauki.

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę magisterską zatytułowaną: „Analiza funkcjonalna ORF-u *YPR 040w* z prawego ramienia XVI chromosomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” realizowałam pod kierunkiem pani dr Gabrieli Orłowskiej-Matuszewskiej w Zakładzie Genetyki Instytutu Mikrobiologii, Uniwersytetu Wrocławskiego. Przedmiotem mojej pracy była kierunkowa inaktywacja i analiza funkcji drożdżowego genu *YPR 040w*. W ramach mojej pracy magisterskiej, wykorzystując metodę PCR, skonstruowałam kasetę deletującą, uzyskując integranty drożdżowe, które zamiast dzikiej kopii genu miały wbudowany marker selekcyjny,

a następnie przeprowadziłam analizę fenotypową uzyskanych mutantów (komunikat naukowy na XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Prague, Czech Republic, 26-31.09. 2001).

W 2001 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej (IITD) PAN we Wrocławiu w Laboratorium Immunogenetyki (obecnie Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej) kierowanym przez pana prof. dr. hab. Piotra Kuśnierczyka. Przedmiotem zainteresowań tego laboratorium jest związek polimorfizmu genów kodujących cząsteczki kontrolujące przebieg reakcji odpornościowych z chorobami człowieka. Jako słuchacz studium doktoranckiego angażowałam się we wszystkie badania naukowe prowadzone w laboratorium (polimorfizm genów *KIR*, *ILT6*).

Moje zainteresowania badawcze od początku związane są z badaniami dotyczącymi genetyczno-molekularnych uwarunkowań chorób człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem chorób wieloczynnikowych. Tematem wiodącym badań prowadzonych w ramach studiów doktoranckich była genetyka astmy oskrzelowej (polimorfizm genów *FCAR*, *CTLA-4*, *PTPN22*). Moja praca doktorska pt. „Polimorfizm genu receptora Fc immunoglobuliny A i jego potencjalny związek z astmą oskrzelową” powstała w wyniku realizacji grantu zatytułowanego „Genetyka astmy atopowej: rola receptora Fc immunoglobuliny A w podatności na tę chorobę”, w którym byłam głównym wykonawcą. Celem moich badań było:

- poszukiwanie nowych wariantów polimorficznych genu *FCAR* kodującego gen dla receptora FcαRI (CD89) z zastosowaniem elektroforezy w gradiencie temperatury (TGGE), metoda ta została przeze mnie wdrożona na użytek realizacji grantu oraz mojej pracy doktorskiej, a także innych projektów realizowanych w laboratorium;
- ocena częstości występowania nowych i wcześniej opisanych wariantów genu *FCAR* w populacji polskiej;
- ocena związku polimorfizmu genu *FCAR* z ryzykiem zachorowania na alergiczną astmę oskrzelową, jak również z ciężkością jej przebiegu;
- porównanie ekspresji receptora FcαRI (CD89) na eozynofilach krwi obwodowej osób zdrowych i chorych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej;
- porównanie ilości endogennej IgA związanej przez eozynofile krwi obwodowej osób zdrowych i chorych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej;

- zbadanie, czy istnieje związek między poziomem ekspresji receptora FcαRI na eozynofilach a wariantami polimorficznymi zlokalizowanymi w promotorze i 5'regulatorowym regionie genu *FCAR*.

W wyniku przeprowadzonych badań wykryłam dwa nowe warianty polimorficzne genu *FCAR* (-143G>A; 805A>G). Moje badania były pierwszym populacyjnym badaniem polimorfizmu genu *FCAR*, w którym określono częstości występowania siedmiu SNP oraz utworzonych przez nie haplotypów w grupie osób zdrowych i chorych. Stwierdziłam również związek homozygotyczności 324AA z cięższym przebiegiem choroby, a także wykazałam, że ilość endogennej IgA związanej przez eozynofile krwi obwodowej była znamienne wyższa u pacjentów z alergiczną astmą oskrzelową niż u osób zdrowych. Nie stwierdziłam natomiast istotnych różnic w poziomie ekspresji CD89 na eozynofilach osób zdrowych i chorych. Zaobserwowałam również, że osoby o genotypie -114CC; +56CC miały wyższy poziom ekspresji receptora CD89 na eozynofilach (opublikowano częściowo w: *Eur J Immunogenet.* 2004, *Int Arch Allergy Immunol.* 2004).

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po zakończeniu studium doktoranckiego przy IITD PAN i uzyskaniu tytułu doktora nauk biologicznych w zakresie biologii (grudzień 2005 r.) wyjechałam na długoterminowy staż naukowy do Stanów Zjednoczonych Ameryki (styczeń 2006 r.). Staż odbyłam w dwóch ośrodkach: University of Pennsylvania (UPENN) w laboratorium prof. Alana Gewirtz'a oraz Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic w laboratorium prof. Jarosława Maciejewskiego.

Podczas pierwszego stażu podoktorskiego zaangażowana byłam w projekt realizowany we współpracy z zespołem prof. Erica A Pierce (Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, obecnie Department of Ophthalmology, Harvard Medical School), którego celem było rozwinięcie strategii użycia jednoniciowych oligodeoksynukleotydów (ssODN) do wprowadzenia specyficznych mutacji punktowych do wybranych genów poprzez transfekcję mysich komórek embrionalnych (mouse embryonic stem cells). W zamyśle, uzyskane w ten sposób mysie modele miały służyć jako modele do badania patogenezy wybranych chorób dziedzicznych. Miały one także służyć jako model do testowania nowych terapii opracowanych dla wybranych chorób. Projekt zakładał opracowanie metod z wykorzystaniem modelu mysich komórek embrionalnych, natomiast jego dalekosiężnym celem była ekstrapolacja tej techniki na ludzkie hematopoetyczne komórki macierzyste, zarówno dla

celów naukowych, jak i potencjalnie dla celów leczniczych. Osobiście byłam zaangażowana w testowanie i optyimizację strategii transfekowania komórek ES dwoma ssODN (dual oligonucleotide gene targeting in mouse ES cells). Projekt nie powiódł się ze względu na bardzo niską wydajność rekombinacji homologicznej i brak czułych metod jej detekcji w transfekowanych i wyselekcjonowanych klonach komórek ES.

Ponadto byłam zaangażowana w szereg mniejszych projektów, których celem było:

- testowanie efektywności wyciszania genów z zastosowaniem modyfikowanych antysensownych oligonukleotydów (AS ODNs) oraz siRNA;
- ocena efektywności *in vitro* związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej wobec linii komórkowych oraz ludzkich komórek izolowanych od pacjentów (primary human cells);
- testowanie *in vitro* efektywności różnych metod dostarczania potencjalnych leków do komórek;
- mapowanie mRNA wybranych genów w celu identyfikacji miejsc dla hybrydyzacji antysensownych ODNs z zastosowaniem SQRMs (self-quenching reporter molecules).

W badaniach tych wykorzystywałam szereg metod hodowli komórkowych oraz technik biologii molekularnej (hodowla linii komórkowych rosnących w zawieszynie i komórek adherentnych, hodowla ludzkich komórek białaczkowych izolowanych od pacjentów, hodowla komórek progenitorowych CD34+ pochodzących od zdrowych dawców, hodowla mysich komórek embrionalnych (ESC), test LTC-IC (Long-Term Culture-Initiating Cell Assay), test CFU (the colony-forming unit assay); transfekcja różnych typów komórek (z wykorzystaniem Amaxa nucleofector; Lipofectmine 2000), klonowanie, analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR oraz Western-blot, cytometria przepływowa, mapowanie mRNA z użyciem SQRM, transkrypcja *in vitro*, RNase H cleavage assay).

Podczas drugiego stażu podoktorskiego zaangażowana byłam w badania nad genetyczno-molekularnymi uwarunkowaniami chorób hematologicznych:

- wyznaczanie regionów CDR (common deletion region) w oparciu o dane uzyskane z analizy SNP-A, w celu identyfikacji genów potencjalnie zaangażowanych w patogenezę analizowanych jednostek chorobowych;
- identyfikacja mutacji lub wariantów polimorficznych w genach wytypowanych przez SNP-A oraz badania nad ich funkcjonalnym znaczeniem (np. *TP53*, *MICA*, *RUNX1*, *NFI*);
- badania nad genetycznymi uwarunkowaniami anemii aplastycznej;

- analiza ekspresji i metylacji genów.

(Wyniki części moich badań zostały opublikowane - pozycje 1-3 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe oraz pozycje 2-4 Załącznik 3 pkt II A lub zaprezentowane w postaci plakatów na konferencjach naukowych pozycje 5-12 Załącznik 3 pkt III B).

Po zakończeniu stażu podoktorskiego w styczniu 2010 roku ponownie podjęłam pracę w zespole Pana prof. Piotra Kuśnierczyka w Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej IITD PAN, gdzie rozpoczęłam realizację własnych projektów badawczych. W 2011 roku otrzymałam grant finansowany przez NCN pt. „Polimorfizm genów *TNFSF13B*, *TNFSF13*, *TNFRSF17*, *TNFRSF13B* i *TNFRSF13C* w przewlekłej białaczce limfatycznej B komórkowej”. Równolegle jako promotor pomocniczy sprawowałam opiekę naukową nad projektem badawczym i pracą doktorską Pani mgr inż. Marty Wagner (byłam autorem pomysłu i koncepcji przeprowadzonych badań, sprawowałam nadzór merytoryczny nad ich przebiegiem oraz brałam udział we wszystkich etapach prowadzących do opublikowania ich wyników). Obecnie jestem promotorem pomocniczym we wszczętym przewodzie doktorskim Pani mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej, a także wykonawcą w dwóch grantach OPUS. Ponadto prowadzę aktywną współpracę naukową z Panią dr hab. Lidią Karabon, prof. IITD PAN z Laboratorium Immunopatologii, IITD PAN, polegającą na pisaniu wspólnych projektów badawczych oraz publikacji. Współpracuję również z: Katedrą i Kliniką Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu; Katedrą i Zakładem Immunologii Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Kliniką Neurologii, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

28.01.2016r.

Data

Kosmika Jasiel

Podpis