

A U T O R E F E R A T

dr Lidia Karabon

Laboratorium Immunopatologii

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wrocław 2012

1. Imię i nazwisko

Lidia Karabon

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

- dyplom mgr inż. chemika Politechniki Wrocławskiej w roku 1985
- dyplom doktora nauk biologicznych – Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w roku 2003 – tytuł rozprawy doktorskiej ”Związek pomiędzy polimorfizmem genów kodujących IL-6 i IL-10 u biorców i dawców przeszczepu komórek hematopoetycznych a podatnością na toksyczność chemioterapii przeszczepowej i wystąpienie ostrej postaci choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (aGvHD)”- promotor -prof. Andrzej Lange.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- Laboratorium Badań Środowiskowych Spółdzielni Lekarzy Specjalistów i Stomatologów „Vita” we Wrocławiu w latach 1985-1988 na stanowisku młodszego asystenta
- Instytut Ropy i Węgla, Politechnika Wrocławska we Wrocławiu w latach 1988-1991 na stanowisku młodszego asystenta
- Laboratorium Immunologiczne w Zespole Przeszczepiania Szpiku z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku w Szpitalu K Dłuski we Wrocławiu w latach 1991- 2001 na stanowisku asystenta
- Laboratorium HLA Krajowego Banku Dawców Szpiku w Dolnośląskim Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku 2001-2005- na stanowisku kierownika Laboratorium

- Oddział Onkologii I Hematologii Szkoły Medycznej Uniwersytetu Pensylwania w Filadelfii (Department of Hematology/ Oncology University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA) w latach 2004-2005 na stanowisku Visiting Scholar
- Laboratorium Immunopatologii w Zakładzie Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu od 2006 do teraz na stanowisku adiunkta.

Dorobek Naukowy:

Moja działalność naukowa zaowocowała dotąd publikacją **24** pełnotekstowych prac naukowych (**23** prace oryginalne i jedna praca pogładowa), w tym 16 prac zostało opublikowanych po doktoracie. Jestem współautorem rozdziału w angielskojęzycznej monografii dotyczącej przewlekłej białaczki limfocytowej. W 10 pracach byłam pierwszym autorem, w 2 równorzędnym pierwszym autorem i w 3 drugim autorem, w 9 autorem korespondencyjnym.

Łączny Impact Factor mojego dorobku za pełne prace wynosi **53.644** (KBN - **469** punkty, a Index Copernicus IC - **279.6**) w tym za prace opublikowane po doktoracie **44.981**. Indeks cytowań moich publikacji wg analizy Web of Science za lata 1997-2011 wykazał **223 cytowania**, Index Hirscha- **8**. Łączny IF cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **14,80**. Jestem autorką i współautorką **88** doniesień zjazdowych (ustnych lub plakatowych) prezentowanych na 16 konferencjach krajowych i 37 konferencjach zagranicznych.

4. a) Cykl prac stanowiący szczególne osiągnięcie naukowe (w/g artykułu 16.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr65, poz. 595 ze zm.) zatytułowany „Związek polimorfizmu genów kodujących cząsteczki kostymulujące: CD28 i ICOS i cząsteczkę supresorową CTLA-4 z podatnością na choroby nowotworowe i autoimmunologiczne”:

- 4.1. Suwalska K., Pawlak E., **Karabon L.**, Tomkiewicz A., Dobosz T., Urbaniak-Kujda D., Kuliczkowski K., Wołowicz D., Jedynak A., Frydecka I.: Association studies of *CTLA-4*, *CD28*, and *ICOS* gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in a Polish population. *Hum Immunol.*, 2008, 69, 193-201.

IF - 3.061 KBN - 27 Indeks cytowań - 12 Index Copernicus - 12.90

Udział własny: 40%

Nadzór merytoryczny nad metodyką i interpretacją wyników, wykonanie części genotypowań polimorfizmów w genach *CTLA-4*, *CD28* i *ICOS*, analiza statystyczna wyników. Znaczący udział w pisaniu manuskryptu, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny.

- 4.2. **Karabon L.**, Kosmaczewska A., Bilińska M., Pawlak E., Ciszak L., Jedynak 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, 128, 787-796.

IF - 3.432 KBN - 27 Indeks cytowań - 6 Index Copernicus - 13.43

Udział własny: 50%

Poszerzenie uprzednio wykonanych badań polimorfizmów CTLA-4 (A49G, C-319T, (AT) 642) o 2 nowoopisane polimorfizmy Jo31 i CT60 genu CTLA-4, analiza

haplotypu obejmującego wszystkie miejsca polimorficzne badane w genie CTLA-4 w aspekcie ich związku z ryzykiem zachorowania na SR, pierwszą manifestację choroby i jej przebiegiem. Ocena związku obecności wybranych wariantów genetycznych z ekspresją powierzchniowego i wewnątrzkomórkowego białka CTLA-4 w poszczególnych fazach choroby, nadzór merytoryczny nad metodyką i interpretacją wyników. Napisanie manuskryptu, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny.

- 4.3. Pawlak E., **Karabon L.**, Włodarska-Polińska I., Jedynak A., Jonkisz A., Tomkiewicz A., Kornafel J., Stępień M., Ignatowicz A., Lebioda A., Dobosz T., Frydecka I.: Influence of *CTLA-4/CD28/ICOS* gene polymorphisms on the susceptibility to cervical squamous cell carcinoma and stage of differentiation in the Polish population. *Hum Immunol.*, 2010, 71, 195-200.

IF - 2.872 KBN - 27 Indeks cytowań - 7 Index Copernicus - 2.00

Udział własny: 25%

Nadzór merytoryczny nad metodyką badań współudział w interpretacji wyników, wykonanie części genotypowań polimorfizmów w genach *CTLA-4*, *CD28* i *ICOS*, udział w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

- 4.4. **Karabon L.**, Pawlak E., Tomkiewicz A., Kielbiński M., Potoczek S., Woszczyk D., Jonkisz A., Kuliczkowski K., Frydecka I.: Lack of association between *CD28* gene polymorphism and multiple myeloma in a polish population. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2009, 18, 129-133.

IF - 0 KBN - 9 Indeks cytowań - 0 Index Copernicus - 9.0

Udział własny: 60%

Nadzór merytoryczny nad metodyką badań współudział w genotypowaniu polimorfizmu CD28.c+17T>C i interpretacją wyników, napisanie manuskryptu, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny.

- 4.5. **Karabon L.**, Jedynak A., Tomkiewicz A., Wołowiec D., Kielbiński M., Woszczyk D., Kuliczkowski K., Frydecka I.: *ICOS* gene polymorphisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. *Folia Histochem Cytobiol.*, 2011, 49, 49-54.

IF - 1.08 KBN - 13 Indeks cytowań - 0 Index Copernicus - 11.80

Udział własny: 60%

Koncepcja pracy, zaprojektowanie doświadczenia, wykonanie genotypowania miejsc polimorficznych w genie *ICOS*, interpretacja wyników, analiza statystyczna związku miejsc polimorficznych z ryzykiem zachorowania, przebiegiem choroby. Napisanie manuskryptu, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny.

- 4.6. **Karabon L.**, Pawlak E., Tomkiewicz A., Jedynak A., Passowicz-Muszyńska E., Zajda K., Jonkisz A., Jankowska R., Krzakowski M., Frydecka I.: *CTLA-4*, *CD28*, and *ICOS* gene polymorphisms associations with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Hum Immunol.*, 2011, 72, 947-954.

IF - 2.872 KBN - 27 Indeks cytowań - 0 Index Copernicus - 2.00

Udział własny: 60%

Udział w koncepcji pracy, nadzór merytoryczny nad metodyką badań i współudział w genotypowaniu polimorfizmów w genach *CTLA-4*, *CD28* i *ICOS*, interpretacja wyników, analiza statystyczna związku miejsc polimorficznych z ryzykiem

zachorowania na niedrobnokomórkowego raka płuc. Napisanie manuskryptu, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny.

- 4.7. **Karabon L.**, Pawlak E., Tomkiewicz A., Jedynak A., Kielbiński M., Woszczyk D., Potoczek S., Jonkisz A., Kuliczkowski K., Frydecka I.: Variations in suppressor molecule *CTLA-4* gene are related to susceptibility to multiple myeloma in a Polish population. *Pathol Oncol Res.*, 2011,9, Epub ahead of print

IF - 1.483 KBN - 20 Indeks cytowań - 0 Index Copernicus - 2.00

Udział własny: 60%

Udział w koncepcji pracy, nadzór merytoryczny nad metodyką badań i współudział w genotypowaniu polimorfizmów w genie *CTLA-4* interpretacja wyników, analiza statystyczna związku miejsc polimorficznych z ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego. Napisanie manuskryptu, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach, autor korespondencyjny

- 4.8. **Karabon L.** and Frydecka I.: The role of polymorphisms in co-signalling molecules in susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Rozdział w podręczniku: Chronic Lymphocytic Leukemia, 2012, Intech, Croatia, 179-200

Udział własny: 80%

Wybór tematu, analiza literatury, napisanie rozdziału, autor korespondencyjny.

4. b) Omówienie celu naukowego cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (w/g artykułu 16.2 ustawy) pod tytułem „Związek polimorfizmu genów kodujących cząsteczki kostymulujące: CD28 i ICOS i cząsteczkę supresorową CTLA-4 z podatnością na choroby nowotworowe i autoimmunologiczne”

Zaburzenia regulacji odpowiedzi immunologicznej leżą u podstaw zjawisk prowadzących do rozwoju chorób, w których układ immunologiczny odgrywa znaczącą rolę. Nadmierna stymulacja układu odpornościowego może prowadzić do chorób z grupy autoagresji, natomiast upośledzony nadzór immunologiczny do rozwoju procesów nowotworowych. W obu tych sytuacjach klinicznych ważną rolę odgrywa regulacja aktywacji limfocytów T.

Optymalna aktywacja limfocytów wymaga dwóch sygnałów. Kluczowe znaczenie ma rozpoznanie swoistego peptydu antygenowego przez strukturę limfocyty T TCR/CD3 (receptor limfocyty T; *T-cell receptor*), ale ostateczny efekt przekazania sygnału z tego receptora do jądra komórki zależy od cząsteczek modulujących ten proces zwanych cząsteczkami kostymulującymi lub kosygnałowymi.

W obecności drugiego sygnału płynącego od cząsteczek kostymulujących stymulacja antygenowa limfocytów wywołuje efektywną odpowiedź w postaci proliferacji, różnicowania, klonalnej ekspansji komórek T, umożliwiającej pełnienie funkcji efektorowych związanych z produkcją cytokin i cytotoksycznością. Brak drugiego sygnału prowadzi do długotrwałej niereaktywności na bodźce antygenowe, zwanej anergią. Nieobecność sygnału kostymulującego może również indukować apoptotyczną śmierć komórki T.

Najsilniejszy sygnał kostymulujący powstaje w wyniku interakcji pomiędzy cząsteczką CD28 na powierzchni limfocyty T a jego naturalnymi ligandami znajdującymi się na komórce prezentującej antygen (APC), którymi są cząsteczki należące do rodziny B.7: CD80, CD86. W wyniku wiązania z ligandem, CD28 przekazuje sygnał do jądra komórkowego, co

wywołuje aktywację i proliferację limfocytu T i wydzielanie IL-2. Dodatkowo wzrasta wydzielanie innych cytokin takich jak: IFN- γ , GM-CSF, IL-4, IL-8 i IL-13. Przekazywanie sygnału przez szlak CD28/B7 zapobiega anergii limfocytów T.

Kolejną cząsteczką kostymulującą jest ICOS (*Inducible co-stimulator*), który w przeciwieństwie do CD28 nie jest konstytutywnie ekspresjonowany na limfocytach T, natomiast pojawia się w wyniku aktywacji na powierzchni limfocytów CD4⁺ w subpopulacjach Th0, Th1, Th2, Th17 i Treg. Ligandem dla ICOS jest B7RP-1, cząsteczka należąca do nadrodziny B.7. Podobnie jak w przypadku CD28, związanie ICOS z ligandem dostarcza sygnału do aktywacji, różnicowania i proliferacji komórek T. Aktywacja via ICOS/B7RP-1 wzmacnia funkcje efektorowe limfocytów T, w szczególności wydzielanie IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α i IFN- γ , natomiast nie powoduje zwiększenia wydzielania IL-2.

W przebiegu aktywacji limfocytów T pojawia się na ich powierzchni również cząsteczka CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocytes associated antigen-4*) (CD152), strukturalny homolog CD28, uważana za jeden z głównych inhibitorów wczesnej aktywacji limfocytów T. Związanie się cząsteczki CTLA-4 z ligandem na komórce prezentującej antygen, którym podobnie jak w przypadku CD28 jest CD80 lub CD86, prowadzi do zmniejszenia wydzielania IL-2, hamowania cyklu komórkowego, zmniejszonej ekspresji cytokin i hamowania proliferacji limfocytów T. CTLA-4 wiąże się do ligandów CD80 i CD86 z wyższym powinowactwem niż cząsteczka CD28 i wypiera ją z połączeń z ligandami CD80 i CD86. Wykazano, że zasadnicza pula białka CTLA-4 zlokalizowana jest w cytoplazmie komórki, skąd tylko niewielka jego ilość jest transportowana w czasie aktywacji do błony komórkowej, gdzie spełnia ona swą funkcję supresorową i hamuje sygnały aktywujące limfocyt T.

Rola cząsteczek kosygnałowych w nadzorze immunologicznym została przeze mnie szczegółowo opisana w podrozdziale "Co-signaling molecules – overview" w rozdziale: „The role of polymorphisms in co-signalling molecules in susceptibility to B-cell chronic

lymphocytic leukemia” książce „Chronic Lymphocytic Leukemia” (4.8 w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

W schorzeniach autoimmunologicznych i nowotworowych stwierdza się nieprawidłową ekspresję cząsteczek kosygnałowych. Zaburzenia ekspresji tych cząsteczek mogą być związane z występowaniem polimorfizmów w genach je kodujących. Obecność wariantów genetycznych może wpływać na poziom transkrypcji, translacji lub na zmienione właściwości białka i w ich następstwie zmianę funkcji białka, co konsekwencji może różnicować podatność poszczególnych osób na choroby, w rozwoju których zaburzenia immunologiczne odgrywają zasadniczą rolę.

Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się na związku polimorfizmów genów kodujących cząsteczki kostymulujące: CD28, ICOS i cząsteczkę supresorową CTLA-4 z podatnością na zachorowanie i przebieg schorzeń autoimmunologicznych (stwardnienie rozsiane) oraz nowotworowych (przewlekłej białaczki limfocytowej, szpiczaka mnogiego, raka szyjki macicy i niedrobnokomórkowego raka płuc).

Wyboru polimorfizmów w genach *CTLA4*, *ICOS* i *CD28* dokonano na podstawie doniesień literaturowych, kierując się przede wszystkim ich znaczeniem funkcjonalnym, tzn. wybierano te polimorfizmy, których obecność wiąże się z różną transkrypcją, translacją lub funkcją białka.

Najwięcej publikacji literaturowych dotyczyło badania związków polimorfizmów genu kodującego cząsteczkę CTLA-4, początkowo w kontekście chorób autoimmunologicznych, a ostatnio chorób nowotworowych, gdyż jest ona najsilniejszym negatywnym regulatorem odpowiedzi immunologicznej. Wśród polimorfizmów występujących w tym genie, najczęściej był badany polimorfizm CTLA-4c.49A>G w pierwszym eksonie genu w pozycji +49 (wymiana adeniny na guaninę), której konsekwencją jest zmiana aminokwasu treoniny

na alaninę w peptydzie liderowym. Zmiana aminokwasu skutkuje obniżeniem efektywności hamowania aktywacji limfocytów T przez cząsteczkę CTLA-4.

Innym często opisywanym miejscem polimorficznym była wymiana pojedynczego nukleotydu C na T w promotorze genu *CTLA-4* w pozycji -319. Badanie funkcjonalne wskazują, że obecność allelu T w miejscu CTLA-4g.319C>T jest związana z wyższą aktywnością promotora i ze znacząco wyższą ekspresją zarówno mRNA dla CTLA-4 jak i wyższą ekspresją powierzchniowej cząsteczki CTLA-4 w stymulowanych i niestymulowanych limfocytach T.

Miejsca polimorficzne zlokalizowane w 3' nietranslacyjnym regionie genu wpływają na stabilność mRNA oraz na rodzaj i poziom translacji poszczególnych izoform białka powstającego w wyniku alternatywnego składania mRNA.

W literaturze opisano wpływ polimorfizmu mikrosatelitarnego w 3' nietranslacyjnym regionie CTLA-4g.*642AT(8-33) na poziom transkrypcji i stabilność mRNA. Stwierdzono, że allel najkrótszy – w którym występuje 8 powtórzeń AT - charakteryzuje się najwyższą stabilnością mRNA i najwyższą ekspresją cząsteczki CTLA-4.

Kolejnymi wybranymi przeze mnie polimorfizmami zlokalizowanymi w 3' nietranslacyjnym regionie genu *CTLA-4* były CT60A>G i Jo31G>T. Zostały one opisane jako markery podatności na choroby autoimmunologiczne, a w szczególności na chorobę Gravesa Basedowa. Ponadto stwierdzono, że polimorfizm CT60A>G moduluje alternatywne składanie mRNA i wpływa na stosunek powstających izoform CTLA-4: rozpuszczalnej sCTLA-4 - pozbawionej części przez błonowej, przez co krążącej w surowicy, oraz pełnej - występującej w cytoplazmie komórki lub na jej powierzchni.

W genie *CD28* miejsca polimorficzne nie były tak szeroko badane jak w przypadku genu *CTLA-4*. Najczęściej opisywanym w literaturze polimorfizmem była wymiana tymidyny na

cytozynę w 3 intronie genu *CD28* w pozycji 17 (CD28c.17+3T>C). Polimorfizm ten jest usytuowany w miejscu, w którym wiązane są czynniki wpływające na wydajność alternatywnego składania mRNA.

Pomimo znaczącej roli indukowalnej cząsteczki kostymulującej ICOS w nadzorze immunologicznym, tylko nieliczne prace opisywały znaczenie polimorfizmów występujących w genie ją kodującym, jako czynnika ryzyka zachorowania na choroby autoimmunologiczne i nowotworowe. Nasze zainteresowanie skupiło się na polimorfizmie mikrosatelitarnym ICOSc.1554+4GT(8_15) usytuowanym w pobliżu miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1, gdyż postuluje się, że obecność tego polimorfizmu zmienia aktywność transkrypcyjną tego czynnika. Ponadto badaliśmy miejsca polimorficzne ICOSc.602A>C, ICOSc.1624C>T i ICOSc.2373G>C w 3' nietranslacyjnym regionie genu ponieważ wykazano, że obecność poszczególnych wariantów genetycznych związana jest z różną ekspresją cząsteczki ICOS oraz różnicami w poziomie wydzielania IL-10 i w konsekwencji z obniżoną odpowiedzią immunologiczną zależną od limfocytów T oraz nieprawidłowym dojrzewaniem limfocytów B.

Doniesienia literaturowe wskazywały również, że wybrane przez nas miejsca polimorficzne są markerami genetycznymi podatności na choroby autoimmunologiczne i pojawiały się pierwsze doniesienia o ich znaczeniu w podatności na choroby nowotworowe.

Związek polimorfizmów genów kodujących cząsteczkę kostymulującą CTLA-4 z podatnością na zachorowanie na schorzenie autoimmunologiczne – stwardnienie rozsiane.

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną ośrodkowego systemu nerwowego, w rozwoju której kluczową rolę odgrywają autoreaktywne limfocyty CD4+ skierowane przeciwko antygenom mieliny. Zaburzona ekspresja cząsteczki CTLA-4, hamującej aktywację limfocytów T, ma istotne znaczenie w przebiegu stwardnienie

rozszianego. Dlatego też, polimorfizmy w genie kodującym tą cząsteczkę, stały się przedmiotem zainteresowania kilku grup badawczych. Jednak opisywane w literaturze wyniki były niespójne i często przeciwstawne. Wskazywano na różne czynniki predestynujące do zachorowania na stwardnienie rozsiane: a) obecność allelu G w miejscu polimorficznym CTLA-4c.49A>G, b) obecność allelu C w miejscu polimorficznym CTLA-4g.319C>T, c) obecność allelu G w polimorfizmie CT60A>G, d) obecność krótkich alleli (8 powtórzeń AT) w polimorfizmie CTLA-4g.*642AT(8-33). Niektóre doniesienia zaprzeczały związkowi wyżej wymienionych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane. Nie było w literaturze prac dotyczących związku polimorfizmu Jo31G>T z zachorowaniem na to schorzenie. Nieliczne prace dotyczyły związku miejsc polimorficznych z przebiegiem choroby, a w żadnej pracy nie korelowano polimorfizmów z wystąpieniem pierwszych objawów choroby. Ponadto brak było danych dotyczących korelacji polimorfizmów z poziomem ekspresji białka u chorych na stwardnienie rozsiane.

W naszej pracy opublikowanej w *Immunology* (pozycja **4.2** w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, **IF3.432**), oznaczaliśmy 5 polimorfizmów CTLA-4g.-319C>T, CTLA-4c.49A>G, CT60A>G, Jo31G>T i CTLA-4g.*642AT(8-33) genu *CTLA-4* i badaliśmy ich związek z podatnością na zachorowanie, z przebiegiem stwardnienia rozsianego, oraz z wystąpieniem pierwszych objawów choroby.

Nasze badania wykazały, że CTLA-4g.-319C>T, CTLA-4c.49A>G, i CTLA-4g.*642AT(8-33) nie mają związku z podatnością na zachorowanie na stwardnienie rozsiane w populacji polskiej.

Natomiast stwierdziliśmy, że obecność allelu [G] w miejscach polimorficznych CT60A>G i/lub Jo31G>T zwiększała prawie dwukrotnie ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane. Trudnym do wytłumaczenia był fakt, że pacjenci o genotypach predestynujących do choroby,

wykazywali wolniejszą progresję do formy wtórnie postępującej i niższe ryzyko wystąpienia parestezji i objawów piramidalnych jako pierwszej manifestacji choroby.

W celu wyjaśnienia tego zjawiska skorelowaliśmy ekspresję zarówno cytoplazmatycznego jak i powierzchniowego CTLA-4 z poszczególnymi genotypami oraz postacią choroby.

Zaobserwowaliśmy, że wśród chorych na stwardnienie rozsiane pacjenci ze zwalniającą postacią choroby, posiadający predestynujący do choroby genotyp Jo31G>T[GG] i/lub CT60A>G[GG], mają mniejszą niż pacjenci o niepredestynujących genotypach, gęstość cytoplazmatycznego i powierzchniowego białka CTLA-4 w pojedynczej komórce (określaną ilościowo poprzez oznaczanie średniego kanału fluorescencji (MFI)) oraz niższy odsetek komórek CD4⁺ wykazujących ekspresję cytoplazmatycznego i powierzchniowego CTLA-4.

U pacjentów o genotypach predestynujących do SR: Jo31G>T[GG] i CT60A>G[GG], u których nastąpiła progresja choroby do formy wtórnie postępującej, gęstość cytoplazmatycznego i powierzchniowego białka CTLA-4 była podobnie jak u pacjentów ze zwalniającą postacią choroby, mniejsza niż u chorych o innych genotypach. Natomiast odsetek komórek wykazujących ekspresję cytoplazmatycznego i powierzchniowego CTLA-4 w populacji limfocytów CD4⁺ był znacząco niższy u pacjentów posiadających genotyp niepredestynujący do choroby Jo31G>T[AA+AG] i CT60A>G[TT+GT] w stosunku do pacjentów o genotypie Jo31G>T[GG] i CT60A>G[GG].

Na podstawie powyższych badań wysnułam hipotezę, że obniżony odsetek komórek wykazujących ekspresję immunosupresorowej cząsteczki CTLA-4, obserwowany u pacjentów posiadających niepredestynujący do choroby genotyp Jo31G>T[AA+AG] i CT60A>G[TT+GT], prowadzi do zaburzonego hamowania trwającej odpowiedzi limfocytów T i w konsekwencji wcześniejszej progresji choroby.

Było to pierwsze w literaturze doniesienie wykazujące wpływ polimorfizmów na poziom ekspresji zarówno powierzchniowego jak i wewnątrzkomórkowego białka CTLA-4 w limfocytach CD4+ chorych na stwardnienie rozsiane. Ponadto, jako pierwsi, wykazaliśmy związek polimorfizmu Jo31G>T z ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane i potwierdziliśmy doniesienia wskazujące rolę allelu G w miejscu CT60A>G jako czynnika zwiększającego ryzyko zachorowania na to schorzenie autoimmunologiczne.

Związek polimorfizmów genów kodujących cząsteczki kostymulujące: CD28, ICOS i cząsteczkę supresorową CTLA-4 z podatnością na zachorowanie i przebieg schorzeń nowotworowych

W przypadku wielu chorób nowotworowych nie udało się tej pory zidentyfikować jednego, silnie predysponującego do choroby regionu chromosomu/genu (ang. *major disease-causing locus*). Dlatego też wydaje się, że współdziedziczenie wielu wariantów niskiego ryzyka (ang. *low-risk variants*) jest prawdopodobnym modelem genetycznej predyspozycji do schorzeń nowotworowych. Za takim modelem dziedziczenia przemawiają również wyniki wielu badań genetycznych przeprowadzonych wśród chorych niespokrewnionych, które wykazywały związek chorób nowotworowych z licznymi genami.

Ponieważ upośledzony nadzór immunologiczny może prowadzić do rozwoju procesów nowotworowych, również polimorfizmy w genach kodujących cząsteczki regulujące aktywację limfocytów T: CTLA-4, ICOS, CD28, powinny być rozważane przy badaniu genów- wariantów niskiego ryzyka.

W czasie kiedy rozpoczęliśmy nasze badania nad związkiem polimorfizmów genów CD28, CTLA-4 i ICOS z podatnością na zachorowanie i przebieg schorzeń nowotworowych w literaturze pojawiały się dopiero pierwsze doniesienia dotyczące tego zagadnienia. Badania dotyczyły zazwyczaj pojedynczych miejsc polimorficznych, w różnych rodzajach schorzeń

nowotworowych, w różnych populacjach i wyniki uzyskiwane przez poszczególnych badaczy były często sprzeczne.

Pierwszym projektem, nad którym pracował nasz zespół było zbadanie związku polimorfizmów *CD28*, *CTLA-4* i *ICOS* z podatnością na zachorowanie i przebieg przewlekłej białaczki limfocytowej B- komórkowej.

Przewlekła białaczka limfocytowa B - komórkowa (B-PBL) należy do klonalnych chorób limfoproliferacyjnych i związana jest z rozrostem małych dojrzałych morfologicznie limfocytów B o fenotypie CD5, CD19, CD23. Wyniki badań prowadzonych w naszym zespole oraz doniesienia literaturowe stwierdzały podwyższoną ekspresję białka supresorowego CTLA-4 i nieprawidłową kinetykę ekspresji cząsteczek CTLA-4 i CD28 w limfocytach T krwi obwodowej chorych na B-PBL, wskazującą na wcześniejszą i silniejszą indukcję sygnałów hamowania procesu aktywacji limfocytów T. Biorąc pod uwagę znaną wzajemnie odwrotną fizjologiczną regulację ekspresji CD28 i CTLA-4 na poziomie transkrypcji blisko siebie leżących genów, można było przypuszczać, że polimorfizmy występujące w tych genach mogą wpływać na zaburzoną ekspresję tych białek i na podatność na zachorowanie na B-PBL. W czasie, gdy pracowaliśmy nad projektem, w literaturze pojawiło się tylko jedno doniesienie dotyczące wpływu polimorfizmu genu CTLA-4 na zachorowanie na chłoniaki nieziarnicze w populacji Sardyńskiej, w którym grupa pacjentów chorych na B-PBL liczyła jedynie 29 osób.

Po raz pierwszy przeprowadziliśmy badania na dużej, reprezentatywnej i jednorodnej pod względem rozpoznania grupie chorych na B-PBL i skorelowaliśmy obecność poszczególnych wariantów genetycznych nie tylko z ryzykiem zachorowania, ale także z przebiegiem choroby.

Wykazaliśmy, że spośród trzech badanych polimorfizmów w genie CTLA-4: CTLA-4g.-319C>T, CTLA-4c.49A>G i CTLA-4g.*642AT(8-33) tylko polimorfizm CTLA-4g.-

319C>T był związany z podatnością na zachorowanie na przewlekłą białaczkę limfocytową. Posiadacze allelu T (genotypy CTLA-4g.-319C>T[TT+CT]) byli znamienne częściej reprezentowani wśród chorych na B-PBL niż wśród osób zdrowych. Co więcej, u pacjentów posiadających allel T znamienne częściej odnotowywano progresję choroby wyrażoną przejściem do wyższego stadium zaawansowania klinicznego w/g Rai w czasie 24 miesięcznej obserwacji. Wyniki te wskazują, że posiadanie alelu T, którego obecność jest związana z wyższą aktywnością promotora i z wyższą ekspresją powierzchniowej cząsteczki CTLA-4, zwiększa ryzyko zachorowania i szybszej progresji B-PBL.

Opisaliśmy również związek polimorfizmu CD28.c.17+3T>C w genie *CD28* z podatnością na B-PBL. Stwierdziliśmy, że obecność allelu C (genotyp CD28.c.17+3T>C[CT+CC]) prawie dwukrotnie zwiększała ryzyko zachorowania i była związana z częstszym niż wśród homozygot CD28.c.17+3T>C[TT] przejściem do wyższego stadium zaawansowania klinicznego w/g Rai w czasie 24 miesięcznej obserwacji. Było to pierwsze w literaturze doniesienie wskazujące na związek miejsca polimorficznego CD28.c.17+3T>C z ryzykiem zachorowania na choroby rozrostowe układu krwiotwórczego.

Ciekawą obserwacją było również wskazanie związku polimorfizmu mikrosatelitarnego ICOSc.1554+4GT(8_15) z podatnością na zachorowanie na B-PBL. Stwierdziliśmy, że posiadacze alleli krótkich - 8-9 powtórzeń GT - występują znamienne statystycznie częściej wśród chorych niż wśród osób zdrowych. Doniesienia literaturowe sugerują, że polimorfizm ICOSc.1554+4GT(8_15) jest zlokalizowany w miejscu wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1 i może modulować transkrypcję mRNA, jednak nie przeprowadzono badań wpływu poszczególnych alleli na aktywność transkrypcyjną i na poziom białka ICOS.

Opisano natomiast znaczenie funkcjonalne polimorfizmu ICOS ISIV+173T>C zlokalizowanego w pobliżu genu *CTLA-4*, którego obecność moduluje ekspresję mRNA dla

izoformy rozpuszczalnej i pełnej białka CTLA-4, oraz trzech polimorfizmów zlokalizowanych w 3' nietranslacyjnym rejonie genu *ICOS* w pozycjach ICOSc.602A>C, ICOSc.1624C>T i ICOSc.2373G>C. Wykazano, że współwystępowanie homozygot ICOSc.602A>C[AA]/ICOSc.1624C>T[CC]/ ICOSc.2373G>C[GG] wiąże się z niższym odsetkiem aktywowanych komórek CD3+ wykazujących ekspresję cząsteczki ICOS, ze większym wydzielaniem IL-10 i w konsekwencji z obniżoną odpowiedzią immunologiczną zależną od limfocytów T oraz nieprawidłowym dojrzewaniem limfocytów B.

Biorąc pod uwagę funkcjonalne znaczenie opisanych powyżej polimorfizmów i fakt, że wykazaliśmy związek polimorfizmu mikrosatelitarnego ICOSc.1554+4GT(8_15) z podatnością na zachorowanie na B-PBL, podjęliśmy dalsze badania mające na celu analizę związku miejsc polimorficznych ICOSc.602A>C, ICOSc.1624C>T, ICOSc.2373G>C oraz ICOS ISIV+173T>C z ryzykiem zachorowania i przebiegiem przewlekłej białaczki limfocytowej. Stwierdziliśmy, że co prawda te polimorfizmy nie są związane z podatnością na zachorowanie na B-PBL, jednak wpływają na dynamikę przebiegu choroby. W czasie 60 miesięcznej obserwacji u chorych posiadających genotyp ICOSISIV+173T>C[CC]/ICOSc.602A>C[AA]/ ICOSc.1624C>T[CC]/ICOSc.2373G>C[GG] progresja choroby, wyrażona przejściem do wyższego stadium zaawansowania klinicznego w/g Rai, występowała znamienne rzadziej niż u pozostałych chorych. Zaskakującym i trudnym do wytłumaczenia było stwierdzenie, że genotyp związany z obniżoną odpowiedzią immunologiczną zależną od limfocytów T oraz nieprawidłowym dojrzewaniem limfocytów B był obserwowany częściej u pacjentów, u których występuje wolniejsza progresja choroby. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Reasumując, wykazaliśmy po raz pierwszy związek polimorfizmów: CTLA-4g.-319C>T, CD28.c.17+3T>C i ICOSc.1554+4GT(8_15) z ryzykiem zachorowania na przewlekłą białaczkę limfocytową B - komórkową oraz wpływ polimorfizmów CTLA-4g.-319C>T,

CD28.c.17+3T>C i polimorfizmów w genie ICOS ISIV+173T>C, c.602A>C, c.1624C>T, c.2373G>C na dynamikę przebiegu choroby.

Wyniki naszych badań zostały opublikowane w *Human Immunol.* (pozycja **4.1** w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, **IF 3.061**) oraz *Folia Histochem Cytobiol.* (pozycja **4.5** w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, **IF 1.08**).

Kolejnym schorzeniem nowotworowym układu krwiotwórczego, w którym badaliśmy związek polimorfizmów genu *CTLA-4* z ryzykiem zachorowania był szpiczak mnogi. W momencie rozpoczęcia badań w literaturze pojawiła się tylko jedna praca, w której badano związek polimorfizmu mikrosatelitarnego CTLA-4g.*642AT(8-33) z ryzykiem zachorowania na tą chorobę. Co ciekawe wskazywano, że podobnie jak w chorobach autoimmunologicznych allel najkrótszy (8 powtórzeń AT), charakteryzujący się największą stabilnością mRNA i największą ekspresją supresorowej cząsteczki CTLA-4 zmniejsza ryzyko zachorowania na szpiczaka mnogiego. W naszej pracy opublikowanej w *Patology and Oncology Research* (pozycja **4.7** w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe, **IF 1.48**), badaliśmy pięć miejsc polimorficznych w genie *CTLA-4*. Nie wykazaliśmy wpływu polimorfizmu promotorowego CTLA-4g.-319C>T, który był czynnikiem ryzyka dla B-PBL. Natomiast wykazaliśmy, że obecność allelu G w trzech miejscach polimorficznych CTLA-4c.49A>G, CT60A>G i Jo31G>T zwiększa ryzyko zachorowania na to schorzenie. Jest to interesujące zjawisko, ponieważ obecność alleli G w tych miejscach polimorficznych jest opisywana w literaturze jako czynnik predestynujący do chorób autoimmunologicznych. Chociaż nie potwierdziliśmy doniesienia dotyczącego znaczenia polimorfizmu CTLA-4g.*642AT(8-33) jako czynnika ryzyka rozwoju szpiczaka mnogiego, jednak podobnie jak w przypadku tego opisanego w literaturze polimorfizmu, allele związane z niższą ekspresją supresorowej cząsteczki CTLA-4 w naszym badaniu okazały się czynnikiem ryzyka zachorowania na szpiczaka mnogiego.

Jest to pierwsze w literaturze doniesienie dotyczące związku miejsc polimorficznych CTLA-4c.49A>G, CT60A>G i Jo31G>T z podatnością na zachorowanie na szpiczaka mnogiego.

W kolejnej pracy z tego tematu opublikowanej w *Adv. Clin. Exp. Med.* nie wykazaliśmy związku polimorfizmu CD28.c.17+3T>C z ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego (pozycja **4.4** w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe).

Następnym zagadnieniem była ocena wpływu polimorfizmów w genach kodujących cząsteczki kosygnałowe CTLA-4, CD28 i ICOS na ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy.

Podobnie jak w przypadku B-PBL obecność allelu T w miejscu polimorficznym CTLA-4g.319C>T, odpowiadającego za wyższą ekspresję białka CTLA-4 i zwiększone hamowanie aktywacji limfocytów T, była czynnikiem ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy. Co więcej obecność allelu T korelowała również ze stopniem zróżnicowania raka szyjki macicy. Wśród pacjentek z dobrze zróżnicowanym rakiem (G1) i średnio zróżnicowanym rakiem, obserwowano znamienne częściej osoby z genotypem CT i TT niż wśród pacjentek ze słabo zróżnicowanym rakiem (G3) i wśród zdrowych kobiet.

Drugim miejscem polimorficznym związanym z ryzykiem zachorowania na raka szyjki macicy okazał się polimorfizm mikrosatelitarny CTLA-4g.*642AT(8-33). Obecność alleli krótkich (8 powtórzeń AT) opisywanych w literaturze jako allele związane z większą stabilnością mRNA i większą ekspresją supresorowej cząsteczki CTLA-4, zwiększała ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy prawie dwukrotnie.

Co prawda, nie stwierdziliśmy w całej badanej przez nas grupie pacjentek z rakiem szyjki macicy związku polimorfizmu CD28.c.17+3T>C z ryzykiem zachorowania na to schorzenie, jednak analiza tego związku w zależności od stopnia histopatologicznego guza wykazała, że allel C (genotyp CC+CT) występuje znamienne częściej u chorych z dobrze zróżnicowanym rakiem niż u kobiet zdrowych.

Nasze badania potwierdzają wcześniejsze doniesienia grupy Tajwańskiej wskazujące, że obecność allelu T w miejscu polimorficznym CTLA-4g.319C>T jest czynnikiem ryzyka rozwoju tego nowotworu. Wykazaliśmy po raz pierwszy, że polimorfizm mikrosatelitarny CTLA-4g.*642AT(8-33) moduluje ryzyko zachorowania na to schorzenie. Również po raz pierwszy skorelowaliśmy obecność wariantów genetycznych CTLA-4g.319C>T i CD28.c.17+3T>C ze stopniem zróżnicowania raka.

Przetrwiała infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego jest podstawowym czynnikiem etiologicznym rozwoju raka szyjki macicy. Jednak postuluje się, że dodatkowe czynniki mogą również wpływać na ryzyko zachorowania na ten nowotwór. Wyniki naszych badań wskazują, że obecność poszczególnych wariantów genetycznych genów *CTLA-4* i *CD28* może być brana pod uwagę jako dodatkowy czynnik sprawczy rozwoju tego nowotworu.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Human Immunol.* (pozycja **4.3** w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe **IF 2.872**)

Kolejny nasz projekt dotyczył badania związku polimorfizmów w genach kodujących cząsteczki kosygnałowe z podatnością na zachorowanie na niedrobnokomórkowego raka płuc. W momencie podjęcia przez nas tego tematu nie było w literaturze doniesień dotyczących tego zagadnienia. Stosunkowo niedawno (w 2008 roku) ukazało się pierwsze doniesienie wskazujące na związek allelu A w miejscu polimorficznym CTLA-4c.49A>G ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka płuc w populacji chińskiej.

W badanej przez nas grupie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc zaobserwowaliśmy również tendencję do częstszego występowania posiadaczy allelu CTLA-4c.49A>G[A] w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast znamienne statystycznie częstsze występowanie tego allelu odnotowaliśmy wśród kobiet chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc w porównaniu do kobiet zdrowych. Również przeprowadzając analizę w grupie kobiet stwierdziliśmy, że obecność allelu CTLA-4g.319C>T[T] predestynuje do zachorowania na

niedrobnokomórkowego raka płuc, oraz jest związana z krótszym całkowitym czasem przeżycia.

Pokazaliśmy po raz pierwszy w populacji kaukazoidalnej, że allele CTLA-4g.319C>T[T] i CTLA-4c.49A>G[A] związane z wyższą ekspresją cząsteczki CTLA-4 są czynnikiem ryzyka zachorowania na niedrobnokomórkowego raka płuc u kobiet w populacji polskiej. Powyższe badania zostały opublikowane w *Human Immunol.* (pozycja **4.7** w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe, **IF 2.872**)

PODSUMOWANIE

1. Wykazaliśmy po raz pierwszy związek polimorfizmu Jo31G>T z ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane i potwierdziliśmy doniesienia wskazujące rolę allelu G w miejscu CT60A>G jako czynnika zwiększającego ryzyko zachorowania na to schorzenie. Wykazanie wpływu polimorfizmów na poziom ekspresji zarówno powierzchniowego jak i wewnątrzkomórkowego białka CTLA-4 w limfocytach CD4+ chorych na stwardnienie rozsiane z różnymi postaciami tej choroby było całkowicie oryginalnym, nie publikowanym dotychczas zagadnieniem.
2. Wykazaliśmy również po raz pierwszy związek polimorfizmów: CTLA-4g.-319C>T, CD28.c.17+3T>C i ICOSc.1554+4GT(8_15) z ryzykiem zachorowania na przewlekłą białaczkę limfocytową B- komórkową oraz wpływ polimorfizmów: g.319C>T w genie *CTLA-4*, CD28.c.17+3T>C w genie *CD28* i ISIV+173T>C, c.602A>C, c.1624C>T, c.2373G>C w genie *ICOS* na dynamikę przebiegu choroby.
3. Całkowicie oryginalnym było stwierdzenie, że allele predestynujące do chorób autoimmunologicznych CTLA-4c.49A>G[G], CT60A>G[G] i Jo31G>T[G] są czynnikiem ryzyka zachorowania na szpiczaka mnogiego.
4. Potwierdziliśmy znaczenie allelu T w polimorfizmie CTLA-4g.-319C>T jako czynnika ryzyka zachorowania na raka szyjki macicy. Przeprowadziliśmy analizę związku miejsc polimorficznych w genach kodujących cząsteczki CD28 i CTLA-4 i z histologicznym stopniem zróżnicowania guza i stwierdziliśmy związek miejsc polimorficznych CTLA-4g.-319C>T, CD28.c.17+3T>C z wystąpieniem guza o wysokim stopniu zróżnicowania.
5. W przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc wskazaliśmy tendencję do częstszego występowania allelu CTLA-4c.49A>G[A], co częściowo potwierdza wyniki opisane w populacji chińskiej, jednak wykazaliśmy, że w grupie kobiet chorych na to schorzenie

zarówno allel CTLA-4c.49A>G[A] jak i allel CTLA-4g.319C>T[T] zwiększają ryzyko zachorowania na niedrobnokomórkowego raka płuc.

W 2011 roku ukazała się meta-analiza obejmująca wyniki 48 badań związku polimorfizmów CTLA-4c.49A>G, CTLA-4g.319C>T i CT60A>G z ryzykiem zachorowania na choroby nowotworowe, opisane w 27 artykułach (Zhang et al. 2011). Do tej meta-analizy włączono wszystkie dostępne w literaturze badania opublikowane do września 2010 roku, w tym dwie prace z naszego laboratorium: dotyczącą przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej i raka szyjki macicy. Pozostałe nasze prace ukazały się po wrześniu 2010 roku.

Meta-analiza wykazała związek polimorfizmu CTLA-4c.49A>G z ryzykiem rozwoju nowotworu, szczególnie w populacjach Azjatyckich, oraz związek polimorfizmu CTLA-4g.319C>T z podatnością na zachorowanie na nowotwory w populacjach Europejskich. Nie potwierdzono znaczenia allelu A w miejscu polimorficznym CT60A>G jako czynnika ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej.

Konkluzja meta - analizy jest zgodna z wynikami naszych badań.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo- badawczych

5. 1. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora:

Moje zainteresowania naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora koncentrowały się wokół następujących tematów:

5.1.1. Ocena wartości klinicznej oznaczania poziomu cytokin prozapalnych u:

- a) chorych poddanych alogenicznemu przeszczepieniu komórek hematopoetycznych.
- b) chorych na raka jajnika

5.1.2. Ocena związku polimorfizmów genów kodujących cytokiny w kontekście wystąpienia powikłań okołoprzeszczepowych: toksyczności wywołanej kondycjonowaniem przeszczepienia, ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi.

5.1.3. Optymalizacja doboru pary biorca-dawca alogenicznego przeszczepu komórek hematopoetycznych, standaryzacja procedur doboru.

Ad. 5.1.1. a) Ocena wartości klinicznej oznaczania aktywności cytokin prozapalnych u chorych poddanych alogenicznemu przeszczepieniu komórek hematopoetycznych

Przeszczepienie komórek hematopoetycznych jest metodą z wyboru leczenia chorób rozrostowych krwi, pierwotnych niedoborów odporności oraz niewydolności szpiku.

Głównymi powikłaniami występującymi po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych są: uszkodzenie narządów związane z toksycznością wywołaną kondycjonowaniem, ostra (aGvHD) i przewlekła (cGvHD) choroba przeszczep przeciw gospodarzowi, infekcje bakteryjne, wirusowe i grzybicze oraz wznowa choroby podstawowej. We wszystkich tych powikłaniach kluczową rolę odgrywają cytokiny.

Tematem moich prac było badanie kinetyki zmian poziomu aktywności biologicznej (*bioassay*) lub stężenia (ELISA) cytokin oraz białka C reaktywnego (CRP) w różnym czasie po przeszczepieniu oraz zależność pomiędzy ich stężeniem a wystąpieniem powikłań okołoprzeszczepowych ze szczególnym uwzględnieniem wystąpienia i ciężkości powikłań toksycznych, ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi. Stwierdziłam obecność wyższych poziomów aktywności IL-6 oraz białka C-reaktywnego w surowicach w okresie aplazji i hematologicznej odnowy u biorców alogenicznego przeszczepu komórek hematopoetycznych. Wyższe poziomy aktywności tej cytokiny zaobserwowałam również u pacjentów, którzy zmarli z powodu ciężkich uszkodzeń toksycznych spowodowanych kondycjonowaniem. Ponadto istotnie wyższe poziomy aktywności IL-6 notowałam u pacjentów, u których wystąpiły objawy jelitowej, nie poddającej się leczeniu, postaci aGvHD, w czasie pełnego rozwoju choroby (5-7 tygodnia po przeszczepieniu). Dodatkowo, stwierdziłam znacząco statystycznie wyższe poziomy aktywności IL-6 w okresie jednego do dwóch tygodni poprzedzających zgon pacjenta. Ważnym i nowatorskim elementem wykonywanych badań było zastosowanie techniki *bioassay* - co pozwalało na ocenę poziomu aktywności czynnej biologicznie IL-6.

Ponadto, badałam poziom aktywności biologicznej TNF- α i stężenie IFN- γ w surowicach pacjentów po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych. Wykazałam, że poziom aktywności TNF- α i stężenie IFN- γ koreluje z ciężkością aGvHD. Małe stężenie IFN- γ w surowicy oraz niski odsetek komórek CD4⁺ mogą być czynnikiem prognostycznym skórnej manifestacji aGvHD, natomiast wysoki poziom aktywności TNF- α koreluje z wystąpieniem aGvHD.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 3 pracach: **Ann. NY Acad Sci.**, 1995, 762, 439-432. **IF-0.868**, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1995, 43, 99-105, *Transplantation Proceedings*, 1996, 28(6), 3522-3525 **IF-0.850** (Załącznik 3- Wykaz Prac Naukowych (WPN)- 1,3,4) oraz

były prezentowane na konferencjach międzynarodowych i krajowych (Wykaz Doniesień Zjazdowych (WDZ)- 2, 3, 7, 9, 12, 13, 14, 19)

Ad. 5.1.1. b) Ocena wartości klinicznej oznaczania poziomu aktywności cytokin

prozapalnych u chorych na raka jajnika.

W kręgu moich zainteresowań badawczych znalazła się również analiza aktywności cytokin prozapalnych IL-6 i TNF- α w płynach otrzewnowych pacjentek z rakiem jajnika. Dane literaturowe wskazywały, że IL-6 jest czynnikiem wzrostowym dla niektórych chłoniaków oraz, że jest wydzielana przez niektóre guzy łe, między innymi przez komórki raka jajnika. Jednakże, nieznana była rola produkowanej lokalnie IL-6 w procesach immunologicznych zachodzących w guzie. Celem projektu było zbadanie wpływu IL-6 na rozwój i progresję choroby.

Zaobserwowaliśmy, że poziom aktywności IL-6 zależy od typu histologicznego raka jajnika. Wyższe aktywności IL-6 występowały u chorych z rozpoznaniem torbielakoraków surowiczych i śluzowego raka jajnika niż u chorych z rakiem endometrialnym i nieróznicowanym rakiem jajnika. Aktywność IL-6 w guzie była skorelowana z poziomem białka C- reaktywnego w surowicach pacjentek z rakiem jajnika. Profil limfocytów w płynach otrzewnowych różnił się od profilu w krwi obwodowej, w szczególności obserwowano niższy odsetek komórek NK i CD8+, natomiast wyższy odsetek komórek B, CD45RO+, CD14+ i HLA-DR+. Odsetek komórek CD45RO+ we krwi obwodowej korelował z poziomem aktywności IL-6 w płynach otrzewnowych. Ponadto, obserwowano zależność między niską akumulacją P53 w komórkach guza a wysokim poziomem aktywności IL-6 w płynach otrzewnowych. Stwierdzono również, że zdolność do autokrynnej produkcji IL-6 przez komórki raka jajnika oraz poziom aktywności TNF- α w środowisku guza różnicują nowotwory jajnika pod względem wrażliwości na chemioterapię. U pacjentek, które odpowiadały na leczenie poziom aktywności IL-6 obniżał się, natomiast poziom aktywności TNF- α wzrastał.

Natomiast u pacjentek, które nie odpowiedziały na chemioterapię nie obserwowano zmian poziomów aktywności IL-6, TNF- α i stężenia CRP.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Brit. J. Cancer*, 2000, vol. 82(3), 621-628 (WPN-6, IF 3.489), i były prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych (prezentacja ustna - WDZ: 5, 11-, prezentacje plakatowe- WDZ -6, 10, 17, 18, 21).

Ad. 5.1.2. Ocena związku polimorfizmów genów kodujących cytokiny w kontekście wystąpienia powikłań okołoprzeszczepowych: toksyczności wywołanej kondycjonowaniem, ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi.

Kontynuując badania związku poziomu aktywności wydzielanych cytokin z wystąpieniem powikłań okołoprzeszczepowych, zajęłam się badaniem miejsc polimorficznych w genach kodujących cytokiny. To zagadnienie stało się tematem mojej dysertacji. Ponieważ poziom aktywności wydzielanych cytokin zależy od transkrypcji/translacji genów, polimorfizmy występujące w tych genach determinują osobniczą zdolność do wysokiej lub niskiej produkcji cytokiny i, co jest z tym związane, predestynują do wystąpienia określonych powikłań.

Głównym obiektem moich zainteresowań były funkcjonalne miejsca polimorficzne w promotorach genów: *IL-6* w pozycji -174C>G i *IL-10* w pozycjach -1082G>A, -819C>T, -592C>A oraz ich związek z wystąpieniem powikłań po alogenicznym przeszczepieniu komórek hematopoetycznych. Dane literaturowe wskazywały, że obecność allelu [G] w miejscu polimorficznym IL-6-174C>G związana jest z większą aktywnością promotora i wynikającą z niej wysoką produkcją IL-6. Analogicznie, obecność allelu [G] w miejscu polimorficznym

-1082G>A genu *IL-10* związana jest z wysoką produkcją białka.

Zaobserwowałam, że genotyp IL-6-174C>G[CC] biorcy jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia powikłań toksycznych, co jest najlepiej widoczne w grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu Bu+Cy±ATG. Natomiast genotyp IL-10 [ACC]/[ACC] biorcy jest związany ze zmniejszoną podatnością na wystąpienie powikłań toksycznych 3 i 4 stopnia.

Wykazałam również, że zarówno posiadanie allelu IL-10-1082G>A[G+] biorcy jak i genotyp IL-6-174C>G [GG] dawcy („wysocy producenci” obu cytokin) jest związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia aGvHD>2 w grupie pacjentów „przeszczepionych” od dawcy rodzinnego, natomiast przeszczepienie komórek hematopoetycznych od dawcy rodzinnego posiadającego allele IL-10[ACC+] zmniejsza ryzyko wystąpienia aGvHD stopnia większego niż drugi. U biorców posiadających allel IL-6-174A>G[G+] „przeszczepionych” od dawców o genotypie IL-6-174A>G[GG] obserwowałam znamienne statystycznie częściej aGvHD>1 niż u innych kombinacji par biorca-dawca. Stwierdziłam także, istotny wpływ polimorfizmów genów kodujących IL-6 i IL-10 dawcy i biorcy na wystąpienie przewlekłej postaci GvHD (cGvH). Równoczesne posiadanie przez biorcę genotypu IL-6-174C>G[GG] i allelu IL-10[ACC+] zwiększa ryzyko wystąpienia cGvHD, natomiast genotyp IL-6-174C>G[GG] dawcy zmniejsza ryzyko tego powikłania.

Przeprowadziłam analizę wpływu poszczególnych wariantów genetycznych IL-6-174C>G na poziom aktywności wydzielanego białka. Wykazałam, że zakres stwierdzanych poziomów aktywności IL-6 we krwi w kolejnych okresach poprzyszczepowych, związany jest z genotypem części promotorowej genu kodującego IL-6. Genotyp IL-6-174C>G modyfikuje poziom aktywności IL-6 w krwi obwodowej w zakresach odpowiednich do obserwowanych w okresie aplazji, hematologicznej odnowy i pełnej manifestacji aGvHD. Wynika z tego, że wpływ genotypu IL-6-174C>G mieści się w zakresie wyindukowanego procesem

chorobowym poziomie wydzielania IL-6, tzn. jeżeli przy odnowie hematologicznej obserwujemy niewielkie podwyższenie poziomów aktywności IL-6 to jest ono niewielkie u wszystkich pacjentów, ale u pacjentów z genotypem IL-6-174C>G[GG] („wysokich producentów”) poziom aktywności mieści się w górnych zakresach obserwowanych wartości. Gdy u pacjentów, u których wystąpiły objawy aGvHD>2 w okresie pełnego rozwoju choroby obserwowaliśmy wysokie poziomy aktywności IL-6, to najwyższe z obserwowanych poziomów IL-6 prezentowali pacjenci o genotypie IL-6-174C>G[GG]. Było to pierwsze w literaturze doniesienie, w którym polimorfizm genu IL-6 skorelowano nie tylko z ryzykiem wystąpienia powikłań, ale też z poziomem aktywności biologicznej cytokiny w odniesieniu do kinetyki odnowy hematologicznej i występujących powikłań.

Ponadto zajmowałam się badaniem polimorfizmu IFN- γ +874A>T (to miejsce polimorficzne jest w pełnym niezrównoważeniu sprzężeń z polimorfizmem mikrosatelitarnym – powtórzeniami CA) i zależnością poszczególnych wariantów genetycznych z wystąpieniem powikłań okołoprzeszczepowych. Stwierdziłam związek tego miejsca polimorficznego z wystąpieniem ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi. Obecność allelu [A] („niski producenci cytokiny”) była związana ze zwiększonym ryzykiem ciężkiej postaci aGvHD.

Rozważając oddziaływania gen-gen zaobserwowałam, że u biorców przeszczepu komórek hematopoetycznych posiadających kombinację alleli niekorzystnych w odniesieniu do wystąpienia aGvHD: IL-6-174G>C[G+], IFN- γ +874A>T[A+], IL-10-1082G>A[G+] ostra choroba przeszczep przeciw gospodarzowi stopnia II-IV występuje znamienne częściej niż u innych pacjentów.

Podsumowując, genetyczne predyspozycje do wyższego wydzielania IL-6 i IL-10 oraz niższego wydzielania IFN- γ są związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby przeszczep przeciw gospodarzowi.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2 pracach oryginalnych: ***Bone Marrow Transplantation* 2004 Aug;34(4):339-44, IF 2.101** (WPN – 9), ***Human Immunol.* 2005. 66/6 pp. 700-709, IF 2.467** (WPN – 11) i były prezentowane na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych zarówno w formie ustnej (WDZ – 29, 31, 32, 39, 47, 49) oraz plakatowej (WDZ - 22, 24, 34, 42, 45, 46, 53, 54, 55).

Ad.5.1.3. Optymalizacja doboru pary biorca-dawca alogenicznego przeszczepu komórek hematopoetycznych, standaryzacja procedur doboru

Właściwy dobór pary biorca-dawca w zakresie antygenów zgodności tkankowej (HLA) decyduje o sukcesie przeszczepienia komórek hematopoetycznych. Dlatego optymalizacja i standaryzacja procedur doboru stanowi niezwykle istotny problem. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej, w miejsce serologicznego oznaczania antygenów zgodności tkankowej, wprowadzono metody genetyczne o coraz wyższym poziomie rozdzielczości. Ponadto rozwój technik transplantacji, a w szczególności wprowadzenie procedury przeszczepienia od dawcy niespokrewnionego spowodowało konieczność: a) genetycznego typowania antygenów zgodności tkankowej HLA na wysokim stopniu rozdzielczości b) współpracy międzynarodowej przy poszukiwaniu dawcy niespokrewnionego (Międzynarodowe Rejestry Dawców – skupione w Bone Marrow Donor Worldwide) c) standaryzacji procesu doboru i d) wprowadzenia akredytacji laboratoriów HLA przez Europejską Federację Immunogenetyki.

W ramach mojej pracy w Laboratorium Krajowego Banku Dawców Szpiku wprowadziłam badania funkcjonalne mieszanej hodowli limfocytów (MLC) i badanie prekursorów limfocytów cytotoksycznych (CTLP), szczególnie przy doborze dawcy niespokrewnionego czy haploidentycznego. Wprowadziłam również do rutynowej praktyki laboratoryjnej typowanie antygenów HLA klasy I metodą sekwencjonowania, co było w Polsce metodą nowatorską.

Kierowane wówczas przeze mnie Laboratorium jako pierwsze w Polsce uzyskało akredytację Europejskiej Federacji Immunogenetyki i aktywnie uczestniczyło w procesie tworzenia standardów i akredytacji działalności laboratoriów HLA w naszym kraju.

Wyniki analiz wpływu poziomu doboru pary biorca-dawca na wynik przeszczepienia komórek hematopoetycznych, stało się tematem dwóch publikacji w *Bone Marrow Transpl.*, 1998, vol. 22, suppl. 4, S57-5, **IF-2.11** (WPN- 6), *Transplantation Proceedings*, 2002, 34(2), 668-670, **IF-0.478** (WPN- 8), oraz kilkunastu doniesień zjazdowych: ustnych- WDZ: 36, 37 oraz plakatowych- WDZ: 1, 25, 26, 27, 28, 30, 33, 35, 38, 40, 41, 43, 44, 48, 50, 51, 54, 56.

5. 2. Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora:

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam na roczny staż naukowy na Oddziale Hematologii i Onkologii, Szkoły Medycznej Uniwersytetu Pensylwania (Department of Hematology & Oncology, University of Pennsylvania School of Medicine w Filadelfii, USA), gdzie pracowałam w zespole Prof. Alana Gewirtza.

Zajmowałam się badaniem efektywności wyciszania genu przy pomocy antysensownych oligonukleotydów posiadających zmodyfikowane cząsteczki cukrowe. Moim zadaniem było zbadanie in vivo antysensownego oligonukleotydu zawierającego modyfikację 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinozy (2'F-ANA). Genem, który podlegał wyciszeniu był protoonkogen c-Myb w komórkach linii białaczkowych. Wykazaliśmy, że antysensowne oligonukleotydy, posiadające poza zmienionymi wiązaniami fosfodiesterowymi na fosfosiarkowe (PS-DNA), dodatkową modyfikację (2'F-ANA) w łańcuchu cukrowym PS-2'F-ANA-DNA, efektywniej i trwalej wyciszają zarówno ekspresję mRNA jak i białka cMyb w komórkach linii białaczkowych niż oligonukleotydy antysensowne PS-DNA. Efekt wyciszenia genu przez 2'F-ANA-DNA został uzyskany przy pięciokrotnie niższej dawce niż PS-DNA i utrzymywał się 2 razy dłużej. Efekt ten był niezależny od linii komórkowej, na

jakiej przeprowadzano badania. Również wewnątrzkomórkowe stężenie oligonukleotydów z modyfikacją 2'F-ANA było większe i utrzymywało się dłużej niż oligonukleotydów bez modyfikacji.

Wyniki tej pracy zostały opublikowane w *Nucleic Acid Research* 2006 Vol. 34, 451-46, **IF 6.317** (WPN-11) oraz były prezentowane na konferencji ASH w 2005 roku w formie plakatu (WDZ-57).

Równolegle pracowałam w zespole prof. Kyuon Yoon w Departamencie Dermatologii w Koledżu Medycznym im. Jeffersona w Filadelfii (Department of Dermatology, Jefferson Medical College, Philadelphia, USA) nad metodami wprowadzania oligonukleotydów do komórek macierzystych myszy. Dalekosiężnym celem tego projektu było opracowanie metody leczenia chorób genetycznych wywołanych mutacją punktową przez wprowadzenie i wbudowanie prawidłowego fragmentu genu do jądra komórki macierzystej, przy wykorzystaniu mechanizmu rekombinacji homologicznej. Zastosowałam z sukcesem metodę nukleofekcji do wprowadzania prawidłowych oligonukleotydów do jądra komórki macierzystej, jednak nie powiodło się wbudowanie prawidłowego oligonukleotydu z wykorzystaniem mechanizmu rekombinacji homologicznej.

Po powrocie z zagranicy w styczniu 2006 roku rozpoczęłam pracę w Zespole Pani Prof. Ireny Frydeckiej w Laboratorium Immunopatologii w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Dzięki szerokiej współpracy Laboratorium z licznymi ośrodkami medycznymi w kraju brałam udział w realizacji szeregu tematów badawczych. Nadal jednak w kręgu moich głównych zainteresowań znalazło się badanie wpływu występowania polimorfizmów genów kodujących cząsteczki regulujące odpowiedź immunologiczną na podatność na zachorowanie na choroby nowotworowe i autoimmunologiczne. W ramach tego tematu można wyróżnić dwa odrębne zagadnienia badawcze:

5.2.1. Wpływ repertuaru receptorów *KIR* oraz ich *HLA* ligandów na ryzyko zachorowania na przewlekłą białaczkę limfocytową i przebieg choroby.

5.2.2. Ocena wpływu różnych wariantów genetycznych genów *CD28*, *ICOS*, *CTLA-4* na ryzyko wystąpienia chorób nowotworowych i autoimmunologicznych (część tych badań stała się tematem cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe w/g artykułu 16.2 ustawy)

Ad. 5.2.1. Wpływ repertuaru receptorów *KIR* oraz ich *HLA* ligandów na ryzyko zachorowania na przewlekłą białaczkę limfocytową i przebieg choroby.

W ostatnich latach jedną z kluczowych ról w nadzorze immunologicznym przypisuje się odporności wrodzonej, a w szczególności naturalnym komórkom cytotoksycznym (NK - *natural killers*).

Komórki NK rozpoznają cząsteczki *HLA* klasy I, usytuowane na komórkach prezentujących antygen, za pomocą receptorów z rodziny *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*; *CD158*). Geny *KIR*, zlokalizowane na chromosomie 19, wykazują polimorfizm haplotypowy przejawiający się występowaniem różnej liczby genów kodujących hamujące lub aktywujące receptory *KIR*. Występowanie różnego repertuaru genów *KIR* u poszczególnych osób wpływa na ich osobniczą zdolność do odpowiedzi komórek NK.

Mimo udowodnionej roli komórek NK i ich receptorów *KIR* w odporności przeciwnowotworowej, niewiele było wiadomo o genetycznych predyspozycjach do zachorowania na nowotwory w kontekście genów *KIR* i genów kodujących ich ligandy *HLA*. Celem projektu, którego byłam kierownikiem, było zbadanie związku genotypu *KIR* z przewlekłą białaczką limfocytową typu B.

Wykazaliśmy mniejszą częstość występowania genów kodujących aktywujące receptory *KIR*: *KIR2DS3* i *KIR2DL5* u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową oraz mniejszą

częstość występowania genów należących do specyficzności *HLA-Bw4*. Obserwowaliśmy również u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową częstsze występowanie genotypów z przewagą genów *KIR* hamujących w stosunku do aktywujących.

Nowością naszej pracy jest również analiza wpływu genotypu *KIR* i ligandów *HLA* na przebieg choroby. Stwierdziliśmy, że obecność poszczególnych genów *KIR* zarówno hamujących jak i aktywujących nie ma wpływu na progresję choroby wyrażoną czasem przejścia do wyższego stadium zaawansowania klinicznego wg Rai, aczkolwiek u pacjentów posiadających gen *KIR3DS1*+ zauważyliśmy tendencję do wolniejszej progresji choroby w stosunku do pacjentów, u których gen *KIR3DS1* był nieobecny.

Ponadto pokazaliśmy, że obecność określonych genów kodujących *HLA* wpływa na przebieg choroby. Pacjenci posiadający geny kodujące specyficzności alleliczne *HLA-C*: *C1*+ i *C2*+ znacząco częściej przeżywają 10 letni okres bez progresji choroby niż pacjenci homozygotyczni *C1* lub *C2*. Ponadto pośród pacjentów homozygotycznych *HLA-C2* ci, którzy posiadają *KIR2DS1* znamienne statystycznie częściej niż pozostali pacjenci przeżywają 10 letni okres bez podwyższenia stanu zaawansowania klinicznego wg Rai. Obserwowaliśmy również częstsze przeżycie 10 letniego okresu bez podwyższenia stanu zaawansowania klinicznego wg Rai wśród pacjentów posiadających jednocześnie geny kodujące specyficzności alleliczne należące do *HLA-Bw4*, jak i gen kodujący aktywujący receptor *KIR3DS1*.

Nasze wyniki wskazują, że repertuar receptorów *KIR* i ich ligandów jest związany zarówno z podatnością na przewlekłą białaczkę limfocytową jak i z przebiegiem choroby.

Rezultaty tych badań zostały opublikowane w *Tissue Antigens*. 2011 Aug;78(2):129-38, **IF 3.024** (WPN - 23) oraz prezentowane w formie plakatu na konferencjach zagranicznych (WDZ - 69, 72, 77, 79, 80).

Ad. 5.2.2. Ocena wpływu różnych wariantów genetycznych genów *CD28*, *ICOS*, *CTLA-4* na ryzyko wystąpienia chorób autoimmunologicznych

Dane literaturowe wskazują, że region 2q33 obejmujący geny *CD28*, *ICOS*, *CTLA-4* jest ściśle związany z ryzykiem zachorowania na choroby autoimmunologiczne a w szczególności chorobę Gravesa-Basedowa (cGB).

Wyniki naszych badań włączone do meta-analizy obejmującej rezultaty badań z 32 ośrodków wykazały związek allelu [G] w miejscu polimorficznym CTLA-4c.49A>G i/lub CT60A>G z ryzykiem zachorowania na cGB (*Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92(8):3162-70, **IF-5.49** (WPN14).

Ponadto wykazaliśmy, że stężenie izoformy CTLA-4 pozbawionej części przezbłonowej, przez co krążącej w surowicy (rozpuszczalnej – *soluble sCTLA-4*), w surowicach chorych na cGB z objawami orbitopatii jest znacząco większe niż w surowicach osób zdrowych. Analizowaliśmy również wpływ polimorfizmów CT60A>G i Jo31G>T na stężenie sCTLA-4 w surowicach chorych na cGB. Stwierdziliśmy, że obecność allelu [G] w obu miejscach polimorficznych związana jest z większym stężeniem rozpuszczalnej izoformy CTLA-4.

Podsumowując rezultaty naszych badań potwierdzają rolę genu CTLA-4 jako locus podatności na cGB i po raz pierwszy korelują obecność allelu predystynującego do choroby ze zwiększonym stężeniem sCTLA-4 – surowiczym markerem choroby autoimmunologicznej, co zostało opublikowane w dwóch publikacjach (*Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92(8):3162-70, **IF-5.49** (WPN14) i *Eur J Endocrinol.* 2009 Nov;161(5):787-93 4, **IF-3.539**) i prezentowane w formie ustnej lub plakatowej na zjazdach naukowych (WDZ - 59, 61, 65, 74).

Lidia Karabon
Wrocław, 21.03.2012