AUTOREFERAT

dr Izabela Nowak

Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Wrocław, 20 kwiecień 2016 r.

1. Izabela Nowak

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

12.2009 Doktor Nauk Biologicznych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu; rozprawa doktorska pt.: „Ocena związków genów *KIR* i *HLA-C* z podatnością na samoistne poronienia".
promotor: prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk

06.1997 Magister Biotechnologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, praca magisterska pt.: „Białka z nasion dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*) reagujące z przeciwciałami anty-CMTI. Izolacja i ich częściowa charakterystyka".
promotor: dr Irena Lorenc-Kubis

06.1995 Licencjat Biotechnologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, kierunek: Biotechnologia, rozprawa pt.: „Wpływ cytostatyków na stopień spolimeryzowania aktyny w komórkach zwierzęcych".
promotor: prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiewicz

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

05.2010 - obecnie	adiunkt, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
01.2010 - 04.2010	asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
06.2008 - 12.2009	specjalista, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
09.1997 - 05.2008	asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda 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) **Osiągnieciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl 6 publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 4, objęty tytułem:**

ROLA POLIMORFIZMU GENÓW *KIR* I *HLA* W ROZRODZIE CZŁOWIEKA I W ODRZUCANIU PRZESZCZEPU NERKOWEGO"

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Nowak I.**, Majorczyk E., Wiśniewski A., Pawlik A., Magott-Procelewska M., Passowicz-Muszyńska E., Malejczyk J., Płoski R., Giebel S., Barcz E., Zoń-Giebel A., Malinowski A., Tchórzewski H., Chlebicki A., Łuszczek W., Kurpisz M., Gryboś M., Wilczyński J., Wiland P., Senitzer D., Sun J.Y., Jankowska R., Klinger M., Kuśnierczyk P. Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases? PLoS One. 2010, 26, 5(8): e12381

   IF[1]=4,411/MNiSW[2]=brak na liście ministerialnej/liczba cytowań[3]=24

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 35%: współpomysłodawca powstania pracy, samodzielne planowanie doświadczeń, wykonanie genotypowań KIR2DS5 i HLA-C grupy C1 i C2 dla pacjentek z poronieniami, endometriozą, pacjentów z białaczkami (ALL, AML, CML), pacjentów po transplantacji nerki (z odrzucaniem przeszczepu oraz z jego stabilnym utrzymaniem, grup kontrolnych dla pacjentek z problemami ginekologicznymi, utworzenie bazy danych KIR do analiz statystycznych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, udział w pisaniu manuskryptu oraz przygotowaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

2. **Nowak I.**, Magott-Procelewska M., Kowal A., Miazga M., Wagner M., Niepiekło-Miniewska W., Kamińska M., Wiśniewski A., Majorczyk E., Klinger M., Łuszczek W., Pawlik A., Płoski R., Barcz E., Senitzer D., Kuśnierczyk P. Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA genotypes affect the outcome of allogeneic kidney transplantation. PLoS One. 2012, 7(9): e44718.

   IF[1]=3,730/MNiSW[2]=40/liczba cytowań[3]=9

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 50%: współpomysłodawca przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, izolacja DNA, genotypowanie KIR, utworzenie bazy danych klinicznych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, znaczący udział w pisaniu manuskryptu, przygotowanie ilustracji oraz tabel, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

3. **Nowak I.**, Majorczyk E., Płoski R., Senitzer D., Sun J-Y., Kuśnierczyk P. Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman. Tissue Antigens 2011, 78(2): 115-119.

   IF[1]=2,588/MNiSW[2]=25/liczba cytowań[3]=7

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 40%: samodzielne planowanie doświadczeń, wykonanie genotypowania KIR2DL4 metodą Multiplex-PCR, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, znaczący udział w napisaniu manuskryptu, wykonanie ilustracji (Fig.1, Fig.3, Fig.4), przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

---

[1] Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania, w przypadku prac opublikowanych w 2015 i 2016 roku, podano IF dla roku 2014.
[2] Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.
[3] Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science (All Databases), stan z dnia 04.04.2016 r.

4. **Nowak I.**, Barcz E., Majorczyk E., Malinowski A., Wilczyński J.R., Banasik M., Motak-Pochrzęst H., Kuśnierczyk P. Genetic polymorphism of KIR2DL4 in the Polish population. Tissue Antigens 2015, 85(6): 450-457.

   IF[1]=2,137/MNiSW[2]=20/liczba cytowań[3]=1

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80%: autor korespondencyjny, pomysłodawca przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, rekrutacja grupy kontrolnej, izolacja DNA, wdrożenie metod do genotypowania, wykonanie genotypowań 4 polimorfizmów genu KIR2DL4 metodą HRM oraz RFLP, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu oraz wykonanie ilustracji i tabel, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

5. **Nowak I.**, Płoski R., Barcz E., Dziunycz P., Kamiński P., Kostrzewa G., Milewski Ł., Roszkowski P.I., Senitzer D., Malejczyk J., Kuśnierczyk P. KIR2DS5 in the presence of HLA-C C2 protects against endometriosis. Immunogenetics 2015, 67(4): 203-209.

   IF[1]=2,227/MNiSW[2]=25/liczba cytowań[3]=2

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80%: autor korespondencyjny, samodzielne planowanie doświadczeń, samodzielne genotypowanie 13 wariantów polimorficznych KIR i HLA-C, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu oraz wykonanie tabel, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

6. **Nowak I.**, Malinowski A., Barcz E., Wilczyński J.R., Wagner M., Majorczyk E., Motak-Pochrzęst H., Banasik M., Kuśnierczyk P. Possible role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 gene polymorphisms in spontaneous miscarriage. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2016, doi: 10.1007/s00005-016-0389-7.

   IF[1]=3,176/MNiSW[2]=25/liczba cytowań[3]=0

   Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70%: autor korespondencyjny, pomysłodawca przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, rekrutacja grupy kontrolnej, izolacja DNA, wykonanie genotypowań 4 polimorfizmów genu KIR2DL4 metodą HRM i RFLP oraz LILRB1 metodą RFLP, HLA-G (14 pz insercji/delecji w regionie 3'UTR) metodą PCR-SSP, utworzenie bazy danych klinicznych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, wykonanie ilustracji oraz tabel, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

b) **omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl sześciu prac oryginalnych. Przedstawiony cykl publikacji przygotowany został w ramach mojej pracy

realizowanej w Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

WPROWADZENIE

Już w 1953 roku Medawar porównał płód ludzki do przeszczepu semialogenicznego, który pomimo iż różni się od matki genami ojca, nie jest jednak odrzucany. Utrzymanie tolerancji immunologicznej matki wobec płodu to proces, w którym bierze udział wiele typów komórek. Komórki te wydzielają substancje, które są niezbędne w implantacji zarodka i rozwoju płodu. Zmiany, jakie zachodzą w ciele ciężarnej dotyczą wszystkich układów bowiem przebiegają zarówno w macicy, jak i ogólnoustrojowo. Zmiany te są związane również z układem immunologicznym, z odpornością swoistą, jak i nieswoistą. Warto zauważyć, że czynniki immunologiczne mają wpływ na rozwój płodu od momentu poczęcia aż do porodu.

Za brak odrzucania płodu przez organizm matki może być odpowiedzialna słaba antygenowość trofoblastu, ponieważ na powierzchni łożyska stanowiącego powierzchnię styku płodu z ustrojem matki, brak jest klasycznych antygenów transplantacyjnych: HLA-A, HLA-B oraz HLA klasy II. Ich ekspresja zostaje bowiem zahamowana na powierzchni zarodka już na etapie przedimplantacyjnym (Malinowski i Wilczyński, 2003). Na trofoblaście znajdują się jednak nieklasyczne antygeny HLA klasy I (HLA-G, HLA-E, HLA-F) (King i wsp. 2000a) i klasyczne HLA-C (King i wsp. 2000b). Uważa się, że rozpoznanie cząsteczek HLA przez receptory doczesnowych komórek NK prowadzi do wytworzenia szeregu mechanizmów warunkujących tolerancję immunologiczną matki w stosunku do zarodka i później płodu. Komórki te stanowią dużą populację w endometrium (od 70 do 90% limfocytów). Wśród receptorów, jakie komórki NK prezentują na swojej powierzchni są receptory KIR, dla których ligandami są w większości cząsteczki HLA-C, ale również HLA-G. Cząsteczki HLA-G związane z błoną komórkową (pochodzenia zarówno matczynego, jak i ojcowskiego) są prezentowane przez wszystkie subpopulacje trofoblastu pozakosmkowego. Natomiast rozpuszczalne izoformy HLA-G (HLA-G5-7) są obecne w krążeniu ciężarnej i płodu, w płynie owodniowym, a także we wszystkich podtypach trofoblastu (Menier i wsp. 2009).

Receptory KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) należą do nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych. Receptory te występują nie tylko na powierzchni komórek NK, ale również na limfocytach Tγδ, a także subpopulacjach limfocytów pamięci Tαβ (Parham 2004). Wyróżnia się receptory KIR2D i KIR3D, odpowiednio z dwiema lub trzema

domenami zewnątrzkomórkowymi. Receptory dwudomenowe i trójdomenowe występują w dwóch typach:

1. z długim fragmentem cytoplazmatycznym zawierającym motyw hamujący ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), określane jako KIR2DL i KIR3DL (L-long),
2. z krótkim fragmentem cytoplazmatycznym zawierającym dodatnio naładowaną lizynę (Lys), określane jako KIR2DS i KIR3DS (S-short).

Receptory z krótkim regionem cytoplazmatycznym wywierają efekt aktywujący na komórkę NK dzięki interakcji z cząsteczką adaptorową DAP12, która posiada sekwencję ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif). Natomiast receptory z fragmentami ITIM powodują zahamowanie aktywacji komórki NK. Wyjątkiem od tej reguły jest KIR2DL4, który posiada długi fragment cytoplazmatyczny z jednym motywem ITIM oraz dodatnio naładowaną argininę (Arg) we fragmencie przezbłonowym pozwalającą mu na tworzenie kompleksu z łańcuchem FcεRI-γ posiadającym motyw ITAM. Takie cechy strukturalne sprawiają, że receptor ten może zarówno aktywować, jak i hamować komórkę NK (Carrington, 2003). Choć gen *KIR2DL4* występuje niemalże u wszystkich ludzi i wykrywa się jego mRNA prawie we wszystkich klonach NK, to jednak jego ekspresja powierzchniowa jest ograniczona jedynie do komórek NK $CD56^{bright}$ i dlatego receptor KIR2DL4 występuje na większości doczesnowo-łożyskowych o fenotypie $CD56^{bright}$, a nie obwodowych komórek NK $CD56^{dim}$.

Zatem, w zależności od swojej budowy i interakcji z ligandami, receptory KIR mogą stymulować lub hamować komórki NK do wytwarzania pewnych cytokin i czynników wzrostowych koniecznych do prawidłowej implantacji zarodka, a w konsekwencji do utrzymania ciąży. Nie bez znaczenia pozostaje więc fakt, iż polimorfizm genetyczny wpływa na ekspresję tych receptorów oraz warunkuje powstanie odpowiedniego białka, co z kolei może przekładać się na oddziaływania receptorów i ich ligandów.

Geny *KIR* charakteryzują się ogromnym polimorfizmem. Poszczególne osoby różnią się liczbą i rodzajem (aktywujących i hamujących) genów *KIR*. Geny te kodowane są na chromosomie 19 w regionie q13.4 i występują w 2 haplotypach: A i B. Haplotyp A zawiera w większości geny dla receptorów hamujących i jedynym genem dla aktywujących receptorów jest *KIR2DS4*, który w populacji polskiej występuje w formie delecyjnej (*KIR2DS4del*) u ok. 82% osób. W haplotypie B występują geny dla receptorów aktywujących w kombinacji z genami dla receptorów hamujących. Receptory hamujące KIR wykazują większe powinowactwo do ligandu od receptorów aktywujących. **Tabela 1.** zawiera listę genów *KIR* i

ich ligandów. Szczegółowe informacje dotyczące receptorów i genów *KIR* znajdują się na stronie: http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html oraz www.allelefrequencies.net.

Tabela 1. Geny *KIR* i ich ligandy (Guethlein i wsp. 2015)

KIR	**Ligandy HLA klasy I**
2DL1	C2: C*02, C*04, C*05, C*06
2DL2	C1: C*01, C*03, C*07, C*08 niektóre C2: C*0501, C*0202, C*0401 niektóre B: B*4601, B*7301
2DL3	C1: C*01, C*03, C*07, C*08 niektóre C2: C*0501, C*0202 niektóre B: B*4601, B*7301
2DL4	G
2DL5A i 2DL5B	nieznany
2DS1	C2: C*02, C*04, C*05, C*06
2DS2	nieznany
2DS3	nieznany
2DS4	niektóre A: A*1102, niektóre C: C*0501, C*1601, C*0202
2DS5	nieznany
3DL1	niektóre A i B ekspresjonujące epitop Bw4 HLA-B*08, B*27, B*57, B*58 HLA-A: A*24, A*23, A*32
3DS1	nieznany
3DL2	niektóre A: A*03, A*11
3DL3	nieznany
3DP1	-
2DP1	-

Skoro polimorfizm genetyczny *KIR* wpływa na reaktywność komórek NK, może mieć wpływ również na podatność ludzi na różne choroby. W moim kręgu zainteresowań są mechanizmy immunologiczne, które mogą mieć wpływ na powodzenie rozrodu człowieka, a w szczególności związek genów *KIR* i *HLA* z poronieniami samoistnymi, endometriozą oraz nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zabiegu IVF-ET (In Vitro Fertilization-Embryo Transfer). Badanie roli KIR i HLA w rozrodzie człowieka jest uzasadnione, ponieważ zaburzenia rozrodu człowieka stanowią ważny problem społeczny. Obecnie kobiety decydują się na urodzenie dziecka znacznie później niż wynika to z biologicznego przygotowania ich ciała do rozmnażania. Niestety z wiekiem zmniejsza się ich zdolność do poczęcia i utrzymania ciąży, więc w coraz większej liczbie przypadków nie są

zdolne do zajścia w ciążę w sposób naturalny i wymagają technik wspomaganego rozrodu.

Jednak najczęstszymi powikłaniami ciąży u ludzi są poronienia samoistne, bowiem stanowią do 20% rozpoznanych ciąż (Lash i wsp., 2008). Dla większości kobiet poronienie jest zdarzeniem epizodycznym, u niektórych jednak się powtarza. Przyczyny poronień mogą być liczne: anatomiczne, genetyczne, hormonalne, metaboliczne, immunologiczne oraz środowiskowe (urazy i infekcje). Immunologiczne przyczyny poronień są rozpatrywane w aspektach auto- i aloimmunologicznych. Najwięcej jednak kontrowersji, zarówno pod względem rozpoznania, jak i leczenia budzą poronienia idiopatyczne (o niewyjaśnionej etiologii), gdzie patomechanizm choroby upatruje się właśnie w zaburzeniach o charakterze aloimmunologicznym ciężarnej wobec aloantygenów płodowych (Diejomaoh, 2015, PrabhuDas i wsp., 2015). Zaburzenia te występują w większości przypadków. W pracy doktorskiej udało mi się wykazać, iż nie tylko poszczególne genotypy *KIR*, ale również szczególne kombinacje genów *KIR* kobiety oraz *HLA-C* kobiety i jej partnera mogą mieć wpływ na utrzymanie ciąży (zał.3, konf. X.1.18, Nowak i wsp. 2009, Nowak i wsp. 2011). Kobieta o genotypie AA *KIR*, która zachodzi w ciążę z partnerem o genotypie *HLA-C* z grupy C2 ma szansę donosić ciążę pod warunkiem, że sama pod względem *HLA-C* jest heterozygotą (posiada zarówno allel z grupy C1, jak i C2). Wyniki badań mogą się stać pomocne w diagnostyce poronień samoistnych i prognozowaniu wyników terapii. Do tej pory nie udało się bowiem stworzyć testu diagnostycznego, który by w jednoznaczny sposób pozwalał na rozpoznanie poronień o podłożu aloimmunologicznym (istnieją tylko testy pośrednie: badanie odsetka komórek NK we krwi obwodowej, badanie poziomu cytokin Th1 i Th2, badanie obecności aloprzeciwciał), a pacjentki nadal narażone są na wykonanie panelu kosztownych badań wykluczających znane przyczyny poronienia.

Kolejnym krokiem badań było zainteresowanie rolą polimorfizmu genu *KIR2DL4* oraz jego ligandu – *HLA-G*. Polimorfizm 9A/10A genu *KIR2DL4* dotyczy występowania 9 lub 10 następujących po sobie adenin w sekwencji nukleotydowej eksonu 7, który wpływa na ekspresję receptora błonowego KIR2DL4 w doczesnowych komórkach NK. Osoby o genotypie zawierającym przynajmniej jeden allel 10A mają cząsteczki KIR2DL4 na powierzchni doczesnowych komórek NK $CD56^{bright}$, a osoby homozygotyczne pod względem tego allelu wykazują większą ekspresję tego receptora w porównaniu do osób heterozygotycznych (Goodridge, 2009). Dlatego interakcja KIR2DL4 doczesnowych komórek NK z cząsteczkami HLA-G na komórkach trofoblastu może mieć istotny wpływ na procesy zachodzące na granicy styku matczyno-płodowego we wczesnej ciąży i może zależeć od genotypu *KIR2DL4*. Wobec

tego zasadnym było zbadanie tego polimorfizmu w populacji polskich płodnych par, a także w grupie par z poronieniami samoistnymi.

Endometrioza jest kolejną chorobą ginekologiczną wpływającą na płodność kobiety, w której geny *KIR* i *HLA* mogą mieć znaczenie. Według najnowszych danych ESHRE (The European Society of Human Reproduction and Embryology, Dunselman i wsp., 2014) częstość występowania tej choroby dotyczy od 2 do 10% kobiet w wieku rozrodczym. Badania kliniczne donoszą również, że od 30 do 50% kobiet z endometriozą jest niepłodnych. U kobiet z bólem otrzewnowym prewalencja endometriozy wzrasta nawet do 80% (The Practice Commitee of the American Society for Reproductive Medicine, 2012). Choroba ta charakteryzuje się występowaniem komórek endometrium poza jamą macicy, najczęściej w ścianie otrzewnej oraz na jajnikach. Komórki błony śluzowej macicy niezależnie gdzie się umiejscowią są funkcjonalne i podlegają zmianom hormonalnym w czasie cyklu miesiączkowego kobiety. Następstwem tego jest przewlekła reakcja zapalna. W przebiegu endometriozy dochodzi więc do wewnętrznych krwawień, rozwoju bolesnych guzków, zapalenia, tworzenia się blizn i zrostów oraz zmian anatomicznych narządów w miednicy mniejszej. Kobiety skarżą się na bolesne miesiączkowanie, chroniczne bóle brzucha i w krzyżu oraz przewlekły ból w miednicy, dyspareunię (bolesne stosunki płciowe), ból w czasie oddawania moczu i stolca. Diagnostyka tej choroby jest trudna, ponieważ ostatecznie można ją potwierdzić tylko po zabiegu laparoskopowym i wykonaniu biopsji z wycinka zmienionej tkanki. USG może być pomocne w ocenie torbieli endometrialnych, a w przypadkach endometriozy głęboko naciekającej – TRUS (transrectal ultrasonography). Zanim dojdzie do pełnej diagnozy większość kobiet z chronicznym bólem przyjmuje środki przeciwbólowe i hormonalne.

Dotychczas istnieje wiele hipotez opisujących potencjalny patomechanizm endometriozy. Jedna z nich „transplantacyjna teoria Sampsona" tłumaczy obecność zmian endometrialnych w jamie otrzewnowej. Według tej teorii dochodzi do defektu aktywności komórek NK polegający na nierozpoznaniu i braku lizy złuszczonych komórek endometrium. W związku z potencjalnym zaangażowaniem komórek NK w etiologię tej choroby oraz brakiem prostego testu diagnostycznego, postanowiliśmy sprawdzić, czy geny *KIR* i *HLA-C* oraz *HLA-B* mogą mieć wpływ na zachorowanie, a także progresję choroby.

Przez wiele lat immunologia transplantacyjna skupiała się na badaniu roli komórek adaptacyjnego układu odpornościowego, bowiem aloreaktywne limfocyty T są niezbędne i wystarczające, aby wywołać reakcję odrzucania przeszczepu. Limfocyty T rozpoznają obce

antygeny głównego i mniejszego układu zgodności tkankowej (Major and Minor Histocompatibility Complex, u ludzi nazywane HLA) dzięki swoim receptorom TCR. Reakcja limfocytów T (CD4+) następuje po bezpośredniej prezentacji antygenów przez komórki prezentujące antygen (APC) pochodzące od dawcy lub też pośrednio, przy pomocy APC biorcy. Większość komórek T jednak bezpośrednio rozpoznaje alogeniczne antygeny MHC, które są eksponowane na obcych komórkach (Nankivell i Alexander, 2010). Jednakże istnieją doniesienia, w których zaobserwowano, że oprócz limfocytów T do przeszczepu nerkowego infiltrują również komórki NK (Totterman i wsp., 1989). Ponadto, u pacjentów z ostrym odrzucaniem nerki opisano podwyższoną liczbę komórek NK we krwi obwodowej (Cooksey i wsp., 1984), a także zauważono w testach *in vitro* wzmożoną cytotoksyczność komórek NK biorcy w kierunku komórek krwi obwodowej dawcy (Vampa i wsp., 2003). Również badania na myszach pozbawionych limfocytów T pokazały, że do odrzucania przeszczepu szpiku kostnego niezgodnego w zakresie MHC klasy I może dojść na drodze zależnej od komórek NK (Oberbarnscheidt i wsp., 2011). Wobec tych przesłanek w odrzucaniu przeszczepu nerkowego postulowano też udział komórek NK. Jak wcześniej wspomniano, komórki NK rozpoznają obecność cząsteczek HLA klasy I na powierzchni komórek docelowych m.in. poprzez receptory KIR. Zdrowe komórki organizmu nie są niszczone przez komórki NK, ponieważ ekspresjonują prawidłowy poziom cząsteczek HLA klasy I, które są rozpoznawane przez hamujące receptory KIR. Jednakże komórki zmienione nowotworowo lub zainfekowane wirusem mają tendencje do obniżania ekspresji HLA klasy I i wówczas mogą być eliminowane przez komórki NK. Co więcej, wysoki polimorfizm KIR i HLA może sprzyjać sytuacjom, w którym komórki NK biorcy posiadające hamujące receptory KIR reagujące z własnymi cząsteczkami HLA klasy I biorcy, mogą nie rozpoznawać cząsteczek HLA klasy I obecnych na komórkach dawcy, prowadząc do aloreaktywności przeciwko przeszczepionemu organowi. Warto zauważyć, iż receptory KIR nie ulegają ekspresji tylko w komórkach NK, ale również w cytotoksycznych limfocytach CD4+CD28- o potencjalnej aktywności w odrzucaniu przeszczepu. Zasadnym było więc sprawdzenie, czy geny *KIR* w kontekście *HLA* biorcy i dawcy mogą spełniać rolę w odrzucaniu przeszczepu nerkowego.

Podsumowując, badania nad rolą KIR i HLA w przedstawionych do oceny pracach mogą mieć nie tylko znaczenie poznawcze, które przyczyni się do poznania patomechanizmu chorób związanych z rozrodem człowieka (poronień samoistnych i endometriozy), ale również mogą być pomocne w konstruowaniu nowych testów diagnostycznych.

Natomiast wyniki badań dotyczące potencjalnej roli *KIR* w utrzymaniu/odrzuceniu przeszczepu nerkowego mogą pomóc przewidzieć losy przeszczepu.

Dzięki rozwojowi nowoczesnych metod biologii molekularnej medycyna staje się coraz bardziej spersonalizowana. Diagnostyka choroby oparta o jej molekularny obraz pozwala na dobranie najbardziej skutecznego leku. Pozwala to również na stworzenie odpowiednich testów farmakogenetycznych, które umożliwiają przewidzenie reakcji pacjenta na leczenie. Uważam, że receptory/geny KIR mogą stać się w przyszłości celem medycyny spersonalizowanej, natomiast poznanie interakcji KIR-HLA może wpłynąć na powstanie nowych dróg terapii.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

- **Nowak I.**, Majorczyk E., Wiśniewski A., Pawlik A., Magott-Procelewska M., Passowicz-Muszyńska E., Malejczyk J., Płoski R., Giebel S., Barcz E., Zoń-Giebel A., Malinowski A., Tchórzewski H., Chlebicki A., Łuszczek W., Kurpisz M., Gryboś M., Wilczyński J., Wiland P., Senitzer D., Sun J.Y., Jankowska R., Klinger M., Kuśnierczyk P. Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases? *PLoS One*. 2010, 26, 5(8): e12381

Gen *KIR2DS5* koduje receptor aktywujący komórkę NK. Niestety ligand dla tego receptora nie został poznany. Analizując potencjalny związek genów *KIR* z podatnością na różne choroby w populacji polskiej zaobserwowano, że gen ten wywołuje efekt ochronny w niektórych z nich, m.in. w zesztywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa (p=0,003, OR=0,47), endometriozie (p=0,03, OR=0,25), w ostrym odrzucaniu przeszczepu nerkowego (p=0,0056, OR=0,44). Nie zaobserwowano takiego efektu dla niedrobnokomórkowego raka płuca, reumatoidalnego zapalenia stawów, poronień samoistnych i białaczek (ALL, AML, CML) oraz w przypadku pacjentów ze stabilną funkcją nerki po przeszczepie. Główne wnioski, jakie można sformułować na podstawie wyników tej pracy i dotyczące tych jednostek chorobowych, które są przedmiotem tej rozprawy, przedstawiono poniżej:

1. Obecność genu *KIR2DS5* i allelu *HLA-C* z grupy C1 u biorców przeszczepu wydaje się chronić przed ostrym odrzucaniem przeszczepu nerkowego (p=0,017, OR=0,47), natomiast brak genu *KIR2DS5* i obecność allelu z grupy C2 *HLA-C* predysponuje do odrzucania (p=0,0015, OR=2,13).

2. Obecność genu *KIR2DS5* chroni przed endometriozą u pacjentek *HLA-C* C2 pozytywnych (p=0,0025, OR=0,41).
3. Brak związku genu *KIR2DS5* z poronieniami samoistnymi (p>0,05).

Łącznie przebadano 1444 pacjentów i 690 osób kontrolnych. Częstość *KIR2DS5* u pacjentów porównywano z częstością tego genu dla odpowiedniej kontroli. Genotypowanie przeprowadzano dwiema metodami PCR-SSP lub Multiplex-PCR. Praca ta pierwszy raz w świecie pokazała ochronną rolę genu *KIR2DS5* w endometriozie w populacji kaukazoidalnej.

- **Nowak I.**, Magott-Procelewska M., Kowal A., Miazga M., Wagner M., Niepiekło-Miniewska W., Kamińska M., Wiśniewski A., Majorczyk E., Klinger M., Łuszczek W., Pawlik A., Płoski R., Barcz E., Senitzer D., Kuśnierczyk P. Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA genotypes affect the outcome of allogeneic kidney transplantation. PLoS One. 2012, 7(9): e44718.

Komórki NK biorcy mogą wykrywać brak własnych antygenów HLA na komórkach przeszczepionego organu dawcy za pomocą receptorów KIR. Ponieważ ludzie różnią się rodzajem i liczbą receptorów KIR może się to przyczyniać do różnic w odpowiedzi na przeszczep alogeniczny. W badaniu wykonano genotypowanie 10 *KIR* u 93 biorców odrzucających przeszczep nerkowy oraz 190 biorców ze stabilną funkcją nerki, którym przeszczepiono nerkę pomiędzy 1989 a 2008 rokiem. Częstość genów *KIR* porównano również wobec 690 osób kontrolnych. Wyniki zgodności w *HLA-A, -B, -DR* pomiędzy biorcą, a dawcą uzyskano z rutynowych oznaczeń, jakie wykonuje się przed transplantacją organu. Do analiz włączono również dane dotyczące choroby podstawowej pacjenta, wieku, płci oraz czasu utrzymania stabilnej funkcji nerki, które umożliwiły wykreślenie krzywych przeżycia przeszczepu w zależności od genotypu *KIR*.

W pierwszym etapie analiz wykazano ochronny efekt zgodności w *HLA-B, -DR* pomiędzy biorcą i dawcą przed odrzucaniem przeszczepu nerkowego. Zaobserwowano również związek *KIR2DS4fl* (full-length) i jego wariantu z 22 nukleotydową delecją - *KIR2DS4del* z odrzucaniem przeszczepu nerkowego (Tabela 2). Ten efekt był modulowany przez zgodność w *HLA-B, -DR*, zwłaszcza u pacjentów, którzy nie chorowali na kłębuszkowe zapalenie nerek, ale posiadali oba warianty genetyczne *KIR2DS4*. Natomiast u biorców z kłębuszkowym zapaleniem nerek, zgodność w *HLA* wydaje się mniej ważna dla odrzucania przeszczepu nerkowego niż obecność *KIR2DS4*. Posiadanie przez biorców obu wariantów *KIR2DS4* silnie,

bo ok. 15-krotnie wzmagało prawdopodobieństwo odrzucenia przeszczepu w grupie pacjentów z kłębuszkowym zapaleniem nerek w porównaniu do analogicznych pacjentów spoza tej grupy (Fig.7). Analiza wpływu genotypu *KIR* na długość utrzymania stabilnej funkcji nerki w zależności od choroby podstawowej pacjentów została pokazana po raz pierwszy na świecie.

Ponadto, interesującym wydaje się fakt, że gen *KIR2DS5* chronił przed odrzucaniem, jeśli pacjent był pozytywny pod względem *KIR2DS4fl* (Fig.5), ale negatywny pod względem *KIR2DS4del* (Fig.6). Wariant delecyjny *KIR2DS4* koduje rozpuszczalną cząsteczkę, która może reagować z ligandem dla związanego z błoną komórkową KIR2DS4fl lub też receptora zlokalizowanego na innych komórkach mających wpływ na proces odrzucania. Poza tym geny *KIR2DS4* i *KIR2DS5* występują w negatywnym niezrównoważeniu sprzężeń (LD linkage disequilibrium). Częstości haplotypów *KIR2DS4/KIR2DS5* dla pacjentów nieodrzucających przeszczep i osób kontrolnych były podobne, natomiast pacjenci z ostrym odrzucaniem przeszczepu charakteryzowali się 3-krotnie mniejszą częstością haplotypu *KIR2DS4-/KIR2DS5+* niż pozostałe badane grupy. To potwierdza ochronną rolę genu *KIR2DS5* w utrzymaniu przeszczepu.

Podsumowując wyniki przedstawione w tej pracy można stwierdzić, że gen *KIR2DS5* wpływa pozytywnie na losy przeszczepu, natomiast *KIR2DS4* predysponuje do odrzucania, zwłaszcza u pacjentów z kłębuszkowym zapaleniem nerek jako choroby podstawowej. Nasze wyniki sugerują również, że włączenie oznaczania tych genów do praktyki klinicznej może pomóc przewidzieć losy przeszczepu.

- **Nowak I.**, Majorczyk E., Płoski R., Senitzer D., Sun J-Y., Kuśnierczyk P. Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman. Tissue Antigens 2011, 78(2): 115-119.

Gen *KIR2DL4* występuje prawie u wszystkich ludzi i koduje receptor, który występuje na: obwodowych, macicznych oraz doczesnowych komórkach NK CD56^{bright}. Jego ligandem są cząsteczki HLA-G występujące na komórkach trofoblastu pozakosmkowego, które podczas implantacji zarodka zagłębiają się w doczesną i tam kontaktują się z matczynymi leukocytami. Dlatego KIR2DL4 uważa się za ważną cząsteczkę mającą wpływ na sukces reprodukcyjny. Jednakże w 2003 roku opisano przypadek afrykańskiej kobiety – wieloródki, pozbawionej tego genu. Badania te sugerowały, że gen ten nie jest niezbędny dla powodzenia ciąży. W naszej pracy opublikowaliśmy identyczny do tego opisanego w pracy Gomez-Lozano i wsp. (2003), genotyp *KIR* u polskiej kobiety, która również urodziła dziecko. Taki genotyp, pozbawiony

KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR2DS3, KIR2DL4, KIR2DS4del, KIR2DS4fl, KIR3DP1 i *KIR2DP1,* został znaleziony wśród polskiej populacji 690 osób, stanowiących grupę kontrolną w badaniach związku genów *KIR* i *HLA* w etiologii niektórych chorób będących w sferze zainteresowań naszego laboratorium. Brak tych genów został stwierdzony trzema niezależnymi metodami. Genotypowanie *KIR* wykonano również u dziecka tej kobiety oraz u jego ojca z wynikiem pozytywnym dla genu *KIR2DL4*. Ponadto, do roku 2011 opublikowano dane dotyczące 9 osób na świecie również pozbawionych genu *KIR2DL4*. Praca zawiera także porównanie naszego przypadku z pozostałymi opisanymi w świecie.

Podsumowując wyniki uzyskane w tej pracy należy podkreślić, że gen *KIR2DL4* nie jest niezbędny w utrzymaniu ciąży. Wskazuje to na inne potencjalne cząsteczki, które mogą być zaangażowane w rozpoznawaniu HLA-G, mianowicie LILRB1, którego ekspresję również stwierdzono na macicznych komórkach NK i limfocytach T.

- **Nowak I.**, Barcz E., Majorczyk E., Malinowski A., Wilczyński J.R., Banasik M., Motak-Pochrzęst H., Kuśnierczyk P. Genetic polymorphism of KIR2DL4 in the Polish population. Tissue Antigens 2015, 85(6): 450-457.

Praca jest kontynuacją badań nad rolą genu *KIR2DL4* w rozrodzie człowieka i jest pierwszym w świecie badaniem przeprowadzonym na populacji płodnych par. Polimorfizm genu *KIR2DL4*, który badano, dotyczy dwóch alleli zawierających w eksonie 7 następujące po sobie 9 lub 10 reszt adeniny. Sekwencja 10A warunkuje kodowanie domeny przezbłonowej. Allel 10A koduje więc błonowy receptor, natomiast allel 9A receptor, który ulega sekrecji (spowodowanej całkowitym brakiem domeny przezbłonowej lub jej niewłaściwą formą). W pracy przedstawiono wyniki genotypowania tego polimorfizmu, jak i 3 innych, znajdujących się w pobliżu, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (9571 C>T, 9769 C>A, 9797 A>G). Łącznie przetestowano 219 płodnych par populacji polskiej, w których kobieta urodziła z tym samym partnerem przynajmniej dwójkę dzieci. Do badania polimorfizmu 9A/10A (9620 A>-) zastosowano metodę HRM (High Resolution Melting), a dla pozostałych polimorfizmów - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorhism). W pracy zaobserwowano nieznaczną różnicę w częstościach genotypów i alleli dla pozycji 9769 C>A pomiędzy kobietami i ich partnerami. Dodatkowo, wykazano występowanie całkowitego niezrównoważenia sprzężeń (LD – linkage disequilibrium) pomiędzy insercją/delecją 9A w pozycji 9620 genu, a 9571 T>C (r^2=1) oraz prawie całkowitego LD z 9797 G>A (r^2=0,96 i r^2=0,892). Wyniki te dotyczyły

zarówno kobiet, jak i mężczyzn. Genotypowanie *KIR2DL4* w 4 pozycjach pozwoliło na określenie poszczególnych alleli *KIR2DL4* przedstawionych w Tabeli 2 i 5 tej pracy. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły również prawidłowość oznaczania polimorfizmu 9A/10A dwiema różnymi metodami. Sugerują również, że czasami zastosowanie stosunkowo prostych metod detekcji alleli (jak RFLP) może być tańsze i mniej kłopotliwe niż wdrażanie nowych, technologicznie bardziej zaawansowanych, jak HRM.

Podsumowując, wybór metody genotypowania *KIR2DL4* zależy od celu danego badania: jeśli chcemy oznaczać polimorfizm 9A/10A, ekonomicznie lepiej jest zastosować RFLP dla 9571C>T, 9769 C>A, natomiast jeśli chcemy badać nowe mutacje i polimorfizmy powinno się użyć HRM. Jeśli chcemy znać szczegóły sekwencji nukleotydowej powinno się użyć metody sekwencjonowania.

- **Nowak I.**, Płoski R., Barcz E., Dziunycz P., Kamiński P., Kostrzewa G., Milewski Ł., Roszkowski P.I., Senitzer D., Malejczyk J., Kuśnierczyk P. KIR2DS5 in the presence of HLA-C C2 protects against endometriosis. Immunogenetics 2015, 67(4): 203-209.

Praca jest kontynuacją badań nad patomechanizmem endometriozy, w której testowano hipotezę defektu aktywności komórek NK w rozpoznawaniu i lizie komórek endometrialnych, który może być spowodowany brakiem lub obecnością genów *KIR*. Praca przedstawia rozkład częstości 13 wariantów *KIR* u 153 kobiet z endometriozą oraz 213 kobiet kontrolnych. U wszystkich kobiet testowano również *HLA-C* C1 i C2 oraz *HLA-Bw4* i - *Bw6*. Nie stwierdzono związku *HLA-Bw4* i - *Bw6* z chorobą. Częstość badanych genów *KIR* u pacjentek była podobna do tych obserwowanych u kontrolnych kobiet z wyjątkiem *KIR2DS5* (wynik ten pokazano w pracy z PLoS One w 2010 roku). Obecność genu *KIR2DS5* obniżała ryzyko choroby u kobiet *HLA-C* C2 pozytywnych. Nowością w tej pracy jest wykazanie wpływu genów *KIR2DS5* i *KIR2DS4* na stopień zaawansowania choroby, tzn. porównywano rozkłady częstości tych genów ze względu na lokalizację zmian (otrzewna, jajniki) oraz wg kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Płodności (American Fertility Society), który dzielił zaawansowanie choroby na 4 stopnie: I - II - minimalny i łagodny, III - średni oraz IV - ciężki. Kobiety o genotypie *KIR2DS5+/KIR2DS4del-* posiadały 13 - krotnie niższą szansę na to, że choroba zajmie otrzewną niż te o genotypie *KIR2DS5-/KIR2DS4del-*. Podobnie kobiety negatywne pod względem *KIR2DS5*, ale pozytywne pod względem *KIR2DS4del* miały 11 - krotnie niższą szansę na endometriozę otrzewnową. Interesującą obserwacją było obniżanie ryzyka choroby

w otrzewnej u podwójnie pozytywnych kobiet, ale w mniejszym stopniu, niż u kobiet negatywnych pod względem tylko jednego z tych genów. Wykazano także związek genu *KIR2DS4del* z ciężkością choroby, ponieważ zaobserwowano wzrost odsetka pacjentek pozytywnych pod względem tego wariantu wraz ze stopniem zaawansowania choroby (p=0,012).

Podsumowując wyniki opisane w tej pracy wykazano wpływ genu *KIR2DS5* i *KIR2DS4del* na lokalizację zmian chorobowych, jak również stopień zaawansowania. Nasze wyniki sugerują ponadto inne podłoże genetyczne endometriozy jajnikowej i otrzewnowej. Potwierdzenie tych badań na większej grupie pacjentek i kobiet kontrolnych oraz różnych grupach etnicznych może przyczynić się do uznania genów *KIR2DS5* i *KIR2DS4del* oraz *HLA-C* C1 i C2 jako markerów genetycznych tej choroby. Nasze badania są drugimi w świecie (po grupie z Japonii) nad rolą *KIR* i *HLA* w endometriozie i pierwszymi opublikowanymi, które uwzględniają miejsce lokalizacji zmian chorobowych.

- **Nowak I.**, Malinowski A., Barcz E., Wilczyński J.R., Wagner M., Majorczyk E., Motak-Pochrzęst H., Banasik M., Kuśnierczyk P. Possible role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 gene polymorphisms in spontaneous miscarriage. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2016, doi: 10.1007/s00005-016-0389-7.

Celem tej pracy było wykazanie związku genu *KIR2DL4, LILRB1* oraz ich ligandu – *HLA-G* z podatnością na samoistne poronienia. Ponadto, testowano hipotezę czy brak szczególnego wariantu *KIR2DL4* może być kompensowany przez obecność odpowiedniego allelu *LILRB1*, którego produkt białkowy należy do rodziny LILR (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor) zwanej też ILT (Immunoglobulin-Like Transcript). LILRB1, występuje głównie na większości leukocytów i jest obecny w ludzkim łożysku (McIntire i wsp., 2008). W związku z tym może reagować z cząsteczkami HLA-G zlokalizowanymi na trofoblaście. LILRB1, podobnie jak KIR2DL4, może wywierać efekt hamujący bądź aktywujący aktywność komórek NK. Dzieje się tak ze względu na obecność ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) w regionie cytoplazmatycznym tego receptora, który po interakcji z białkami adaptorowymi SAP (signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein)) i EAT (Ewing's sarcoma-associated transcript) może zmienić funkcję z hamującej na aktywującą (Li i wsp., 2009). Wszystkie te przesłanki wskazały na potrzebę włączenia również tego genu do badań. W pracy przetestowano 277 par z 2 i więcej poronieniami samoistnymi oraz 219 par kontrolnych, które mają ze sobą przynajmniej dwójkę

zdrowo urodzonych dzieci. Wśród par z poronieniami 198 było nawracających (od 3 do 8 poronień), pozostałe 79 par doświadczyło dwóch poronień. Polimorfizm *HLA-G* badano w trzech miejscach: -725 C>G>T, -716 T>G, 14 nukleotydowa insercja/delecja w 3'UTR. W genie *LILRB1* badano zamianę G>A w 14 intronie genu jako potencjalnego miejsca alternatywnego składania. Polimorfizm genu *KIR2DL4* badano w 4 pozycjach: 9571 C>T, 9620 A>-, 9769 C>A, 9797 A>G. Zastosowano metody PCR-SSP, HRM, RFLP. W analizie wieloczynnikowej uwzględniono wiek, liczbę poronień, tydzień poronienia, obecność autoprzeciwciał, syndrom antyfosfolipidowy, polimorfizm *MTHFR* 677 C>T, *MTHFR* 1298 A>C. Nie wykazano związku tych parametrów u pacjentki z liczbą poronień. Wykazano natomiast ochronny wpływ heterozygotyczności *HLA-G* w pozycji -716 T>G (p=0,02, OR=0,64) i *LILRB1* w pozycji 5651 G>A (p=0,013, OR=0,40) u kobiet. Nie wykazano natomiast żadnej korelacji badanych polimorfizmów genu *KIR2DL4* u kobiet w predysponowaniu, czy ochronie przed poronieniem. Zaskakującym wynikiem okazał się być związek z poronieniami heterozygotyczności 9A/10A *KIR2DL4*, ale u partnerów kobiet, które poroniły (p=0,0288, OR=1,49). Analiza statystyczna wykazała ponadto, że wszystkie wspomniane wyżej 3 polimorfizmy mogą mieć wpływ na sukces reprodukcyjny człowieka (p=0,00968, $\chi 2_{df=4}$ =13.35), jednakże nie jest to wpływ addytywny. W dostępnej literaturze nie znaleziono podobnych wyników. Nikt do tej pory również nie badał partnerów kobiet, które poroniły. Czy odziedziczony po ojcu allel *KIR2DL4* u rozwijającego się płodu może mieć wpływ na interakcje komórkowe, jakie zachodzą w mikrośrodowisku macicy w czasie ciąży, pozostaje do wyjaśnienia. Jednakże praca Guo i wsp. (2013) pokazała, że receptory KIR2DL4 i LILRB1 mogą również występować na trofoblaście pierwotnym i trofoblastycznych liniach komórkowych Jar oraz JEG-3. Co więcej, receptory te były funkcjonalne i wiązały rozpuszczalne HLA-G5. Ponadto prace Brusilowsky'ego i wsp. (2013, 2014) wskazują, że alternatywnym ligandem dla KIR2DL4 mogą być heparyny (HS – heparan sulfate, GAG – heparyn glycosaminoglycans), które mogą zmieniać funkcje receptora KIR2DL4. Dlatego można spekulować, że allel KIR2DL4 odziedziczony po ojcu i ekspresjonowany przez trofoblast może reagować z proteoglikanami zawierającymi GAG i ta interakcja może zależeć od polimorfizmu *KIR2DL4*. Podsumowując wyniki heterozygotyczność w pozycjach -716 *HLA-G* i 5651 *LILRB1* u kobiet może być korzystna w sukcesie reprodukcyjnym człowieka, natomiast heterozygotyczność 9A/10A genu *KIR2DL4* u ich partnerów nie.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH (~~ARTYSTYCZNYCH~~)

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w **34** pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), w tym w **17** pracach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (pierwszy autor - **5** prac, **2** prace równorzędnie z drugim autorem, autor korespondencyjny – **3** prac.

W **17** pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) przed uzyskaniem stopnia doktora pierwszym autorem byłam w **3** pracach oraz w **4** pracach drugim autorem. Mój dorobek naukowy obejmuje również **2** prace z pierwszym autorstwem spoza bazy JCR, **50** komunikatów zjazdowych, **6** referatów wygłoszonych na konferencjach naukowych, w tym **2** na zaproszenie organizatorów. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) prac oryginalnych wynosi **88,842** (punkty MNiSW: **615**). Do dnia 4 kwietnia 2016 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane **313** razy, w tym **277** razy wyłączając autocytowania. Mój Indeks Hirscha wynosi **12**. Łączny IF sześciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi **18,269**, przy liczbie cytowań **43**. Praca naukowa i publikacje, które powstały w jej wyniku, zaowocowały przyznaniem **5** nagród (zał.3, VIII.). Ponadto, w ramach działalności naukowej uczestniczyłam/uczestniczę w realizacji **8** projektów badawczych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki (w tym w **3** byłam/jestem kierownikiem).

	Opublikowanych przed doktoratem	Opublikowanych po doktoracie	Łącznie
Liczba publikacji naukowych	19	17	36
Liczba publikacji w czasopismach z bazy Web of Science	17	17	34
Łączna liczba punktów wg listy czasopism MNiSW*	240	375	615
Sumaryczny IF	**43,544**	**45,298**	**88,842**

*obejmuje punkty za publikacje w czasopismach naukowych bez uwzględnienia publikacji streszczeń w materiałach konferencyjnych.

a) przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę licencjacką zatytułowaną „Wpływ cytostatyków na stopień spolimeryzowania aktyny w komórkach zwierzęcych" wykonałam pod opieką prof. dr hab. Marii Błaszkiewicz-Malickiej w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego. Po ukończeniu studiów licencjackich rozpoczęłam studia magisterskie na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego na kierunku Biotechnologia. Pracę dyplomową pt.: „Białka z nasion dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*) reagujące z przeciwciałami anty-CMTI. Izolacja i ich częściowa charakterystyka" realizowałam pod kierunkiem dr Ireny Lorenc-Kubis w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego.

Po ukończeniu studiów, w 1997 r. rozpoczęłam pracę w Laboratorium Immunogenetyki IITD PAN we Wrocławiu na stanowisku asystenta. Początkowo zajęłam się wykonywaniem sądowych ekspertyz dochodzenia ojcostwa metodą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych minisatelitarnego DNA (do września 2004 r.).

W 1998 r. otrzymałam grant KBN dla Młodego Pracownika pt.: „Wpływ własnych peptydów ustroju na odpowiedź limfocytów T na obcy peptyd antygenowy". Grant ten realizowałam we współpracy z laboratorium prof. Leszka Ignatowicza z Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia (USA), który użyczył mi unikatowego modelu transfekowanych mysich fibroblastów jako komórek prezentujących antygen. Szczegóły dotyczące doświadczeń oraz ich wyników zostały opublikowane w 2 pracach (zał.3, I.1.1.3 oraz I.1.2.2), a za doniesienie zjazdowe (zał.3, VIII.1) otrzymałam stypendium.

W latach 2005-2008 byłam wykonawcą 2 grantów KBN, w tym w jednym głównym wykonawcą. Podczas realizacji projektu pt.: „Związek genotypu *KIR* i *HLA-C* z nawracającym poronieniem", którego kierownikiem był prof. Piotr Kuśnierczyk, moje zainteresowania dotyczące roli genów dla receptorów immunoglobulinopodobnych komórek NK oraz HLA w poronieniach samoistnych wzrosły, a wykonanie tych badań stało się realne. W realizację tego projektu zaangażowani byli głównie prof. Andrzej Malinowski, prof. Henryk Tchórzewski oraz prof. Jacek R. Wilczyński z Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz prof. Ewa Barcz z I Katedry i Kliniki Położnictwa i Ginekologii z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Ta współpraca zaowocowała publikacją (zał.3, I.1.1.17), natomiast doniesienie zjazdowe (zał.3, VIII.2) zostało nagrodzone wyróżnieniem. Wyniki tego grantu stały się częścią mojej pracy doktorskiej.

Równolegle do badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej uczestniczyłam w badaniach nad rolą *KIR* u biorców i dawców alogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych we współpracy z dr Sebastianem Giebelem ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, która zakończyła się publikacją 6 artykułów, w tym 4 przed uzyskaniem stopnia doktora (zał.3, I.1.1.5, I.1.1.12, I.1.1.13, I.1.1.16). Jedna z prac została nagrodzona przez Dyrektora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu w 2008 r. za publikację o najwyższym współczynniku wpływu (zał. 3, VIII.4).

W latach 2006-2009 byłam również głównym wykonawcą projektu przyznanego przez MNiSW pt.: „Poszukiwanie związku genotypu *KIR* z wystąpieniem ostrego odrzucania u chorych po transplantacji nerki". Realizacja grantu została zakończona 2 publikacjami, które ukazały się w PLoS One w 2010 oraz 2012 r. (zał.3, I.2.1.1, I.2.1.8) oraz 2 pracami magisterskimi.

Nawiązanie współpracy z Zakładem Genetyki Medycznej oraz Zakładem Histologii i Embriologii, a także II Kliniką Położnictwa i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie pozwoliło pozyskać DNA od pacjentek z endometriozą. Zaczęłam więc poszukiwać związku badanych przeze mnie genów z tą chorobą, szukając podobnych korelacji do wyników uzyskanych w badaniu samoistnych poronień. Jednakże wyniki tych badań opublikowano już po uzyskaniu stopnia doktora (zał. 3, I.2.1.1, I.2.1.16).

Należy podkreślić, iż dużą rolę w badaniach prowadzonych w naszym laboratorium odegrała wieloletnia współpraca z dr Davidem Senitzerem z City of Hope National Medical Center, Duarte (USA), który w miarę potrzeby, udostępniał nam startery do genotypowania KIR metodą Multiplex-PCR. Ponadto, od 2006 r. uczestniczymy w standaryzacji genotypowania KIR programu International KIR Exchange przeprowadzanego przez UCLA Immunogenetics Center (USA), który sprawdza 3 razy do roku prawidłowość genotypowania *KIR* w naszym laboratorium.

Warsztat pracy pozwolił mi również zaangażować się w inne prace badawcze naszego laboratorium, m.in. w:

- badanie roli polimorfizmu *CTLA-4* w odrzucaniu przeszczepu nerkowego, łuszczycy, astmie alergicznej; *TGFβ* w astmie alergicznej
- badanie rozkładu genów *KIR* w zdrowej populacji polskiej
- badanie roli *KIR* i *HLA* w atopowym zapaleniu skóry (grant MNiSW w latach 2009-2012, zał.3, VII.5)

b) przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Stopień doktora nauk biologicznych z wyróżnieniem uzyskałam w grudniu 2009 roku za pracę pt.: „Ocena związku genów *KIR* i *HLA-C* z podatnością na samoistne poronienia". W 2011 r. ukazała się drukiem praca zawierająca wyniki będące częścią pracy doktorskiej (zał.3, I.2.1.5). W tymże roku opisałam przypadek płodnej kobiety, która była pozbawiona genu *KIR2DL4*, dziewiąty taki przypadek opisany na świecie (zał.3, I.2.1.4).

W 2010 r. ukazała się praca podsumowująca rolę genu *KIR2DS5* w ochronie przed niektórymi chorobami, m.in.: odrzuceniem przeszczepu nerkowego, endometriozą, zesztywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (zał.3, I.2.1.1). Analiza danych pacjentów z odrzucaniem przeszczepu nerkowego i ze stabilną funkcją nerki wobec HLA, choroby podstawowej i wdrożonego leczenia pozwoliły rozszerzyć zakres analiz statystycznych. W 2012 r. opublikowałam pracę (zał.3, I.2.1.8), za którą w 2013 r. odebrałam nagrodę Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (zał. 3, VIII.5). W roku 2010 złożyłam kolejny wniosek grantowy do MNiSW, pt.: „Związek polimorfizmu genów *KIR2DL4*, *LILRB1* i *HLA-G* z poronieniem samoistnym", na który w 2011 roku otrzymałam finansowanie. Realizację tego grantu prowadziłam do listopada 2014 r. W wyniku realizacji grantu powstały 2 prace (zał.3, I.2.1.15, I.2.1.17), a wyniki były prezentowane na 4 konferencjach (zał. 3, X.2.6, X.2.7, X.2.8, X.2.10).

Jednocześnie zaangażowałam się również w realizację kolejnego projektu (zał.3, VII.7) badając rozkład częstości alleli 9A/10A *KIR2DL4* u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz w grupie kontrolnej (publikacja zał.3, I.2.1.14).

Podjęty podczas realizacji pracy doktorskiej kierunek badawczy, jakim było badanie roli polimorfizmu *KIR* i *HLA* w rozrodzie człowieka oraz w transplantacji rozwijam do dziś. Badania i analizy statystyczne nad stopniami zaawansowania endometriozy zaowocowały publikacją (I.2.1.16). Ponadto, od lutego 2015 r. do lutego 2018 jestem kierownikiem projektu NCN OPUS7 pt.: „Związek polimorfizmu genów *KIR*, *LILRB* oraz ich ligandów - *HLA-C* i *HLA-G* z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zapłodnieniu in vitro", który jest kontynuacją moich zainteresowań oraz badań nad związkiem genów *KIR* i ich ligandów z niepowodzeniami rozrodu u człowieka. We współpracę zaangażowałam dr George'a Ndukwe z kliniki wspomaganego rozrodu Zita West Assisted Fertility Clinic w Londynie, profesorów Malinowskiego i Wilczyńskiego z Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz dr Michała Radwana i dr Pawła Radwana ze Szpitala „Gameta" w Rzgowie. Celem projektu jest zbadanie

związku genów *KIR, LILRB* oraz ich ligandów – *HLA-C* i *HLA-G* z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodka po zabiegu *in vitro* w populacji polskiej, jak również w populacji brytyjskiej. Polimorfizm *HLA-G* będzie skorelowany z ilością jego rozpuszczalnej formy (sHLA-G) w osoczu krwi pacjentek przed zabiegiem *in vitro*, w medium hodowlanym zapłodnionej komórki jajowej w 3 dniu hodowli oraz po zabiegu *in vitro*. Ponieważ embrion dziedziczy w połowie geny od matki i ojca, również czynnik genetyczny pochodzenia ojcowskiego może być ważny w prawidłowej implantacji zarodka do błony śluzowej macicy. Dodatkowo badania z podziałem na grupy etniczne pozwolą na szerszy pogląd na udział wyżej wymienionych genów i rozpuszczalnego HLA-G w niepowodzeniach implantacji zarodka. Należy podkreślić, że sporą grupę pacjentek zgłaszających się do Zita West Assisted Fertility Clinic w Londynie w celu poddania się zabiegowi IVF stanowią Azjatki, które mają odmienny zestaw genów *KIR* i *HLA* od tych obserwowanych w populacji kaukaskiej. Być może istnieją szczególne kombinacje wariantów *HLA-G* i *HLA-C* z niektórymi zestawami alleli genów *KIR* i *LILRB*, które mogą sprzyjać niepowodzeniom implantacji zarodka w zależności od grupy etnicznej.

Poniżej przedstawiono najważniejsze zagadnienia w trakcie realizacji – nie opublikowane:

- Pacjentki po poronieniach samoistnych niejednokrotnie wykazują tendencję w kierunku zmian zakrzepowych. Jednym z genów predysponujących do zakrzepicy jest gen *MTHFR*, który koduje enzym – reduktazę metylenotetrahydrofolianu, biorący udział w procesie przekształcenia aminokwasu homocysteiny do metioniny w reakcji katalizowanej przez syntazę metioninową. U osób z mutacją punktową 677C>T w genie *MTHFR* stwierdza się podwyższone stężenie homocysteiny we krwi i moczu oraz niskie stężenie metioniny. Również mutacja A>C w pozycji 1298 tego genu skutkuje obniżeniem aktywności enzymu. W ramach pracy inżynierskiej mojej studentki przetestowano 293 pacjentki z poronieniami samoistnymi oraz grupę 219 zdrowych, płodnych kobiet. Znaleziono zależność występowania poronień do 10 tygodnia ciąży u kobiet z podwyższoną homocysteiną. Jednakże duży przedział ufności dla testu wskazał na zbyt małą ich liczbę, żeby wynik był informatywny. W związku z tym od roku zwiększamy grupę pacjentek z podwyższoną homocysteiną.
- Z uwagi na odkrycie nowego ligandu dla KIR2DL4, jakim są heparyny zbieramy dane kliniczne od pacjentek z poronieniami samoistnymi. Wiele pacjentek w ramach leczenia

otrzymuje heparynę drobnocząsteczkową w celu zmniejszenia krzepliwości krwi u pacjentek z podwyższonym ryzykiem zakrzepicy. Niezwykle interesującym badaniem będzie więc analiza wpływu genotypu *KIR2DL4* na losy kolejnej ciąży u pacjentek przyjmujących różne dawki heparyny.

- Ponieważ od roku 2011 zwiększono liczbę par z poronieniami samoistnymi do badań o ok. 130 par od poprzednio opublikowanej grupy 149 par i wykonano genotypowanie *KIR* oraz *HLA-C*, planujemy ponowne analizy statystyczne, które zweryfikują czy wyniki poprzednio uzyskane powtarzają się.
- Kontynuacja badań nad rolą *KIR* i *HLA* w utrzymaniu/odrzucaniu przeszczepu nerkowego. Kolejnym krokiem będzie korelacja wyniku zastosowanego leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepie z genotypem *KIR2DS5* i *KIR2DS4*.

Literatura uzupełniająca do autoreferatu:

- Brusilowsky i wsp. J. Immunol., 2013, 191: 5256-5267.
- Brusilowsky i wsp. Front. Oncol., 2014, 4: 1-3.
- Carrington i Norman. The KIR gene cluster. Bethesda, M.D: U.S. Natl. Library Med., National Centre for Biotechnology Information; 2003.
- Cooksey i wsp. Br. J. Surg., 1984, 71: 874-877.
- Diejomaoh. Med. Princ. Pract., 2015, 24 Suppl. 1: 38-55.
- Dunselman i wsp., Hum. Reprod., 2014, 29: 400-412.
- Goodridge i wsp. Molec. Hum. Reprod., 2009, 15: 489-497.
- Gomez-Lozano i wsp. Eur. J. Immunol., 2003, 33: 639-644.
- Guethlein i wsp. Immunol Rev. 2015, 267(1): 259-282.
- Guo i wsp. PLoS One., 2013, 8(10): e76023.
- King i wsp. Placenta, 2000a, 21, Suppl. A, Trophoblast Research, 14: S81-S85.
- King i wsp. Placenta, 2000b, 21: 376-387.
- Lash i wsp. Placenta, 2008, 29 Suppl A: S92-94.
- Li i wsp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 5767-5772.
- Malinowski i Wilczyński. Ginekologia Praktyczna, 2003, 11: 47-56.
- McIntire i wsp. Placenta, 2008, 29: 631-638.
- Medawar. Symp. Soc. Exp. Biol., 1953, 7: 320-338.
- Menier i wsp. Tissue Antigens, 2009, 75: 201-206.

- Nankivell i Alexander. N. Engl. J. Med., 2010, 363: 1451-1462.
- Nowak i wsp. J. Appl. Genet., 2009, 50(4): 391-398.
- Nowak i wsp. J. Reprod. Immunol. 2011, 88(1): 32-37.
- Oberbarnscheidt i wsp. Sem. Immunol., 2011, 23: 264-272.
- Parham. Immunol. Lett., 2004, 92: 11-13.
- PrabhuDas i wsp., Nat Immunol. 2015, 16(4): 328-34.
- The Practice Commitee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility and Sterility, 2012, 98: 591-598.
- Totterman i wsp. Transplantation, 1989, 47: 817-823.
- Vampa i wsp. Transplantation, 2003, 76: 1220-1228.

Wrocław, 20.04.2016r.

Nowak Izabela