

AUTOREFERAT

dr n. biol. Małgorzata Dawidowska

Załącznik nr 2

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
Poznań, 2019

I. Dane wnioskodawcy

Małgorzata Dawidowska
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

licencjat z biotechnologii (2001)

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Kierunek Biotechnologia
Tytuł pracy licencjackiej: *Molekularne podstawy mukowiscydozy.*
Promotor: Prof. dr hab. Artur Jarmołowski

magister biotechnologii (2003)

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Kierunek Biotechnologia
Tytuł pracy magisterskiej: *Analiza ilościowa chimeryzmu komórek hematopoetycznych po allogeniczej transplantacji szpiku kostnego w terapii białaczek dziecięcych.*
Promotor: Prof. dr hab. med. Michał Witt

doktor nauk biologicznych (2007)

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Lekarski I
Tytuł pracy doktorskiej: *Identyfikacja oraz ocena częstości występowania i specyfiki rearanżacji genów kodujących immunoglobuliny i receptory limfocytów T w grupie polskich dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną.*
Promotor: Prof. dr hab. med. Jacek Wachowiak

III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2006-2008	Instytut Genetyki Człowieka PAN, Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej; biolog
2008-2017	Instytut Genetyki Człowieka PAN, Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej; adiunkt
2018-obecnie	Instytut Genetyki Człowieka PAN, Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej; asystent
2017-obecnie	SWPS Uniwersytet Humanistycznospołeczny, Wydział Zamiejscowy w Poznaniu; wykładowca

IV. Dorobek naukowy

Jestem autorką **37** prac naukowych:

- **10** oryginalnych prac pełnotekstowych (w tym 7 prac posiada Impact Factor)
- **3** prac oryginalnych, opublikowanych jako listy do redakcji (wszystkie posiadają IF)
- **2** opisów przypadku (oba posiadają IF)
- **5** prac poglądowych (w tym 3 prace posiadają IF)
- **17** rozdziałów w książkach (w tym 9 o zasięgu międzynarodowym)

W **21 pracach** jestem **pierwszym** i jednocześnie korespondencyjnym autorem, w **4 pracach** jestem **ostatnim korespondencyjnym autorem** (senioralnym).

Dane bibliometryczne (z dnia 2019-02-12)

- sumaryczny Impact Factor (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji): **57,062**
- sumaryczna liczba punktów MNSzW: **505** (**610**, wg. punktacji zaproponowanej od 2019)
- indeks Hirscha (wg Web of Science): **6**
- liczba cytowań (wg Web of Science): **100** (**87** bez autocytowań)

Ponadto:

Jestem **redaktorką 2 książek naukowych**, w tym jednej o zasięgu międzynarodowym.

Wygłosiłam **15 referatów** na konferencjach naukowych, w tym **9 na zaproszenie organizatorów**.

Jestem współautorką **48 doniesień zjazdowych**, w tym 10 opublikowanych w suplementach czasopism z listy *Journal Citation Reports*.

Jestem autorką **3 prac popularnonaukowych**.

Prowadzę działalność **dydaktyczną** i **popularyzującą** naukę.

Sprawowałam/sprawuję **opiekę naukową** nad stażystami, magistrantami i doktorantami, w tym jako **promotor pomocniczy**; byłam też promotorem pracy inżynierskiej.

Brałam/biorę udział w realizacji **8 projektów badawczych**, w tym w **2 jako kierownik projektu**.

Szczegółowy opis wszystkich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku nr 4 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

v. Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe

(wg. art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) zebranych pod zbiorczym tytułem:

Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci w ujęciu badań podstawowych i translacyjnych

Osiągnięcie naukowe, które przedkładam ubiegając się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna składa się z 6 prac (5 prac oryginalnych i 1 pracy przeglądowej), opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w latach 2013-2019.

1. **Dawidowska M***, Jaksik R, Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalska M, Sędek Ł, Machowska L, Lalik A, Lejman M, Ussowicz M, Kałwak K, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M. Comprehensive investigation of miRNome identifies novel candidate miRNA-mRNA interactions implicated in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Neoplasia** 2019 March; 21(3): 294-310. doi.org/10.1016/j.neo.2019.01.004
IF 4,994 MNiSW 35 (70 punktów, wg. punktacji proponowanej od 2019)
Indywidualny wkład własny szacuję na 60%
2. Szarzyńska-Zawadzka B, Kunz JB, Sędek Ł, Kosmalska M, Zdon K, Biecek P, Bandapalli OR, Kraszewska-Hamilton M, Jaksik R, Drobna M, Kowalczyk JR, Szczepański T, Van Vlierberghe P, Kulozik AE, Witt M, **Dawidowska M***. PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. **Am J Hematol.** 2019 Jan 7. doi: 10.1002/ajh.25396.
IF 5,303 MNiSW 35 (100 punktów, wg. punktacji proponowanej od 2019)
Indywidualny wkład własny szacuję na 45%
3. Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Daca-Roszak P, Kosmalska M, Jaksik R, Witt M, **Dawidowska M***. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Int J Mol Sci.** 2018 Sep 20;19(10). pii: E2858. doi: 10.3390/ijms19102858.
IF 3,687 MNiSW 30
Indywidualny wkład własny szacuję na 60%
4. Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, **Dawidowska M***. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. **Blood Rev.** 2018 Nov;32(6):457-472. doi: 10.1016/j.blre.2018.04.003.
IF 6,6 MNiSW 40
Indywidualny wkład własny szacuję na 60%

* autor korespondujący

5. **Dawidowska M***, Kosmalska M, Sędek Ł, Szczepankiewicz A, Twardoch M, Sonsala A, Szarzyńska-Zawadzka B, Derwich K, Lejman M, Pawelec K, Obitko-Płudowska A, Pawińska-Wąsikowska K, Kwiecińska K, Kołtan A, Dyla A, Grzeszczak W, Kowalczyk JR, Szczepański T, Ziętkiewicz E, Witt M. Association of germline genetic variants in RFC, IL15 and VDR genes with minimal residual disease in pediatric B-cell precursor ALL.

Sci Rep. 2016 Jul 18;6:29427. doi: 10.1038/srep29427.

IF 4,259 MNiSW 40

Indywidualny wkład własny szacuję na 65%

6. Kraszewska MD, **Dawidowska M**, Kosmalska M, Sędek L, Grzeszczak W, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M; Polish Pediatric Leukemia Lymphoma Study Group (PPLLSG). BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients.

Blood Cells Mol Dis. 2013 Jan;50(1):33-8. doi: 10.1016/j.bcmed.2012.09.001. Epub 2012 Oct

IF 2,331 MNiSW 20

Indywidualny wkład własny szacuję na 40%

**autor korespondujący*

łączna punktacja prac włączonych do cyklu:

IF 27,177

MNiSW 200 (300, wg. punktacji proponowanej od 2019)

Szczegółowe omówienie indywidualnego wkładu własnego w powstanie wymienionych prac przedstawiam w Załączniku nr 4 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki)

Omówienie celu naukowego cyklu prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Przedmiotem mojej pracy badawczej jest dziecięca ostra białaczka limfoblastyczna (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL), heterogeny nowotwór hematologiczny wywodzący się z prekursorów linii limfoidalnej. Jest to najczęstszy typ białaczki występującej u dzieci i jednocześnie najczęstszy nowotwór wieku dziecięcego. Rocznie w Polsce ALL rozpoznawana jest u ~250 dzieci. Podtyp T-ALL (*T-cell acute lymphoblastic leukemia*) wywodzi się z prekursorów limfocytów T (tymocytów) dojrzewających w grasicy, zaś podtyp BCP-ALL (*B-cell precursor ALL*) powstaje z prekursorów limfocytów B, podlegających różnicowaniu w szpiku kostnym. Częstość obu podtypów to odpowiednio ~15% i ~85% wszystkich przypadków ALL u dzieci [1]. W swojej pracy naukowej prowadziłam badania dotyczące obu podtypów tej białaczki, w ostatnich latach koncentrując się na białaczce T-ALL [2].

Transformacja białczkowa zachodzi na drodze akumulacji i kooperacji licznych nieprawidłowości genetycznych i epigenetycznych. Prowadzi to do zaburzenia procesów kluczowych dla rozwoju prawidłowych prekursorów limfocytów, takich jak wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnałów, cykl komórkowy, apoptoza, różnicowanie. W efekcie dochodzi do zablokowania dojrzewania komórek i ich nadmiernej proliferacji. Komórki białaczki ALL (blasty ALL), zachowując naturalną dla limfocytów zdolność migracji w obrębie układu krwionośnego i limfatycznego, z pierwotnego miejsca powstania (szpik w BCP-ALL; grasica w T-ALL) dokonują ekspansji do innych lokalizacji. Blasty ALL są zatem obecne we krwi obwodowej oraz w szpiku kostnym (w T-ALL na drodze wtórnego zajęcia szpiku). Intensywny rozplam komórek białczkowych w szpiku prowadzi do upośledzenia jego funkcji hematopoetycznej i niedoboru prawidłowych komórek krwi, zarówno z linii limfoidalnej, jak i mieloidalnej. Wszelkie konsekwencje tych niedoborów, jak upośledzenie odporności, anemia, zaburzenia hemostazy, ujawniają się w postaci niespecyficznym symptomów białaczki. Bardziej specyficzne objawy ALL wynikają z zajęcia przez komórki białczkowe węzłów chłonnych, śledziony, a u pacjentów płci męskiej możliwe jest też zajęcie jąder. Występujące u części pacjentów zajęcie centralnego układu nerwowego prowadzi do wystąpienia symptomów neurologicznych i jest czynnikiem złej prognozy.

Do rozwoju ALL może dojść na dowolnym etapie złożonego procesu dojrzewania prekursorów limfoidalnych, co stanowi jedną z przyczyn znacznej heterogenności tej białaczki. Blok różnicowania prekursorów limfocytów (*maturation arrest*) jest do pewnego stopnia odzwierciedlony w klasyfikacji immunofenotypowej ALL. Zgodnie z klasyfikacją European Group for Immunological Classification of Leukemias (EGIL), w BCP-ALL wyróżnia się trzy podtypy immunofenotypowe, a w T-ALL aż pięć [3]. Podtypy EGIL identyfikowane są przy pomocy cytometrii przepływowej, na podstawie ekspresji określonych antygenów zewnątrz i wewnątrzkomórkowych. Należy podkreślić, że choć klasyfikacja EGIL jest powszechnie stosowana, jej wartość prognostyczna jest jak dotąd nieustalona. Ponadto profil genetyczny poszczególnych podtypów EGIL nie został jak dotąd dostatecznie scharakteryzowany. W jednej z prac włączonych do cyklu habilitacyjnego podejmuję zagadnienie charakterystyki podtypów

immunofenotypowych T-ALL na poziomie transkryptomu miRNA (1/ Dawidowska et al. Neoplasia 2019).

Prócz heterogenności immunofenotypowej, ALL charakteryzuje się znaczną heterogennością na poziomie genetycznym. Spektrum nieprawidłowości genetycznych występujących w ALL jest stosunkowo dobrze poznane, a szczególnie postęp w tej dziedzinie dokonał się dzięki zastosowaniu technik wysokoprzepustowych, w tym sekwencjonowania nowej generacji. Prace opublikowane w ostatnich latach, wykorzystujące macierze ekspresyjne [4], macierze do analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) [5], sekwencjonowanie całego eksomu (*whole exome sequencing*, WES) [6] oraz sekwencjonowanie transkryptomu (*mRNA-sequencing*) [7] istotnie uzupełniły obraz heterogenności genetycznej ALL. Jak dotąd główny obszar zainteresowania grup badawczych stanowiła kodująca część genomu, zaś niekodująca część genomu, w tym niekodujące RNA, to obszar stosunkowo najmniej poznany w przypadku ALL. Identyfikacja transkryptomu miRNA w białaczce T-ALL jest głównym celem pracy włączonej do cyklu habilitacyjnego (1/ Dawidowska et al. Neoplasia 2019).

U większości pacjentów z ALL przy rozpoznaniu identyfikowane są aberracje chromosomowe (głównie translokacje, delecje i aneuploidie) oraz liczne zmiany submikroskopowe (mutacje i zmiany liczby kopii genów obejmujące pojedynczy gen, jego część bądź kilka genów). Z badań z udziałem bliźniąt monozygotycznych z ALL oraz z badań dotyczących ewolucji klonalnej ALL wynika, że aberracje chromosomowe pojawiają się jako pierwsze, stanowią czynniki inicjujące leukemogenezę, lecz w większości przypadków nie są wystarczające do rozwoju białaczki (wyjątek stanowią rearanżacje genu *MLL* w niemowlęcej ALL) [8]. Zmiany submikroskopowe są wtórne do aberracji chromosomowych i niezbędne do rozwoju ALL, choć tylko część z nich ma bezpośredni wpływ na leukemogenezę (*driver mutations*), a inne stanowią efekt niestabilności genomu komórek białaczkowych i ewolucji klonalnej (*passenger mutations*). Zarówno aberracje chromosomowe, jak i mutacje i zmiany liczby kopii prowadzą do zaburzenia funkcji kluczowych elementów ścieżek odpowiedzialnych za dojrzewanie prekursorów limfocytów, powodując blok różnicowania, oraz do aktywacji onkogenów i zniesienia funkcji genów supresorowych, powodując zaburzenia apoptozy, cyklu komórkowego i w efekcie nadmierną proliferację. Wśród aberracji genetycznych obserwowanych w ALL wymienić można zarówno zmiany występujące powszechnie w wielu innych nowotworach (np. inaktywujące mutacje i delecje genu *TP53* i genu *PTEN*, aktywujące mutacje genów ścieżki JAK-STAT), jak i zmiany specyficzne dla ALL, głównie dotyczące czynników transkrypcyjnych istotnych dla prawidłowego różnicowania prekursorów linii B i T.

Do najczęstszych zmian genetycznych w BCP-ALL należą hiperdiploidia (występująca u ~20% pacjentów) oraz translokacje chromosomowe *t(12;21)/ETV6-RUNX1* (~20%), *t(1;19)/TCF3-PBX* (~5%), *t(9;22)/BCR-ABL1* (<5%) oraz rearanżacje genu *MLL* w locus 11q23 z różnymi genami partnerskimi (~5%) [9]. Spośród zmian submikroskopowych wymienić należy przede wszystkim inaktywujące mutacje i delecje dotyczące genu *IKZF1* kodującego czynnik transkrypcyjny IKAROS, występujące u ~15% pacjentów [10]. Zmiany te są typowe dla podtypu ALL wysokiego ryzyka, z obecnością *BCR-ABL1* oraz dla pacjentów z tzw. grupy *BCR-ABL1-like* (brak transkryptu fuzyjnego, ale zbliżony profil ekspresji genów do podtypu z obecnością fuzji i podobnie niekorzystne rokowanie). Większość z wymienionych zmian genetycznych ma

w przypadku BCP-ALL znaczenie prognostyczne i jest ujęta w nowoczesnych protokołach terapeutycznych ALL, jako czynniki stanowiące podstawę do identyfikacji grup ryzyka i stratyfikacji leczenia.

Podtyp T-ALL, z uwagi na niższą częstość niż BCP-ALL i większą heterogenność, jest nadal słabiej poznany i stanowi obiekt intensywnych badań prowadzonych przez kilkanaście grup badawczych na świecie. Do aberracji typowych dla T-ALL należą rearanżacje międzychromosomowe i wewnątrzchromosomowe prowadzące do onkogennej aktywacji genów kodujących czynniki transkrypcyjne specyficzne dla linii limfocytów T, np. *TAL1*, *TAL2*, *LYL1* oraz do aktywacji genów kodujących białka tworzące kompleksy w tymi czynnikami transkrypcyjnymi, *LMO1* i *LMO2* [2]. Nieprawidłową ekspresję tej grupy genów obserwuje się u ~60% pacjentów z T-ALL. Ponadto, onkogennej aktywacji wskutek rearanżacji ulegają geny kodujące czynniki transkrypcyjne o szerszym zakresie działania niż udział w różnicowaniu limfocytów. Należą do nich geny *HOX* (*homeobox*) z grupy genów homeotycznych: *HOXA9*, *HOXA10*, *TLX1*, *TLX2*, *TLX3* (~25% w dziecięcej T-ALL), a także gen *MYC*. Onkogenna aktywacja tych genów wynika z ich rearanżacji do loci genów kodujących receptory limfocytów T (*T-cell receptors*, TCR: *TCRA*, *TCRD* i *TCRB*) i przeniesienia ich pod kontrolę wysoce aktywnych promotorów i wzmacniaczy genów TCR. Inny mechanizm aktywacji to powstawanie genów fuzyjnych o aktywności onkogenów (np. *MLL-ENL*; częstość ~5%). W T-ALL obserwuje się również utratę funkcji czynników transkrypcyjnych o aktywności genów supresorowych, wskutek mutacji inaktywujących i delecji (np. *WT1*, *RUNX1*, *LEF1*; częstość 10-20%). Na obraz genetyczny T-ALL składają się też zmiany powodujące onkogenną aktywację ścieżki NOTCH1, przede wszystkim aktywujące mutacje genu *NOTCH1* (częstość >60%) oraz inaktywujące mutacje genu *FBXW7* (~30%). Fizjologicznie ścieżka NOTCH1 jest niezbędna do prawidłowego różnicowania i rozwoju wczesnych prekursorów limfocytów T: NOTCH1 funkcjonuje jako receptor transbłonowy i czynnik transkrypcyjny, zaś białko FBXW7 jest zaangażowane w degradację wewnątrzkomórkowej podjednostki NOTCH1 i funkcjonuje jako negatywny regulator tej ścieżki. Ponadto, do częstych w T-ALL aberracji genetycznych należą delecje locus 9p21, obejmujące geny *CDKN2A* i *CDKN2B* (>70%), kodujące inhibitory kinaz zależne od cyklin, oraz delecje locus 13q14.2, powodujące utratę genu *RB1*, co skutkuje zaburzeniem kontroli cyklu komórkowego. Kolejną grupę nieprawidłowości genetycznych stanowią mutacje i aberracje chromosomowe zaburzające funkcjonowanie kluczowych ścieżek wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, zarówno tych o znaczeniu specyficznym dla linii limfoidalnej (np. aktywujące mutacje genu receptora IL-7, *IL7R*; ~10%), jak i te o kluczowym znaczeniu dla wielu typów komórek (np. inaktywujące mutacje i delecje genu *PTEN*, ~15%; aktywujące mutacje genów *RAS*, <5% w T-ALL). Badania ostatnich lat wskazały dodatkowo na udział w patogenezie T-ALL mutacji i delecji dotyczących genów kodujących białka zaangażowane w zmiany konformacji chromatyny (np. *PHF6*, *EZH2*; 10-40% w T-ALL) oraz genów białek rybosomalnych i genów białek zaangażowanych w proces translacji (np. *RPL10*, ~5%) [6].

Należy podkreślić, że w przypadku T-ALL, inaczej niż w BCP-ALL, jak dotąd żadne z czynników genetycznych nie zostały powszechnie wprowadzone do schematów stratyfikacji terapii. Wynika to z niższej częstości i większej heterogenności T-ALL (mniej liczne i bardziej heterogenne grupy pacjentów badane do tej pory w skali świata). Zagadnienie identyfikacji genetycznych czynników prognostycznych w T-ALL podjęto w dwóch pracach włączonych

do cyklu habilitacyjnego: **(6/ Kraszewska et al. Blood Cells Mol Dis. 2013)**, w której jestem drugim autorem, oraz w pracy stanowiącej kontynuację tych badań **(2/ Szarzyńska-Zawadzka et al. Am J Hematol. 2019)**, w której pełnię rolę autora senioralnego.

Badania ostatnich lat pokazują, że istotną rolę w rozwoju i progresji chorób nowotworowych, w tym nowotworów hematologicznych, pełnią miRNA [11]. Te krótkie niekodujące RNA, zaangażowane w negatywną regulację ekspresji genów na etapie post-translacyjnym, mogą pełnić funkcję onkogenów lub supresorów transformacji nowotworowej. Onkogenne miRNA, których genami docelowymi są geny supresorowe, ulegając podwyższonej ekspresji w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki prawidłowej, powodują nadmierne wyciszenie ekspresji supresorów. Supresorowe miRNA, ulegające obniżonej ekspresji w tkance nowotworowej, powodują niedostateczne wyciszenie ekspresji onkogenów, które są ich genami docelowymi. Analiza ekspresji miRNA, połączona z identyfikacją ich genów docelowych *in silico*, potwierdzona badaniami funkcjonalnymi *in vitro*, pozwala identyfikować nowe mechanizmy patogenezy ALL oraz nowe potencjalne cele terapii. Ponadto, miRNA ulegające specyficznej ekspresji w określonych podtypach białaczki mogą potencjalnie przyczynić się do poprawy klasyfikacji ALL. Intensywnym obszarem badań jest również potencjalne wykorzystanie miRNA jako markerów prognostycznych i markerów progresji choroby. Analiza ekspresji miRNA, identyfikacja ich genów docelowych i ich potencjalnego zaangażowania w patogenezę białaczki T-ALL stanowią w ostatnich latach główny obszar mojej pracy badawczej. Do cyklu habilitacyjnego włączone zostały trzy prace podejmujące ten problem badawczy: dwie prace oryginalne **(1/ Dawidowska et al. Neoplasia 2019)**, **(3/ Drobna et al. Int J Mol Sci. 2018)** oraz praca przeglądowa **(4/ Drobna et al. Blood Rev. 2018)**; w dwóch ostatnich pracach pełnię rolę autora senioralnego.

Na tle innych nowotworów, dziecięca ALL stanowi przykład spektakularnej poprawy wyników leczenia w perspektywie ostatnich kilkadziesiąt lat. Postęp ten możliwy był dzięki ciągłej modyfikacji protokołów terapeutycznych, ale również dzięki coraz bardziej wyrażonej idei personalizacji leczenia, tj. dostosowaniu intensywności i sposobu leczenia do indywidualnego profilu biologicznego i genetycznego pacjenta. Należy przy tym podkreślić, że w ideę personalizacji leczenia wpisuje się zarówno analiza cech komórek białaczkowych pacjenta (nieprawidłowości genetyczne, epigenetyczne, immunofenotyp blastów, wrażliwość blastów na leczenie), jak również cech prawidłowych komórek pacjenta (m.in. germinalne warianty polimorficzne genów zaangażowanych w odpowiedź na leczenie).

Najbardziej wiarygodną metodę oceny odpowiedzi na leczenie ALL stanowi wykrywanie obecności przetrwałych komórek białaczkowych (tzw. minimalnej choroby resztkowej; *minimal residual disease*, MRD) i ocena dynamiki redukcji MRD w określonych punktach czasowych leczenia [12]. Należy jednak podkreślić, że ocena MRD możliwa jest dopiero w czasie trwania leczenia. Dlatego wciąż w ALL poszukuje się genetycznych czynników prognostycznych, co ważne, dostępnych analizie już przy rozpoznaniu choroby, w tym czynników, które skorelowane z oceną MRD podniosą jej wartość prognostyczną. Prócz wspomnianych wcześniej prac dotyczących poszukiwania mutacji i zmian liczby kopii genów o potencjalnej wartości prognostycznej w T-ALL, do cyklu habilitacyjnego włączono pracę mającą na celu identyfikację potencjalnych czynników prognostycznych w BCP-ALL **(5/ Dawidowska et al. Sci Rep. 2016)**.

Celem tej pracy była identyfikacja germinalnych wariantów polimorficznych genów, wykazujących asocjację z obecnością MRD w trakcie leczenia.

Przy zastosowaniu obecnych schematów identyfikacji grup ryzyka i protokołów leczenia, możliwe jest uzyskanie trwałej remisji (>5-letniej) w przypadku ~85% dzieci z ALL. Wciąż jednak u znacznego odsetka dzieci (~15%) leczenie kończy się niepowodzeniem na skutek agresywnego postępu białaczki, w wyniku wczesnych powikłań leczenia, bądź na skutek wystąpienia wznowy choroby. Wznowa ALL stanowi główną przyczynę śmierci dzieci z chorobą nowotworową. Należy przy tym podkreślić, iż wyniki leczenia wznowy ALL są znacznie gorsze w porównaniu do wyników leczenia choroby pierwotnej. Wskutek ewolucji klonalnej, wynikającej z niestabilności genetycznej intensywnie proliferujących komórek białaczkowych oraz z presji selekcyjnej (m.in. w postaci zastosowanego dotąd leczenia) wznowa powstaje z rozplemu najbardziej opornych komórek. Leczenie wznowy wymaga zatem zastosowania alternatywnych leków i form terapii. Również pod tym względem T-ALL stanowi szczególne wyzwanie, gdyż obecne możliwości terapeutyczne wznowy T-ALL są mniej liczne i mniej skuteczne w porównaniu do opcji leczenia wznowy BCP-ALL. Konieczne jest więc dalsze poznawanie podłoża molekularnego ALL, w szczególności podtypu T-ALL, celem poszerzenia wiedzy na temat patomechanizmów tej choroby oraz identyfikacji nowych czynników prognostycznych i nowych celów terapeutycznych.

Cel naukowy cyklu prac

We wprowadzeniu zarysowałam obraz dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej, która wciąż stanowi wyzwanie dla klinicyстів i dla badaczy. Wskazałam obszary, których dotyczą prowadzone przeze mnie badania, a których opublikowane wyniki przedstawiam jako szczególne osiągnięcie naukowe w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Prace wybrane do cyklu dotyczą różnych aspektów badań podstawowych i translacyjnych w białaczkach ALL, w szczególności w podtypie T-ALL.

Nadrzędnym celem prezentowanych prac jest poznanie podłoża molekularnego ALL i przeniesienie tej wiedzy na poziom aplikacyjny, dla realizacja idei personalizacji leczenia ALL.

Główne cele badań podjętych w ramach prac wybranych do cyklu to:

1. Identyfikacja transkryptomu miRNA w białaczkach T-ALL, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji, jako obszar poszukiwania nowych mechanizmów patogenezы T-ALL i nowych potencjalnych celów terapeutycznych.
2. Identyfikacja miRNA stanowiących w T-ALL optymalne endogenne kontrole do analizы ekspresji miRNA w RT-qPCR, jako podstawa wprowadzenia profilowania miRNA na poziom badań aplikacyjnych.
3. Identyfikacja mutacji i zmiany liczby kopii genów istotnych dla patogenezы T-ALL, pod kątem ich potencjalnego wykorzystania jako czynniki prognostyczne.

4. Identyfikacja germinalnych wariantów polimorficznych genów, wykazujących asocjację z obecnością przetrwałych komórek białaczkowych (MRD), jako potencjalnych czynników wspomagające ocenę odpowiedzi na leczenie ALL.

Omówienie prac włączonych do cyklu

Dawidowska M*, Jaksik R, Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalska M, Sędek Ł, Machowska L, Lalik A, Lejman M, Ussowicz M, Kałwak K, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M. *Comprehensive investigation of miRNome identifies novel candidate miRNA-mRNA interactions implicated in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Neoplasia 2019 March; 21(3): 294-310. doi.org/10.1016/j.neo.2019.01.004.*

Identyfikacja i charakterystyka transkryptomu miRNA w dziecięcej T-ALL, w tym identyfikacja profilu ekspresji miRNA różnicującego podtypy T-ALL, ale przede wszystkim identyfikacja nowych interakcji miRNA-mRNA o znaczeniu w patogenezie tej białaczki jest przedmiotem badań które obecnie prowadzę. Badania realizowane są w ramach projektu „Sekwencjonowanie nowej generacji transkryptomu miRNA i badania funkcjonalne in vitro w celu poznania patomechanizmów i heterogenności dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej z limfocytów T (T-ALL)” (grant OPUS, którego jestem głównym wykonawcą). W stosunkowo licznej grupie pacjentów z T-ALL (34 przypadki) i w 5 próbkach kontrolnych (prawidłowe dojrzałe limfocyty T) przeprowadziliśmy sekwencjonowanie wszystkich miRNA ulegających ekspresji w badanym materiale, wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji (miRNA-seq). Przeprowadziliśmy kompleksową charakterystykę transkryptomu miRNA w T-ALL, identyfikując 61 miRNA o różnicowej ekspresji w T-ALL w porównaniu do kontroli (23 miRNA ulegające nadekspresji i 38 miRNA ulegających obniżonej ekspresji w porównaniu do kontroli). Wśród tych miRNA znajdują się zarówno miRNA o znanej już roli onkogennej i supresorowej w T-ALL, ale też wiele miRNA, których rola w patogenezie T-ALL nie jest dotąd znana.

Ponadto, w próbkach T-ALL scharakteryzowaliśmy ekspresję izomiRów, czyli izoform miRNA różniących się sekwencją i długością sekwencji od formy kanonicznej o kilka nukleotydów, potencjalnie regulujących ekspresję odmiennych mRNA docelowych. Wykazaliśmy znaczną heterogenność ekspresji izomiRów w dziecięcej T-ALL: ~80% miRNA ulegających ekspresji w badanych próbkach było reprezentowane przez znaczną liczbę izoform (nawet 100 izomiRów/miRNA). Znaczną heterogenność obserwowaliśmy także wtedy, gdy zawęziliśmy analizę wyłącznie do miRNA ulegających najpowszechniej ekspresji w badanych próbkach T-ALL (przynajmniej 4 odczyty w >60% badanych próbek T-ALL): dla blisko 70% miRNA stwierdziliśmy ekspresję nawet do 10 izoform. Kolejnym obszarem charakterystyki transkryptomu miRNA w dziecięcej T-ALL, była identyfikacja nowych miRNA, dotąd nieraportowanych w bazach danych miRNA. W badanej grupie pacjentów z T-ALL zidentyfikowaliśmy 254 kandydujące nowe miRNA, z których 10 ulegało różnicowej ekspresji między T-ALL a kontrolami (wszystkie ulegały nadekspresji w T-ALL, stanowiąc nowe potencjalne onkogenne miRNA w tej białaczce).

Jak dotąd wiedza na temat transkryptomu miRNA w dziecięcej T-ALL jest znikoma (zaledwie jedna publikacja dotycząca miRNA-seq, w grupie 48 pacjentów z T-ALL) [13]. Stawiając sobie za

cel poszerzenie wiedzy na temat obrazu ekspresji miRNA w tej białaczce, przeprowadziliśmy dodatkowo łączną analizę naszych wyników miRNA-seq dla 34 pacjentów z T-ALL i surowych danych miRNA-seq dla 48 próbek T-ALL, dostępnych w bazie GEO (GSE89978) [13]. W analizie zastosowaliśmy ten sam zestaw metod i narzędzi bioinformatycznych, którym posłużyliśmy się w pierwotnej analizie naszych danych miRNA-seq. Dla minimalizacji efektów wynikających z technicznych różnic między eksperymentami, łączną analizę obu zestawów danych poprzedziliśmy korektą tzw. *batch effect*. Łączna analiza tych zbiorów danych pozwoliła na charakterystykę transkryptomu miRNA w grupie 82 pacjentów z T-ALL, największej grupie analizowanej do tej pory. Zidentyfikowaliśmy pulę miRNA ulegających najwyższej ekspresji w próbkach T-ALL (*top 10 highly expressed miRNAs*): hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-181a-5p; hsa-let-7f-5p; hsa-miR-26a-5p; hsa-let-7a-5p/7c-5p; hsa-miR-128-3p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-148a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-30d-5p. Ta lista miRNA wykazywała znaczną zbieżność z analogiczną listą miRNA, którą określiliśmy w grupie 34 pacjentów z T-ALL. Ponadto, w łącznej analizie obu zbiorów danych zidentyfikowaliśmy miRNA ulegające różnicowej ekspresji w T-ALL w stosunku do kontroli: 103 miRNA (11 miRNA ulegających nadekspresji w T-ALL oraz 92 miRNA o obniżonej ekspresji, znane i potencjalne nowe onkogenne i supresorowe miRNA). Wskazaliśmy też pulę miRNA, których nadekspresja i obniżona ekspresja w T-ALL widoczna była przynajmniej w dwóch z trzech analizowanych zbiorach danych (nasze oryginalne wyniki miRNA-seq, dane miRNA-seq opublikowane przez Wallaert et al. [13] oraz łączna analiza obu zbiorów danych). Do miRNA ulegających nadekspresji w tych zbiorach danych (potencjalne onkogeny w T-ALL) należą: hsa-miR-20b-5p; hsa-miR-153-3p; hsa-miR-625-5p; hsa-miR-466, hsa-miR-374b-3p; hsa-miR-3913-5p; hsa-miR-181d-5p. Wśród kilkunastu miRNA ulegających obniżonej ekspresji w T-ALL (potencjalne genu supresorowe) zwróciliśmy szczególnie uwagę na hsa-miR-3909 i hsa-miR-1275, których profil ekspresji był zbieżny we wszystkich trzech zbiorach danych. W ten sposób wskazaliśmy na miRNA potencjalnie istotne dla patogenezy T-ALL.

Celem wytypowania miRNA do dalszych badań funkcjonalnych, opierając się na naszych wynikach miRNA-seq, przeprowadziliśmy kompleksową analizę *in silico*, wykorzystując 8 algorytmów do predykcji genów docelowych dla 61 miRNA ulegających różnicowej ekspresji w T-ALL względem kontroli. Spośród 7609 zidentyfikowanych mRNA docelowych, zawężiliśmy analizę do 225 mRNA, jednakowo przewidzianych przez 5/8 zastosowanych algorytmów, jako sekwencje regulowane przez miRNA. Dla tych mRNA wykonaliśmy analizę nadreprezentacji w procesach biologicznych, w oparciu o bazy Gene Ontology (GO) i Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Analiza nadreprezentacji wskazała szereg procesów potencjalnie istotnych dla patogenezy T-ALL, w które zaangażowane są mRNA regulowane przez badane przez nas miRNA; m.in.: transdukcja sygnałów zależna od fosforylacji, ścieżka sygnałowa interleukiny 6, negatywna regulacja ścieżki mTOR, pozytywna regulacja apoptozy, regulacja wzrostu komórek i regulacja fosforylacji. W pracy szczegółowo przedyskutowano potencjalne zaangażowanie badanych miRNA i ich genów docelowych, w kontekście najważniejszych procesów wynikających z analizy nadreprezentacji. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na dwa z tych procesów: negatywna regulacja ścieżki mTOR oraz pozytywna regulacja apoptozy. Wszystkie miRNA (hsa-miR-130a-3p; hsa-miR-363-3p; hsa-miR-18b-5p; hsa-miR-130b-3p), których docelowe mRNA wytypowane w naszej analizie ulegają nadreprezentacji w procesie

negatywnej regulacji ścieżki mTOR (*FNIP1*, *HIF1A*, *PRKAA1*, *SESN3*, *SH3BP4*, *TSC1*), ulegają nadekspresji w badanych próbkach T-ALL. Nadekspresja tych miRNA, a w konsekwencji obniżona ekspresja ich docelowych mRNA, zaangażowanych w negatywną regulację ścieżki mTOR, może przyczyniać się do nadmiernej aktywności tej ścieżki, istotnej między innymi dla wzrostu, proliferacji i przeżycia komórek [14]. Nasze wyniki wskazują także na potencjalne cele terapeutyczne w T-ALL, np. inhibicja ścieżki mTOR przez inhibitory takie jak sirolimus i everolimus, a potencjalnie także inhibicja miRNA ulegających nadekspresji i prowadzących do aktywacji tej ścieżki.

Drugim procesem, który zwrócił naszą szczególną uwagę jest pozytywna regulacja apoptozy. Skupiliśmy się na miRNA potencjalnie regulujących apoptozę i ulegających nadekspresji w T-ALL. Wyciszenie ekspresji ich docelowych mRNA, dla których wykazaliśmy w analizie nadreprezentacji potencjalny udział w pozytywnej regulacji apoptozy, może skutkować obniżeniem zdolności komórek do apoptozy. Co ważne, trzy spośród tych miRNA, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-18b-5p, należą do wspólnego klastra miRNA, hsa-mir-106a-363, będącego paralogiem prototypicznego onkogenego klastra hsa-mir-17-92, którego znaczenie wykazano w wielu nowotworach [15]. Ponieważ rola klastra hsa-mir-106a-363 w T-ALL nie jest, jak dotąd, dobrze poznana wybraliśmy te miRNA do testów funkcjonalnych. Potwierdziliśmy *in vitro* bezpośrednio oddziaływanie tych miRNA z kilkunastoma docelowymi mRNA biorącymi potencjalnie udział w regulacji apoptozy. W pracy ujęliśmy wyniki testów lucyferazowych dla czterech oddziaływań miRNA z 3'UTR mRNA: hsa-miR-363-3p z *LATS2* i z *PTEN*; hsa-miR-20b-5p z *SOS1* i *PTEN*. Oddziaływania te nie były dotąd potwierdzone eksperymentalnie i/lub nie były analizowane w kontekście znaczenia w patogenezie T-ALL.

Ponadto, w pracy prezentujemy wyniki dotyczące profilu ekspresji miRNA, który różnicuje poszczególne podtypy immunofenotypowe T-ALL. W analizie ujęliśmy jako kontrole również tymocyty (prekursory limfocytów T). Wykazaliśmy, że próbki T-ALL należące do podtypu EGIL II (*immature*) wykazują zbliżony profil ekspresji miRNA do wczesnych prekursorów komórek T (tymocytów CD34+), podczas gdy próbki z podtypu EGIL III (*cortical*) i EGIL IV (*mature*) grupują się w analizie nienadzorowanej z bardziej dojrzałymi tymocytami (CD4+CD8+CD3+). Jest to pierwsze doniesienie w literaturze przedstawiające charakterystykę podtypów immunofenotypowych T-ALL na poziomie transkryptomu miRNA.

Praca stanowi kompleksową analizę transkryptomu miRNA w T-ALL, a poprzez predykcję docelowych mRNA i ich udziału w procesach biologicznych, wskazuje nowe interakcje miRNA-mRNA, dotąd nieopisane w kontekście potencjalnego znaczenia dla patogenezy T-ALL. Surowe dane z miRNA-seq zostały zdeponowane w bazie ArrayExpress (E-MTAB-7446). Publikacja zawiera też obszerny materiał uzupełniający, m.in. tabelę zawierającą wyniki predykcji genów docelowych dla różnicujących miRNA i analizy nadreprezentacji w procesach GO i KEGG. Wyniki zaprezentowane w pracy stanowią obszerny źródło wiedzy na temat ekspresji miRNA w T-ALL i punkt wyjścia do analiz funkcjonalnych. Obecnie prowadzimy testy funkcjonalne, oceniające apoptozę, cykl komórkowy i proliferację komórek linii T-ALL po inhibicji i mimikrze miRNA z klastra hsa-mir-106a-363. Wyniki te będą jednak przedmiotem przyszłych publikacji.

Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dąca-Roszak P, Kosmalska M, Jaksik R, Witt M, Dawidowska M*. *Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2018 Sep 20;19(10). pii: E2858. doi: 10.3390/ijms19102858.*

Zagadnienia ekspresji miRNA w TALL dotyczy kolejna praca włączona do cyklu. Praca powstała w odpowiedzi na brak danych literaturowych, dotyczących miRNA ulegających stabilnej ekspresji w komórkach linii T, które mogłyby stanowić optymalne endogenne kontrole do analizy ekspresji miRNA metodą RT-qPCR (odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym). Z problemem tym zetknęliśmy się przystępując do walidacji wyników uzyskanych w miRNA-seq. Ze względu na różnice w długości cząsteczek RNA, wpływające na różnice w wydajności izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji i amplifikacji, nie jest właściwe, aby do normalizacji ekspresji miRNA stosować inne rodzaje RNA (mRNA, czy nawet małe jądrowe RNA i małe jąderkowe RNA) [16]. Właściwym podejściem jest stosowanie endogennych miRNA, ulegających stabilnej i względnie wysokiej ekspresji w badanym materiale. Brak jednak było w literaturze danych na ten temat dla T-ALL. Przystępując do identyfikacji takich miRNA dla celów walidacji naszych wyników z miRNA-seq, zdecydowałam o rozszerzeniu zakresu analizy, tak, aby wyniki prezentowane w tej pracy były przydatne dla badaczy zajmujących się ekspresją miRNA w różnych komórkach z linii T. Do analizy włączyliśmy zatem różne rodzaje materiału, tj. RNA izolowany z: prawidłowych dojrzałych limfocytów T ze szpiku, z tymocytów (CD34+ i CD4+CD8+CD3+), z próbek pacjentów z T-ALL oraz z 6 linii T-ALL hodowanych w różnych warunkach (z antybiotykiem i bez antybiotyku, z wczesnego i późnego pasażu, z trzech niezależnych hodowli dla danej linii). W tym szerokim panelu badanego materiału przeprowadziliśmy RT-qPCR i oceniliśmy ekspresję 10 miRNA, wytypowanych wstępnie w oparciu o analizę stabilności ekspresji w naszych danych z miRNA-seq. Stabilność 10 kandydujących kontrolnych miRNA oceniliśmy kompleksowo z użyciem 4 algorytmów do analizy stabilności ekspresji (NormFinder, geNorm, BestKeeper oraz metodą porównania $\Delta\Delta C_T$). W ten sposób wytypowaliśmy 3 miRNA (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-25-3p oraz hsa-let-7a-5p), których przydatność jako endogennych kontrolnych miRNA wykazaliśmy w RT-qPCR, używając ich do normalizacji ekspresji kilku miRNA ulegających nadekspresji w T-ALL (pozytywna walidacja wyników miRNA-seq). Warto podkreślić, że w przypadku hsa-let-7a-5p wykazaliśmy (w analizie miRNA-seq) występowanie tego miRNA, w próbkach T-ALL i w prawidłowych dojrzałych limfocytach T, wyłącznie w formie kanonicznej. Brak ekspresji izoform w T-ALL i w prawidłowym szpiku oraz wysoka stabilność ekspresji w różnych komórkach z linii T, sprawiają że hsa-let-7a-5p jest szczególnie dobrym kandydatem jako endogenna kontrola.

Dodatkową wartością pracy jest zastosowany przez nas algorytm, bazujący na NormFinder, służący iteracyjnej analizie stabilności ekspresji miRNA w danych z miRNA-seq, i ustaleniu optymalnej liczby miRNA jako endogennych kontroli. Pokazaliśmy, że zastosowanie kombinacji 3 stabilnych miRNA pozwala uzyskać odpowiedni wskaźnik stabilności (*stability score*), a zwiększanie liczby miRNA powyżej 3 przekłada się na niewielki wzrost wskaźnika stabilności. Algorytm do iteracyjnej analizy stabilności miRNA (IterativeStability_v1.0.R). został napisany w języku programowania R, a plik zawierający kod tego algorytmu został udostępniony w materiałach uzupełniających do tej publikacji.

Zidentyfikowany przez nas panel 3 miRNA (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-25-3p oraz hsa-let-7a-5p) może służyć jako pierwszy wybór kandydujących kontrolnych miRNA do badań

ekspresji w RT-qPCR, w różnym materiale pochodzącym z linii limfocytów T. Jednocześnie w pracy podkreślamy, że stabilność kandydujących kontrolnych miRNA powinna zostać potwierdzona eksperymentalnie w danym układzie badawczym. Zaproponowana w pracy strategia identyfikacji takich stabilnych miRNA, w tym autorski algorytm do analizy stabilności ekspresji miRNA, są uniwersalne i mogą zostać wykorzystane również w innych układach badawczych, wykraczających poza komórki limfoidalne.

Należy podkreślić, że wybór optymalnych kontroli do analizy ekspresji miRNA w RT-qPCR jest szczególnie istotny w badaniach translacyjnych, których celem jest identyfikacja, walidacja i implementacja miRNA jako markerów diagnostycznych i prognostycznych. Stąd wyniki prezentowane w tej pracy mają również znaczenie dla przeniesienia badań ekspresji miRNA na poziom badań aplikacyjnych.

Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. Blood Rev. 2018 Nov;32(6):457-472. doi: 10.1016/j.blre.2018.04.003.*

Do cyklu włączona została także praca przeglądowa, stanowiąca obszerne omówienie zagadnień dotyczących miRNA w białaczce T-ALL. W pracy tej dokonujemy przeglądu aktualnej wiedzy na temat roli miRNA w regulacji ekspresji genów jako mechanizmu patogenezy chorób nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem T-ALL. Omawiamy kluczowe zagadnienia, takie jak: onkogenna i supresorowa rola miRNA, zaangażowanie miRNA w wielopoziomowe i złożone sieci zależności regulatorowych, w tym pętle regulatorowe (typu *feed-forward* i *feed-back*), istnienie tzw. efektu netto działania miRNA (*net effect*) oznaczającego, że wpływ miRNA na fenotyp komórek wynika z kooperatywnego działania wielu miRNA i ich docelowych mRNA. Podkreślamy także potrzebę zastosowania wielu uzupełniających się metod analitycznych i eksperymentalnych w badaniach roli miRNA w patogenezie chorób nowotworowych i przedstawiamy przegląd takich metod na przykładzie badań w T-ALL. Wreszcie koncentrujemy się na T-ALL i prezentujemy aktualny stan wiedzy na temat onkogennych i supresorowych miRNA w tej białaczce oraz ich potencjalnego wykorzystania miRNA jako markerów prognostycznych i markerów odpowiedzi na leczenie. Dyskutujemy także zagadnienie potencjalnego wykorzystania miRNA do poprawy klasyfikacji białaczek. Praca stanowi swego rodzaju obszerne merytoryczne uzupełnienie dwóch wcześniej opisanych prac włączonych do cykl habilitacyjnego. Pierwszą autorką tej i poprzedniej pracy jest doktorantka, nad którą sprawuję opiekę naukową; moja kandydatura na promotora pomocniczego będzie przedmiotem głosowania podczas otwarcia przewodu doktorskiego (planowana data: 5 marca 2019). W obu pracach pełnię rolę autora senioralnego.

Kraszewska MD, Dawidowska M, Kosmalska M, Sędek L, Grzeszczak W, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M; Polish Pediatric Leukemia Lymphoma Study Group (PPLLSG). **BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. Blood Cells Mol Dis. 2013 Jan;50(1):33-8. doi: 10.1016/j.bcnd.2012.09.001. Epub 2012 Oct 3.**

Szarzyńska-Zawadzka B, Kunz JB, Sędek Ł, Kosmalska M, Zdon K, Biecek P, Bandapalli OR, Kraszewska-Hamilton M, Jaksik R, Drobna M, Kowalczyk JR, Szczepański T, Van Vlierberghe P, Kulozik AE, Witt M, Dawidowska M*. **PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. Am J Hematol. 2019 Jan 7. doi: 10.1002/ajh.25396.**

Dwie kolejne prace włączone do cyklu habilitacyjnego dotyczą zagadnienia identyfikacji zmian genetycznych o potencjalnym znaczeniu prognostycznym w T-ALL. Praca opublikowana w roku 2019 stanowi kontynuację badań opublikowanych w roku 2013. Pierwszymi autorkami obu prac są doktorantki, nad którymi sprawowałam/sprawuję opiekę naukową. W przypadku przewodu doktorskiego mgr B. Szarzyńskiej-Zawadzkiej pełnię rolę promotora pomocniczego, a w publikacji włączonej do cyklu habilitacyjnego, której jest pierwszą autorką, pełnię rolę autora senioralnego.

Jak wspominałam we wprowadzeniu, w przypadku T-ALL żadne z analizowanych dotąd czynników genetycznych nie zostały powszechnie wprowadzone do praktyki klinicznej jako czynniki prognostyczne. Wartość prognostyczna niektórych z nich (np. aberracje genów *NOTCH1*, *FBXW7*, *PTEN*, *RAS*) jest przedmiotem intensywnej dyskusji w literaturze tematu. Niepewna wartość prognostyczna wymienionych czynników genetycznych, wynika najpewniej ze zmiennego znaczenia tych aberracji w kontekście różnych protokołów terapeutycznych, stosowanych w przypadku badanych dotąd grup pacjentów w różnych krajach Europy (np. mutacje genu *NOTCH1* wiązały się z korzystną prognozą w przypadku dzieci leczonych wg. protokołu ALL-BFM-2000 i ALL 97, ale obserwacji tej nie potwierdzono w przypadku protokołów DCOG, COALL i EORTC-CLG). Dodatkowo, niska częstość T-ALL i wysoka heterogenność tej białaczki, utrudnia prowadzenie takich badań.

W projekcie, którego efektem realizacji jest praca **Kraszewska, Dawidowska et al., Blood Cells Mol Dis. 2013** podjęliśmy się oceny częstości występowania mutacji kilkunastu genów kandydujących, wytypowanych w oparciu o dane literaturowe. Projekt nosił tytuł: „Wieloparametryczna analiza genetyczna, immunologiczna i molekularna ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek prekursorowych limfocytów T (T-ALL) - identyfikacja czynników prognostycznych i poprawa monitorowania efektów leczenia”; w tym wielośrodkowym projekcie byłam głównym wykonawcą w ośrodku poznańskim. W pracy włączonej do cyklu skupiliśmy się na przedstawieniu statusu mutacji czterech z tych genów, dwóch (*NOTCH1* i *FBXW7*) o uznanej roli w patogenezie T-ALL, choć niepewnej wartości prognostycznej, oraz dwóch (*BCL11B* i *FLT3*), których status mutacji i rola w T-ALL były w tamtym czasie mało poznane. Postawiliśmy sobie również za cel ocenę potencjału prognostycznego mutacji *NOTCH1* i *FBXW7*.

O znaczeniu ścieżki *NOTCH1* dla rozwoju prekursorów limfocytów T oraz o roli genu *FBXW7* w mechanizmie negatywnej regulacji tej ścieżki, wspominałam we wprowadzeniu. Wysoka częstość mutacji w badanych genach oraz kooperacyjny charakter tych aberracji w patogenezie T-ALL, skłoniły nas do podjęcia oceny ich wartości prognostycznej w protokole ALL-IC BFM 2002,

co do tej pory nie było przedmiotem żadnej publikacji. Gen *FLT3* (*fms-related tyrosine kinase 3*) koduje kinazę tyrozynową zaangażowaną w transdukcję sygnałów, niezbędną dla prawidłowej hematopoezy. Aktywujące mutacje genu *FLT3*, prowadzące do konstytutywnej aktywności tej kinazy, są częste w ostrej białaczce szpikowej i mają w tej białaczce wartość prognostyczną. W przypadku T-ALL, w tamtym czasie, istniały pojedyncze doniesienia na temat statusu mutacji *FLT3*. Ponadto postulowano, że kinaza FLT3 może stanowić potencjalny cel terapeutyczny w T-ALL (inhibitory kinaz tyrozynowych). Gen *BCL11B* koduje czynnik transkrypcyjny istotny dla różnicowania tymocytów na wczesnych etapach dojrzewania. Obecnie, częstość mutacji tego genu w T-ALL określa się na ~10%, mutacje mają charakter inaktywujący, a gen uważa się za gen supresji transformacji nowotworowej, choć geny i ścieżki podlegające kontroli *BCL11B* nie są dokładnie poznane. W momencie podjęcia realizacji projektu, częstość i charakter mutacji tego genu w T-ALL nie były znane, a w chwili publikacji omawianej pracy istniały zaledwie dwa doniesienia literaturowe na ten temat.

Grupa badana obejmowała 65 pacjentów z dziecięcą T-ALL, leczonych wg. protokołu ALL-IC BFM 2002. Analizę mutacji wykonaliśmy metodą amplifikacji fragmentów badanych genów (kodujących kluczowe domeny białek) i sekwencjonowaniem Sangera (eksony 9 i 10 genu *FBXW7*, eksony 26, 27, 28 i 34 genu *NOTCH1*, wszystkie cztery eksony genu *BCL11B*). Eksony 11 i 12 genu *FLT3* były amplifikowane metodą PCR, a następnie metodą elektroforezy oceniano występowanie aberracji w postaci wewnętrznej tandemowej duplikacji (*FLT3-ITD*). Częstości mutacji genów w badanej grupie wynosiły: 40% dla genu *NOTCH1*, 8% dla genu *FBXW7*, 3% dla genu *FLT3* i 2% w przypadku *BCL11B*. W pracy przedstawiamy dokładną charakterystykę wszystkich zidentyfikowanych zmian. Zidentyfikowaliśmy 9 nowych, dotąd nie opisanych mutacji: 8 w genie *NOTCH1* i 1 w genie *BCL11B*, a ich sekwencje zostały zdeponowane w GenBank. Obserwowane przez nas częstości mutacji pozostawały w zgodzie z ówczesnie raportowanymi częstościami, za wyjątkiem genu *BCL11B*, dla którego wykazaliśmy niższą częstość mutacji (analiza mutacji tego genu, z racji ograniczonej ilości materiału do badań została wykonana w mniejszej grupie 49 pacjentów). Podjęliśmy też próbę oceny potencjału prognostycznego analizowanych zmian w genie *NOTCH1* i *FBXW7* w kontekście protokołu terapeutycznego ALL-IC BFM 2002. Mieliśmy jednak świadomość, że czas obserwacji pacjentów jest stosunkowo krótki (~2 lata dla większości pacjentów), a grupa badana, choć dość liczna, jak na niską częstość występowania T-ALL, jednak stosunkowo niewielka dla potrzeb oceny wartości prognostycznej mutacji. Nie wykazaliśmy asocjacji mutacji z ocenianymi czynnikami klinicznymi i molekularnymi identyfikowanymi przy rozpoznaniu choroby (wiek, poziom białych krwinek, zajęcie centralnego układu nerwowego, obecność tzw. fenotypu CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*), ani z czynnikami ocenianymi w trakcie leczenia (status minimalnej choroby resztkowej mogliśmy ocenić jedynie w przypadku 11 pacjentów ze względu na limitującą ilość DNA dostępnego do badań).

Kontynuację i rozszerzenie tych badań stanowią wyniki opublikowane w pracy **Szarzyńska-Zawadzka et al. Am J Hematol. 2019**. W tej pracy skupiamy się na wartości prognostycznej aberracji genetycznych dotyczących genu *PTEN*, kodującego białko będące negatywnym regulatorem ścieżki PI3/AKT, która ulega nadmiernej aktywacji w wielu typach nowotworów. Jak dotąd wartość prognostyczna *PTEN* w dziecięcej T-ALL oceniana była przez kilka grup badawczych i dotyczyła pacjentów z leczonych wg. protokołów terapeutycznych AIEOP,

FRALLE2000T, COG, ALL-BFM 2000, GBTLI ALL-99, DCOG, COALL i protokołów Dana-Farber Cancer Institute. Prezentowane przez nas wyniki po raz pierwszy donoszą o wartości prognostycznej aberracji genu *PTEN* w kontekście protokołu terapeutycznego ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009. Warto podkreślić, że praca stanowi podsumowanie większego projektu (wyniki dotyczące aberracji genetycznych łącznie 24 genów zostały opublikowane w obszernych materiałach uzupełniających do tej publikacji).

Grupę badaną stanowiło 162 dzieci z T-ALL; mediana czasu obserwacji wynosiła 4.1 roku (5.5 w przypadku protokołu ALL IC-BFM 2002; 2.6 roku dla ALL IC-BFM 2009). W pracy zastosowaliśmy kilka metod do identyfikacji mutacji: (i) PCR i sekwencjonowanie Sangera do analizy mutacji w genach *NOTCH1* (eksony 26, 27, 34), *FBXW7* (eksony 9 i 10), *PTEN* (ekson 7), *WT1* (eksony 7 i 9), *IL7R* (ekson 6), *STAT5B* (ekson 16); (ii) metodę PCR i elektroforezę dla identyfikacji *FLT3-ITD* (eksony 11-12); (iii) analizę topnienia wysokiej rozdzielczości (*high resolution melt analysis*, HRM) połączoną z sekwencjonowaniem Sangera dla identyfikacji mutacji w genach *RUNX1* (eksony 1, 2, 3, 6), *PTEN* (eksony 5 i 6) oraz *DNMT3A* (eksony 8-23). Ponadto, prócz mutacji analizowaliśmy zmiany liczby kopii genów (*copy number alterations*, CNA). Do tego celu zastosowaliśmy metodę MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) dla wykrycia fuzji genów *SIL-TAL1* i *NUP214-ABL1* oraz oceny CNA genów *LEF1*, *CASP8AP2*, *MYB*, *EZH2*, *CDKN2A/B*, *MLL3*, *LMO1*, *LMO2*, *NF1*, *SUZ12*, *PTPN2*, *PHF6* oraz genu *PTEN*. Dodatkowo, dla walidacji wyników MLPA, przeprowadziliśmy sekwencjonowanie całogenomowe z niską głębokością pokrycia, 0.4× (*shallow whole genome sequencing*, sWGS).

Aberracje dotyczące genu *PTEN* (*PTEN.ABN*, tj. mutacje lub delecje) obserwowaliśmy u 20% pacjentów, mutacje *PTEN* u 9% pacjentów, a delecje *PTEN* u 16% pacjentów. W przypadku 8% pacjentów identyfikowaliśmy bialleliczną inaktywację genu *PTEN* (współwystępowanie mutacji i delecji). Inaktywacja *PTEN* wskutek wyłącznie mutacji (*PTEN.MUT*) występowała u 4% pacjentów, a wyłącznie wskutek delecji (*PTEN.DEL*) u 11% pacjentów. Wykazaliśmy, że występowanie aberracji genu *PTEN* (*PTEN.ABN*) jest czynnikiem złej prognozy u dzieci z T-ALL, leczonych wg. protokołów ALL IC-BFM: istotnie niższe prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia wolnego od zdarzeń (5y-EFS), 47% vs. 78%, u pacjentów bez aberracji *PTEN* oraz istotnie wyższe prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy (pCIR, 38% vs. 16%). Analizowaliśmy także, czy wartość prognostyczna jest zależna od rodzaju aberracji genu *PTEN*. Wykazaliśmy, że delecje genu *PTEN* (*PTEN.DEL*) wiążą się z istotnie krótszym 5y-EFS i istotnie wyższym ryzykiem wznowy, w porównaniu do braku aberracji (*PTEN.WT*). W przypadku mutacji genu (*PTEN.MUT*) obserwowaliśmy analogiczne zależności, jednak bez istotności statystycznej. Oceniliśmy także wartość prognostyczną badanych zmian, oddzielnie dla obu protokołów terapeutycznych. Aberracje genu (*PTEN.ABN*, *PTEN.DEL* i *PTEN.MUT*) były czynnikami niekorzystnej prognozy jedynie w przypadku protokołu ALL IC-BFM 2009, co potwierdza znaczenie schematu leczenia dla wartości prognostycznej badanych zmian. Co ciekawe, występowanie *PTEN.ABN* i *PTEN.DEL* wiązało się z krótszym czasem przeżycia w przypadku obu protokołów leczenia, a to, co stanowiło o wartości prognostycznej obserwowanej wyłącznie w protokole ALL-IC-BFM 2009, to fakt, że pacjenci *PTEN.WT* osiągnęli lepsze wyniki leczenia w tym protokole niż w ALL-IC-BFM 2002. W pracy oceniliśmy także, czy obecność aberracji genu *PTEN* wnosi dodatkową wartość prognostyczną w stosunku do oceny minimalnej choroby resztkowej (MRD), stanowiącej obecnie najbardziej wiarygodny czynnik prognostycznych w T-ALL. Wykazaliśmy, że obecność *PTEN.ABN*

pozwała wyróżnić w obrębie grup ryzyka, identyfikowanych w oparciu o poziom MRD w 15 dobie, podgrupy pacjentów o istotnie różnym 5y-EFS. Obserwacja ta dotyczyła zarówno grupy ryzyka wysokiego, jak i pośredniego. Warto podkreślić, że największy odsetek wznów T-ALL u dzieci odnotowuje się właśnie w grupie pośredniego ryzyka.

Wyniki prezentowanej pracy pozwalają wnioskować o wartości prognostycznej aberracji genu *PTEN* u pacjentów z T-ALL leczonych wg. protokołów ALL-IC BFM. Włączenie tych aberracji do oceny grupy ryzyka, w tym korelacja z oznaczeniami MRD, może stanowić element udoskonalenia obecnego systemu stratyfikacji terapii i przyczynić się do poprawy wyników leczenia T-ALL u dzieci. Ponadto, wyniki naszych badań wskazują pośrednio na zasadność badania inhibitorów ścieżki PI3/AKT, jako nowych celów terapeutycznych w T-ALL. (Praca została opublikowana jako list do edytora, jednak ma charakter pracy oryginalnej, prezentuje wyniki badań własnych i zawiera obszerne materiały uzupełniające).

Ostatnie zagadnienie poruszone w cyklu prac przedstawianych jako szczególne osiągnięcie naukowe, dotyczy poszukiwania kandydujących czynników prognostycznych, które mogłyby wspomóc ocenę odpowiedzi na leczenie BCP-ALL, opartą o analizę minimalnej choroby resztkowej (MRD).

Dawidowska M*, Kosmalska M, Sędek Ł, Szczepankiewicz A, Twardoch M, Sonsala A, Szarzyńska-Zawadzka B, Derwich K, Lejman M, Pawelec K, Obitko-Płudowska A, Pawińska-Wąsikowska K, Kwiecińska K, Kołtan A, Dyla A, Grzeszczak W, Kowalczyk JR, Szczepański T, Ziętkiewicz E, Witt M. **Association of germline genetic variants in RFC, IL15 and VDR genes with minimal residual disease in pediatric B-cell precursor ALL. Sci Rep. 2016 Jul 18;6:29427. doi: 10.1038/srep29427.**

Praca stanowi podsumowanie projektu „Polimorfizm genetyczny związany z odpowiedzią na leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. Farmakogenetyka minimalnej choroby resztkowej”, którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą. Celem projektu była identyfikacja wariantów polimorficznych genów, potencjalnie zaangażowanych w odpowiedź na leczenie ALL, wykazujących asocjację z obecnością MRD. Poziom MRD, czyli poziom komórek białaczkowych, które przetrwały leczenie, to wciąż najbardziej wiarygodny czynnik prognostyczny w ALL i podstawa klasyfikacji pacjentów do grup ryzyka. Wyniki oznaczeń MRD o wartości prognostycznej uzyskuje się dopiero w trakcie trwania leczenia (w 15 i 33 dobie oraz w 12 tygodniu terapii). Celem badań była identyfikacja polimorfizmów wykazujących asocjację z MRD, które mogłyby stanowić nowe potencjalne markery prognostyczne w ALL, co ważne możliwe do wykrycia już przy rozpoznaniu choroby, przy pomocy relatywnie tanich i prostych metod genotypowania. W chwili publikacji wyników badań, w literaturze istniały zaledwie 3 prace dotyczące asocjacji polimorfizmów z MRD (nurt badań określany terminem „farmakogenetyka MRD”) [17].

W grupie 174 pacjentów z dziecięcą BCP-ALL, leczonych wg. protokołów terapeutycznych ALL-IC-BFM 2002 i 2009, przeprowadziliśmy genotypowanie 23 polimorficznych loci genowych. Badane polimorfizmy zostały wytypowane z danych literaturowych na podstawie ich związku z farmakokinetyką lub farmakodynamiką leków stosowanych w leczeniu ALL oraz na podstawie ich asocjacji z obecnością MRD, w badaniu asocjacji w skali całego genomu (*genome-wide association study*, GWAS) [5]. Oznaczenia MRD zostały wykonane metodą cytometrii

przyptywowej i/lub metodą RQ-PCR, u 159/174 pacjentów, w 15 i 33 dobie oraz w 12 tygodniu leczenia.

Wśród polimorfizmów wytypowanych z podejścia genu kandydującego (dane literaturowe i baza Pharmacogenomics Knowledgebase) znalazły się: delecje genów *GSTM1* i *GSTT1*, polimorfizm genu *GSTP1* (rs1695), *MTHFR* (rs1801133), *TYMS* (rs3474033), *RFC* (rs1051266), *NR3C1* (rs6198, rs41423247), *MDR1* (rs3789243, rs2235046, rs1045642) oraz *VDR* (rs2228570, rs1544410). Pozostałe polimorfizmy, wytypowane w oparciu o asocjację z MRD, obejmowały *CCR5* (rs333) i *TPMT* (rs1800460, rs1142345) oraz 6 polimorfizmów wytypowanych z analizy GWAS: *IL15* (rs10519613), *NALCN* (rs7992226), *CCDC85C* (rs11160533), oraz 3 polimorfizmy w rejonie niekodującym (rs3862227, rs4888024, rs9871556). Do genotypowania polimorfizmów zastosowaliśmy metody: HRM, PCR, PCR-RFLP (analiza długości fragmentów restrykcyjnych) oraz TaqMan Genotyping Assays.

Zidentyfikowaliśmy 3 polimorfizmy wykazujące asocjację z wysokimi poziomami MRD: rs1544410 (genu *VDR*) z MRD w dniu 15; rs1051266 (genu *RFC*), niezależnie i w kombinacji z rs10519613 (*IL15*) z MRD w dniu 33; rs1051266 także z MRD w 12 tygodniu leczenia. Gen *VDR* koduje receptor witaminy D, który po związaniu aktywnej formy witaminy D, pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w regulację ekspresji wielu genów posiadających specyficzne motywy sekwencji (*vitamin D response elements, VDRE*). W ten sposób *VDR* ma plejotropowe działanie regulatorowe w wielu procesach biologicznych, takich jak homeostaza wapnia, modulacja odpowiedzi immunologicznej, różnicowanie komórek, proliferacja i inne. Gen *RFC* (*reduced folate carrier*) koduje białko błonowe odpowiedzialne za transport folianów, niezbędnych dla syntezy i naprawy DNA oraz metylacji DNA. *RFC* bierze również udział w aktywnym transporcie metotreksatu, leku z grupy antymetabolitów, powszechnie stosowanego w protokołach leczenia ALL, w tym w protokołach ALL-IC-BFM 2002 i 2009. Gen *IL15* (interleukin 15) koduje cytokinę biorącą udział w aktywacji i regulacji aktywności limfocytów T i komórek NK. Choć celem badań asocjacyjnych nie jest wyjaśnienie biologicznego mechanizmu obserwowanych asocjacji, nasze wyniki mogą wskazywać, iż na dynamikę redukcji MRD wpływać może zarówno polimorfizm genów zaangażowanych w farmakokinetykę/farmakodynamikę leków (*RFC* i potencjalnie *VDR*), jak i polimorfizmy potencjalnie istotne dla aktywności immunologicznej prawidłowych komórek NK i prawidłowych limfocytów względem resztkowych komórek białaczkowych (*IL15* i potencjalnie *VDR*).

Dla poszczególnych polimorfizmów zidentyfikowaliśmy allele ryzyka asocjujące z wysokimi poziomami MRD w określonych punktach czasowych leczenia. Dodatkowo, wykazaliśmy istnienie efektu addytywnego alleli ryzyka dla polimorfizmów genu *IL15* i *RFC* w odniesieniu do MRD w 33 dniu terapii. W przypadku pacjentów z obecnością 2 alleli ryzyka istotnie częściej obserwowaliśmy wysoki poziom MRD w 33 dobie leczenia niż u pacjentów z 1 allelem ryzyka (OR = 3.94) oraz w porównaniu do pacjentów bez alleli ryzyka w obu badanych loci (OR = 6.75). Efekt addytywny pozostawał istotny statystycznie w analizie wieloczynnikowej (regresja logistyczna) uwzględniającej cechy kliniczne, dla których wykazaliśmy asocjację z MRD: obecność translokacji t(9;22)/*BCR-ABL* i/lub t(4;11)/*MLL-AF4*, odpowiedź na wstępne leczenie sterydami, morfologia szpiku w dniu 15, grupa ryzyka wg. klasyfikacji ALL-IC-BFM.

Podsumowując, w prezentowanej pracy zidentyfikowaliśmy warianty polimorficzne genów i allele ryzyka, wykazujące asocjację z wysokimi poziomami MRD w określonych punktach leczenia. Pokazaliśmy, że choć wartość prognostyczna pojedynczych polimorfizmów jako potencjalnych markerów MRD jest ograniczona, może ona zostać wzmocniona przez jednoczesną analizę kilku polimorfizmów (efekt addytywny alleli ryzyka dla genów *RFC* i *IL15*). Wartość prognostyczna polimorfizmów może też zostać wzmocniona poprzez uwzględnienie w wieloczynnikowym modelu oceny ryzyka MRD, odpowiednich danych klinicznych, których asocjację z MRD również wykazaliśmy w badanej grupie. Wyniki pracy wpisują się w nurt poszukiwania czynników prognostycznych, które mogłyby uzupełnić obecny system klasyfikacji do grup ryzyka, oparty o ocenę MRD i w efekcie przyczynić się do personalizacji leczenia ALL.

Omówienie pozostałych kierunków badań

Charakterystyka obrazu genetycznego T-ALL: implikacje translacyjne (prace nie ujęte w cyklu)

W ramach opisanych wcześniej badań dotyczących oceny wartości prognostycznej mutacji i zmian liczby kopii 24 loci genowych, zwróciliśmy szczególną uwagę na gen *DNMT3A*. Gen ten koduje metylotransferazę DNA, katalizującą odwracalne przyłączanie grup metylowych do cytozyn w dinukleotydach CpG. Prawidłowa aktywność *DNMT3A* jest niezbędna dla zapewnienia profilu metylacji wysp CpG, warunkującego różnicowanie komórek hematopoetycznych w kierunku dojrzałych limfocytów. W naszych wcześniejszych badaniach pokazaliśmy, że profil metylacji w komórkach T-ALL jest zmieniony w porównaniu do prawidłowych tymocytów, co wskazuje na rolę w patogenezie tej białaczki aberracji genów odpowiedzialnych za modyfikacje epigenetyczne. Inaktywujące mutacje genu *DNMT3A* obserwowane są w różnych nowotworach, m.in. w T-ALL u dorosłych oraz w ostrej białaczce szpikowej (AML, w której mają wartość prognostyczną) [18]. W chwili rozpoczęcia projektu, dane na temat częstości i roli prognostycznej mutacji genu *DNMT3A* w dziecięcej T-ALL były znikome. Wszystkie te przesłanki skłoniły nas do włączenia *DNMT3A* do panelu 24 badanych genów.

Mutacje *DNMT3A* analizowaliśmy w grupie 74 pacjentów z dziecięcą T-ALL, wykorzystując metodę HRM i sekwencjonowanie Sangera. Opracowana przez nas metodyka (w tym zaprojektowane zestawy staterów do HRM i do sekwencjonowania) umożliwia analizę eksonów 8-23 i obejmuje wszystkie kluczowe domeny białka, w tym *hot spot* (R882) w domenie katalitycznej białka. Wykazaliśmy niską częstość występowania mutacji *DNMT3A* w dziecięcej T-ALL (zaledwie 1,4%; 1/74). Wykryta przez nas mutacja, substytucja pojedynczego nukleotydu c.1930G>A (p.Ala644Thr), której somatyczny charakter potwierdziliśmy analizując próbkę pacjenta w remisji, nie była dotąd obserwowana w dziecięcej T-ALL, była natomiast opisana w T-ALL u dorosłych i w AML. Niska częstość mutacji *DNMT3A* w dziecięcej T-ALL w naszych badaniach, pozostaje w zgodzie z wynikami prac opublikowanych już po rozpoczęciu tego projektu, w tym badań z użyciem NGS. Wnioskujemy zatem, że ze względu na niską częstość, mutacje genu *DNMT3A* nie stanowią w dziecięcej T-ALL dobrych kandydatów na czynniki prognostyczne. Jednak opracowana przez nas strategia identyfikacji mutacji *DNMT3A*, oparta o HRM i sekwencjonowanie Sangera, pozwala na kompleksową analizę sekwencji kodującej tego genu, stanowiąc atrakcyjną finansowo alternatywę dla poszukiwania mutacji *DNMT3A* metodą

NGS. Opisana w pracy metodyka może znaleźć praktyczne zastosowanie do identyfikacji mutacji *DNMT3A* w innych nowotworach hematologicznych (np. AML), w których mutacje te są częste i mają wartość prognostyczną.

Wyniki opublikowaliśmy w pracy:

Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalska M., Sędek Ł., Sonsala A., Twardoch M., Kowalczyk J.R., Szczepański T., Witt M., Dawidowska M. Cost-effective screening of DNMT3A coding sequence identifies somatic mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol. 2017 Dec;99(6):514-519. doi: 10.1111/ejh.12964. Epub 2017 Oct 5.*

W tym nurcie badań opublikowaliśmy również pracę stanowiącą opis przypadku dziecięcej T-ALL z obecnością rzadkiej translokacji t(8;14)(q24;q11), powodującej rearanżację z udziałem onkogeny *MYC* [19]. Translokacja ta jest typowa dla chłoniaka Burkitta, natomiast w T-ALL jej częstość określa się na ~1% i postuluje się jej związek z bardzo niekorzystną prognozą, choć jak dotąd translokacja ta nie została ujęta jako czynnik prognostyczny w protokołach leczenia ALL. W prezentowanej pracy zidentyfikowaliśmy zmiany współwystępujące z t(8;14)(q24;q11), prześledziliśmy ewolucję tych zmian od diagnozy, przez remisję do wznowy, określając w ten sposób niekorzystny prognostycznie profil genetyczny w T-ALL.

W analizowanym przypadku t(8;14)(q24;q11) została zidentyfikowana przy rozpoznaniu białaczki (klasyczna analiza kariotypu) i określona jako zmiana subklonalna, obecna w 5% analizowanych jąder komórkowych (FISH z użyciem sond typu *break-apart* dla genu *MYC*). Stosując metodę HRM, sekwencjonowanie Sangera i MLPA do analizy mutacji w opisanym wcześniej panelu 24 loci genowych, zidentyfikowaliśmy zmiany współwystępujące przy rozpoznaniu z t(8;14)(q24;q11): fuzja genów *STIL/TAL1*, monoalleliczna delecja genu *PTEN* i bialleliczna delecja w locus *CDKN2A/B*. We wznowie wykryliśmy te same aberracje dotyczące *STIL/TAL1* i *CDKN2A/B*, natomiast w przypadku genu *PTEN* zaobserwowaliśmy ewolucję klonalną (dodatkowa mutacja, powodująca zmianę ramki odczytu). W oparciu o analizę kariotypu i analizę FISH wykonane przy rozpoznaniu, po uzyskaniu remisji oraz we wznowie stwierdziliśmy, że wznowa nastąpiła z klonu komórek białaczkowych obciążonego translokacją t(8;14)(q24;q11). Translokacja subklonalna przy rozpoznaniu (5%), obserwowana była w 26% komórek po uzyskaniu remisji i we wszystkich analizowanych komórkach (100%) we wznowie. Świadczy to o przewadze selekcyjnej blastów T-ALL z obecnością tej translokacji i w konsekwencji agresywnym przebiegu białaczki (wznowa miała charakter wznowy wczesnej, nastąpiła przed zakończeniem leczenia). Pacjent zmarł w wyniku ostrych powikłań leczenia wznowy.

Ponadto, w pracy przeanalizowaliśmy 28 przypadków T-ALL z obecnością t(8;14)(q24;q11), w tym 26 przypadków dziecięcej T-ALL, opisanych dotąd w literaturze. U większości pacjentów z tą translokacją wystąpiła wczesna wznowa, czworo pacjentów zmarło z powodu progresji choroby lub powikłań leczenia, jednak u ośmiorga pacjentów obserwowano długotrwałą (>5-letnią) remisję. A zatem wartość prognostyczna t(8;14)(q24;q11) pozostaje niepewna. Zwracamy uwagę, iż wartość prognostyczna zmian genetycznych powinna być rozpatrywana w kontekście współwystępujących aberracji. Wartość prognostyczną posiada najpewniej profil współwystępujących i kooperujących nieprawidłowości genetycznych, a nie pojedyncza translokacja. Opisywany przez nas przypadek może stanowić tego przykład. Związek

t(8;14)(q24;q11) z niepowodzeniem leczenia może wynikać z onkogennej aktywacji genu *MYC*, wskutek translokacji oraz dodatkowo na skutek utraty funkcji genu *PTEN*, będącego negatywnym regulatorem ścieżki PI3/AKT/mTOR, której elementem efektorowym jest *MYC*, co prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek T-ALL. Dodatkowo, utrata funkcji genu *CDKN2A* kodującego białko supresorowe p14^{ARF} i zaburzenie ścieżki ARF-Mdm2-p53, może wzmacniać przewagę selekcyjną tych komórek poprzez zaburzenie regulacji apoptozy zależnej od p53.

Wyniki prezentowanej pracy pogłębiają wiedzę na temat roli t(8;14)(q24;q11) w patogenezie i progresji T-ALL oraz zwracają uwagę na rolę profilu genetycznego zmian współwystępujących z tą aberracją, w kontekście potencjalnego znaczenia prognostycznego.

Wyniki opublikowaliśmy w pracy:

Skalska-Sadowska J., Dawidowska M., Szarzyńska-Zawadzka B., Jarmuż-Szymczak M., Czerwińska-Rybak J., Machowska L. & Derwich K. Translocation t(8;14)(q24;q11) with concurrent PTEN alterations and deletions of SIL/TAL1 and CDKN2A/B in a pediatric case of acute T-lymphoblastic leukemia: A genetic profile associated with adverse prognosis. Pediatr Blood Cancer. 2017 Apr;64(4). doi: 10.1002/pbc.26266. Epub 2016 Oct 19.

Charakterystyka obrazu epigenetycznego T-ALL

Cechą obrazu epigenetycznego białaczek jest globalna hypometylacja, przyczyniającą się do niestabilności genomu, przy jednoczesnej hipermetylacji regionów promotorowych genów, co prowadzi do inaktywacji genów supresji transformacji nowotworowej [20]. Dziś wiadomo także, że hipermetylacja regionów promotorowych genów kodujących miRNA jest jednym z mechanizmów obniżonej ekspresji miRNA, pełniących funkcję supresorowych miRNA. W nurcie badań dotyczących epigenetyki T-ALL, podjęliśmy się identyfikacji profilu metylacji wysp CpG w rejonach promotorowych genów istotnych dla patogenezy dziecięcej T-ALL. Praca powstała w wyniku realizacji projektu „Wieloparametryczna analiza genetyczna, immunologiczna i molekularna ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek prekursorowych limfocytów T (T-ALL) - identyfikacja czynników prognostycznych i poprawa monitorowania efektów leczenia”. Celem pracy była weryfikacja hipotezy o występowaniu w T-ALL tzw. fenotypu CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*), pozwalającego na wyróżnienie grup pacjentów charakteryzujących się odmiennym profilem klinicznym i molekularnym. Pojęcie CIMP powstało na gruncie badań nowotworów jelita grubego, gdzie ma wartość prognostyczną. CIMP+ oznacza występowanie hipermetylacji wielu genów, podczas gdy CIMP- oznacza hipermetylację niewielkiej liczby genów. W chwili publikacji tej pracy, w literaturze istniała jedna publikacja dotycząca zagadnienia CIMP w T-ALL [21].

W grupie 61 pacjentów z dziecięcą T-ALL analizowaliśmy status metylacji regionów promotorowych 20 genów istotnych dla patogenezy T-ALL (*SYK, CDH1, ADAMTS5, NES1, p16/CDKN2A, p73, ASPP1, DIABLO, sFRP1, WIF1, CDKN1B/p27^{KIP1}, CDKN1c/p57^{KIP2}, LATS1, PTPN2, C/EBPA, FBXW7, NFkB, RB1, BCL11B, PHF6*), dla pięciu ostatnich z wymienionych genów brak było doniesień na temat ich metylacji w T-ALL. Metylację analizowaliśmy z użyciem metody MS-PCR (*methylation-specific PCR*) i DNA po konwersji bisulfidem, jako matrycy. Materiał kontrolny stanowił DNA uzyskany z dojrzałych limfocytów T szpiku kostnego 11 zdrowych dzieci

(dawcy szpiku) oraz z tymocytów 5 dzieci poddanych operacjom kardiochirurgicznym, wymagającym usunięcia grasicy.

Jako pierwsi pokazaliśmy, że profil metylacji badanych genów w komórkach T-ALL jest oddmienny niż w prawidłowych tymocytach, a zatem jest specyficzny dla procesu leukemogenezy, a nie wynika z procesu zatrzymania prekursorów limfocytów na określonym etapie dojrzewania tymocytów. Ponadto, wykazaliśmy w analizie nienadzorowanej, istnienie dwóch grup pacjentów różniących się liczbą hipermetylowanych genów (CIMP+ i CIMP-), potwierdzając istnienie fenotypu CIMP w dziecięcej T-ALL.

Wyniki opublikowaliśmy w pracy:

Kraszewska M.D., Dawidowska M., Larmonie N.S., Kosmalska M., Sędek L., Szczepaniak M., Grzeszczak W., Langerak A.W., Szczepański T., Witt M. DNA methylation pattern is altered in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia patients as compared with normal thymic subsets: insights into CpG island methylator phenotype in T-ALL. Leukemia. 2012 Feb;26(2):367-71. doi: 10.1038/leu.2011.208. Epub 2011 Aug 12.

Zagadnienie metylacji wysp CpG uwzględniliśmy jako jeden z nowo rozpoznanych (w tamtym czasie) mechanizmów patogenezy T-ALL i opisaliśmy w pracy przeglądowej:

Kraszewska M.D., Dawidowska M., Szczepański T., Witt M. T-cell acute lymphoblastic leukemia: Recent molecular biology findings. Br J Haematol. 2012 Feb;156(3):303-15. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08957.x. Epub 2011 Dec 7.

Monitorowanie efektywności leczenia ALL: minimalna choroba resztkowa i chimeryzm potransplantacyjny

Znaczna część mojej pracy naukowej dotyczyła monitorowania efektywności leczenia ALL poprzez analizę chimeryzmu potransplantacyjnego oraz monitorowanie minimalnej choroby resztkowej (MRD). Zagadnienia chimeryzmu dotyczyła moja praca magisterska, a wokół identyfikacji rearanżacji genów Ig/TCR jako markerów do monitorowania MRD skupiała się moja rozprawa doktorska. Obydwa zagadnienia kontynuowałam w mojej pracy po uzyskaniu stopnia doktora.

Doświadczenie w identyfikacji rearanżacji Ig/TCR oraz analizie MRD, opartej o RQ-PCR, zdobyłam podczas dwóch staży naukowych na Uniwersytecie Erazma w Rotterdamie (Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Department of Immunology).

W tamtym czasie badania MRD metodą ASO-RQ-PCR (*allele-specific oligonucleotide, real-time quantitative PCR*) były w Polsce całkowicie niedostępne dla pacjentów z ALL. Odbyte staże umożliwiły mi przeniesienie tej metodyki na grunt polski i zapoczątkowanie pilotażowych badań MRD u dzieci z ALL w naszym kraju. Głównym celem moich badań była charakterystyka wzoru rearanżacji Ig/TCR w grupie polskich pacjentów z ALL, tj. ocena częstości rearanżacji w poszczególnych loci Ig i TCR, ocena częstości użycia poszczególnych genów V, D i J z rodzin genów w badanych loci oraz porównanie do wzoru rearanżacji obserwowanego u innych narodowości europejskich. Dogłębna charakterystyka dostępności markerów do monitorowania MRD była niezbędna dla zaimplementowania w Polsce oznaczeń MRD. Metodyka badań MRD

obejmowała rekomendowane zestawy starterów, zaprojektowane tak, aby wykrywać rearanżacje genów Ig/TCR najczęściej występujące u pacjentów z takich krajów jak Holandia, Belgia, Francja, Włochy, Niemcy, Portugalia, Hiszpania i Wielka Brytania, gdyż te właśnie kraje uczestniczyły w opracowaniu metodyki badań MRD, w ramach europejskiego konsorcjum EuroMRD [22]. Istniały natomiast doniesienia literaturowe wskazujące na występowanie międzypopulacyjnych różnic w profilu rearanżacji genów Ig/TCR [23]. Jako cel badań postawiłam sobie odpowiedź na pytanie, czy profil rearanżacji genów Ig/TCR u pacjentów polskich umożliwia bezpośrednie przeniesienie standardów badań MRD, opracowanych w krajach Europy Zachodniej, czy też wymaga dostosowania do specyfiki immunogenotypu ALL u pacjentów w naszym kraju.

W wyniku prowadzonych badań wykazałam znaczną zbieżność profilu rearanżacji genów Ig/TCR u pacjentów narodowości polskiej oraz innych narodowości z krajów Europy Zachodniej, co uzasadniało rozwijanie monitorowania MRD w Polsce w oparciu o rekomendacje grupy EuroMRD. Warto podkreślić, że metodyka identyfikacji markerów do monitorowania MRD i samego monitorowania jest bardzo złożona, obejmuje wiele etapów, a jej implementacja stanowiła w ówczesnym czasie wyzwanie dla ośrodków polskich, zarówno ze względów finansowych, jak i personalnych. Zatem celem moich badań była również ocena efektywności identyfikacji markerów do analizy MRD przy użyciu podstawowego i rozszerzonego panelu reakcji PCR i zaproponowanie optymalnej strategii prowadzenia diagnostyki MRD. Wykazałam, że zastosowanie wyłącznie reakcji PCR typu singleplex, umożliwiających identyfikację rearanżacji genów *IGH* (Vh-Jh), *IGK*-Kde, Vd2-Dd3, Dd2-Dd3, Vd2-Ja29 oraz *TCRG*, pozwala na wykrycie przynajmniej jednej i przynajmniej dwóch rearanżacji markerowych odpowiednio u 97% i 86% pacjentów z białaczką BCP-ALL. Dodatkowe zastosowanie reakcji typu multiplex-PCR (panel rozszerzony), obejmujących rearanżacje *IGH* (Dh-Jh), Vd2-Ja oraz *TCRB*, umożliwia wykrycie przynajmniej jednej i przynajmniej dwóch rearanżacji odpowiednio u 100% i 91% pacjentów z BCP-ALL.

W oparciu o te wyniki zaproponowałam dwu-etapową strategię wykrywania rearanżacji Ig/TCR jako element uproszczenia i zmniejszenia kosztów diagnostyki MRD (etap drugi stosowany wyłącznie w sytuacji nie wykrycia w etapie pierwszym optymalnych markerów do monitorowania MRD). Analogiczną ocenę efektywności etapowego podejścia do identyfikacji rearanżacji markerowych przeprowadziliśmy także w grupie pacjentów z T-ALL.

Podjęcie przeze mnie tematyki analizy wzoru rearanżacji genów Ig/TCR w kontekście monitorowania MRD zostało docenione podczas III Zjazdu Polskiego Towarzystwa Onkologii i Hematologii Dziecięcej (Warszawa 2005) i nagrodzone I-wszą nagrodą za prezentację plakatową w dziedzinie badań podstawowych.

Ponadto, wyniki badań dotyczących rearanżacji genów Ig/TCR i ich potencjalnego wykorzystania w diagnostyce MRD zostały opublikowane w czterech pracach:

Dawidowska M et al. Identyfikacja rearanżacji genów kodujących immunoglobuliny i receptory limfocytów T: podstawa monitorowania minimalnej choroby resztkowej u polskich pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną w oparciu o standardy europejskie. Wstępne wyniki badań własnych. *Medycyna Wieku Rozw.*, 2006, 10 (1, cz.II): 323-334

Dawidowska M et al. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients-implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. **Leukemia Research** 2006, 30(9): 1119-1125;

Dawidowska M et al. Implementation of the standard strategy for identification of Ig/TCR targets for minimal residual disease diagnostics in B-cell precursor ALL pediatric patients: Polish experience. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 2008 Nov-Dec;56(6):409-18. doi: 10.1007/s00005-008-0045-y

Kraszewska M.D., **Dawidowska M et al.** Immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements in the diagnostic paradigm of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. **Leuk Lymphoma**. 2012 Jul;53(7):1425-8. doi: 10.3109/10428194.2011.654338.

Wyniki powyższych badań znalazły też praktyczne zastosowanie. Brałam udział w opracowaniu polskich standardów i wytycznych dotyczących monitorowania MRD oraz monitorowania chimeryzmu potransplantacyjnego w ramach realizacji wielośrodkowego projektu „Zaawansowane metody molekularne w hematologii. Opracowanie i wdrożenie standardów badań choroby resztkowej, chimeryzmu przeszczepowego i translokacji markerowych”. Byłam głównym wykonawcą tego projektu w ośrodku poznańskim. Opracowane standardy zostały opublikowane w monografii o zasięgu krajowym „Hematologia Molekularna. Patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze”. Witt M., Szczepański T., **Dawidowska M.** (red.) Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 2009, ISBN 978-83-7314-119-3. Byłam redaktorką tej monografii oraz autorką/współautorką ośmiu rozdziałów, w tym dotyczących MRD i chimeryzmu przeszczepowego. W monografii ujęto zarówno podstawy teoretyczne opisywanych zagadnień, jak i protokoły badań do bezpośredniego zastosowania w praktyce laboratoryjnej. Monografia spotkała się z szerokim zainteresowaniem, tak iż po trzech latach, zaktualizowana i rozszerzona o nowe zagadnienia, została opublikowana przez wydawnictwo Springer, jako monografia o zasięgu międzynarodowym: Witt M., **Dawidowska M.**, Szczepański T. (editors). *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies. Diagnostic Tools and Clinical Applications*, Springer, ISSN 1866-914X, ISBN 978-3-642-29466-2, Heidelberg – New York – Dordrecht – London, 2012. Ponownie byłam redaktorką monografii oraz autorką/współautorką ośmiu rozdziałów.

Ponadto, jestem autorką pracy metodologicznej dotyczącej monitorowania chimeryzmu potransplantacyjnego oraz trzech prac przeglądowych dotyczących metod oraz znaczenia analizy chimeryzmu i MRD:

Guz K., Smolarczyk-Wodzyńska J., **Dawidowska M.** et al. Ocena chimeryzmu po przeszczepieniu alogenicznych komórek krwiotwórczych przy pomocy RQ-PCR – standaryzacja metody i porównanie z techniką STR-PCR. **Acta Haematologica Polonica**, 2010, 41 (4): 535-544.

Jótkowska J., Derwich K., **Dawidowska M.** Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. **J. Appl. Genet.** 2007, 48(1): 77-83.

Dawidowska M, Wachowiak J. Rozwój badań molekularnych w hematologii - monitorowanie minimalnej choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej i posttransplantacyjnego chimeryzmu hematopoetycznego. **Nowiny Lek.** 2007, 76: 282-291

Dawidowska M, Wachowiak J., Witt M. Molekularne metody diagnostyki i oceny efektywności terapii we współczesnej hematologii pediatricznej. Post. Biochemii, 2006, 52 (4): 408-416.

W ubiegłym roku, w ramach współpracy z portalem edukacyjnym onkologia-dziecieca.pl, skierowanym głównie do lekarzy onkologów, powróciłam do tematyki monitorowania MRD, przygotowując pracę przeglądową ukazującą postęp w monitorowaniu MRD i obecny stan wiedzy na temat znaczenia analizy MRD w praktyce klinicznej.

Dawidowska M. Monitorowanie MRD u pacjentów z ALL w 2018 roku i perspektywy na przyszłość. (10.09.2018), onkologia-dziecieca.pl.

W pracy obszernie omówiłam dynamicznie rozwijającą się metodę monitorowania MRD z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (*next-generation sequencing*, NGS). Wprowadzenie metodyki analizy MRD w oparciu o NGS jest jednym z zadań, które obecnie realizuję w ramach projektu STRATEGMED3: „*Personalizacja leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej (akronim – PersonALL)*”. Jestem głównym wykonawcą tego projektu w ośrodku poznańskim. Drugie zadanie w ramach tego projektu, w którego realizację jestem obecnie zaangażowana, dotyczy wykorzystania metody NGS do identyfikacji zmian genetycznych o potencjalnej wartości prognostycznej w białaczce T-ALL. Część wyników afiliowanych do tego projektu została opublikowana w pracy włączonej do cyklu habilitacyjnego (2/ Szarzyńska-Zawadzka et al. Am J Hematol. 2019).

Ostra białaczka limfoblastyczna u młodych dorosłych

Nowym kierunkiem badań, jaki podjęłam w ostatnim czasie, jest identyfikacja transkryptomu miRNA w białaczce T-ALL u młodych dorosłych (*Adolescents and Young Adults*, AYA). Grupa pacjentów AYA, tj. w wieku 15-39 lat, zwraca szczególną uwagę klinicystów i badaczy [24]. W tej grupie obserwuje się istotny wzrost zachorowalności na ALL, co rodzi problemy natury klinicznej i poznawczej. Rozpiętość wieku w grupie AYA sprawia, że część pacjentów jest leczona w ośrodkach pediatricznych (<18 r.ż.), a część w ośrodkach dla dorosłych (>18 r.ż.), gdzie terapię ALL prowadzi się w oparciu o odmienne schematy leczenia. Większość danych wskazuje na wyższą skuteczność schematów „pediatricznych” niż „dorosłych”, jednak nawet z zastosowaniem protokołów pediatricznych, wyniki leczenia w grupie AYA są gorsze niż u dzieci (przeżycie: ok. 70% vs. 85% u dzieci). Istnieje zatem potrzeba opracowania schematów leczenia specyficznie dla grupy AYA, a nawet personalizacji leczenia z użyciem leków celowanych, np. inhibitorów, w przypadku nieprawidłowej aktywacji ścieżek sygnałowych. Celem moich badań jest poznanie podłoża molekularnego T-ALL w grupie AYA i zidentyfikowanie cech odróżniających ją od T-ALL u dzieci i T-ALL u dorosłych. Istnieją dane dotyczące charakterystyki eksomu i transkryptomu tej białaczki. Brak natomiast danych dotyczących transkryptomu miRNA w AYA T-ALL. Dla realizacji tych badań, prócz dotychczasowej współpracy z ośrodkami Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGBCh) nawiązałam współpracę z ośrodkami stowarzyszonymi w ramach Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych (PALG). Na realizację wstępnej fazy badań uzyskałam finansowanie w ramach projektu „*Ostra białaczka limfoblastyczna T-komórkowa u młodych dorosłych (AYA T-ALL): charakterystyka na poziomie transkryptomu miRNA*”, którego jestem kierownikiem i głównym wykonawcą.

Postęp, jaki dokonał się w leczeniu ALL odzwierciedla progres na polu badań podstawowych dotyczących biologii tej białaczki i jej podłoża (epi-)genetycznego. Charakterystyka obrazu genetycznego i biologii molekularnej tej białaczki umożliwiła identyfikację nowych czynników prognostycznych już obecnie stosowanych w systemach identyfikacji grup ryzyka. Jest to widoczne w przypadku częściej rozpoznawanego podtypu BCP-ALL. T-ALL, ze względu na niższą częstość i większą heterogenność, pozostaje nadal w wielu obszarach znacznie mniej poznana, stanowiąc ważny i niezwykle fascynujący przedmiot badań.

Poznań, 15.02.2019

Prof. dr hab. n. med. Dariusz Skowron

Literatura

1. Inaba, H.; Greaves, M.; Mullighan, C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **2013**, *381*, 1943-1955, doi:10.1016/s0140-6736(12)62187-4.
2. Belver, L.; Ferrando, A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **2016**, *16*, 494-507, doi:10.1038/nrc.2016.63.
3. Bene, M.C.; Castoldi, G.; Knapp, W.; Ludwig, W.D.; Matutes, E.; Orfao, A.; Vantveer, M.B. PROPOSALS FOR THE IMMUNOLOGICAL CLASSIFICATION OF ACUTE LEUKEMIAS. *Leukemia* **1995**, *9*, 1783-1786.
4. Ferrando, A.A.; Neuberg, D.S.; Staunton, J.; Loh, M.L.; Huard, C.; Raimondi, S.C.; Behm, F.G.; Pui, C.H.; Downing, J.R.; Gilliland, D.G., et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 75-87, doi:10.1016/s1535-6108(02)00018-1.
5. Yang, J.J.; Cheng, C.; Yang, W.J.; Pei, D.Q.; Cao, X.Y.; Fan, Y.P.; Pounds, S.B.; Neale, G.; Trevino, L.R.; French, D., et al. Genome-wide Interrogation of Germline Genetic Variation Associated With Treatment Response in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Jama-Journal of the American Medical Association* **2009**, *301*, 393-403, doi:10.1001/jama.2009.7.
6. De Keersmaecker, K.; Atak, Z.K.; Li, N.; Vicente, C.; Patchett, S.; Girardi, T.; Gianfelici, V.; Geerdens, E.; Clappier, E.; Porcu, M., et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **2013**, *45*, 186-190, doi:10.1038/ng.2508.
7. Chen, B.; Jiang, L.; Zhong, M.L.; Li, J.F.; Li, B.S.; Peng, L.J.; Dai, Y.T.; Cui, B.W.; Yan, T.Q.; Zhang, W.N., et al. Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, 373-378, doi:10.1073/pnas.1717125115.
8. Andersson, A.K.; Ma, J.; Wang, J.; Chen, X.; Gedman, A.L.; Dang, J.; Nakitandwe, J.; Holmfeldt, L.; Parker, M.; Easton, J., et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet* **2015**, *47*, 330-337, doi:10.1038/ng.3230.
9. Roberts, K.G.; Mullighan, C.G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* **2015**, *12*, 344-357, doi:10.1038/nrclinonc.2015.38.
10. Clappier, E.; Grardel, N.; Bakkus, M.; Rapon, J.; De Moerloose, B.; Kastner, P.; Caye, A.; Vivent, J.; Costa, V.; Ferster, A., et al. IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia* **2015**, *29*, 2154-2161, doi:10.1038/leu.2015.134.
11. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 259-269, doi:10.1038/nrc1840.
12. van Dongen, J.J.M.; van der Velden, V.H.J.; Bruggemann, M.; Orfao, A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* **2015**, *125*, 3996-4009, doi:10.1182/blood-2015-03-580027.

13. Wallaert, A.; Van Looche, W.; Hernandez, L.; Taghon, T.; Speleman, F.; Van Vlierberghe, P. Comprehensive miRNA expression profiling in human T-cell acute lymphoblastic leukemia by small RNA-sequencing. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
14. Pópulo, H.; Lopes, J.M.; Soares, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 1886-1918, doi:10.3390/ijms13021886.
15. Hayashita, Y.; Osada, H.; Tatematsu, Y.; Yamada, H.; Yanagisawa, K.; Tomida, S.; Yatabe, Y.; Kawahara, K.; Sekido, Y.; Takahashi, T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Research* **2005**, *65*, 9628-9632, doi:10.1158/0008-5472.can-05-2352.
16. Chugh, P.; Dittmer, D.P. Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* **2012**, *3*, 601-616, doi:10.1002/wrna.1120.
17. Davies, S.M.; Borowitz, M.J.; Rosner, G.L.; Ritz, K.; Devidas, M.; Winick, N.; Martin, P.L.; Bowman, P.; Elliott, J.; Willman, C., et al. Pharmacogenetics of minimal residual disease response in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* **2008**, *111*, 2984-2990, doi:10.1182/blood-2007-09-114082.
18. Roller, A.; Grossmann, V.; Bacher, U.; Poetzinger, F.; Weissmann, S.; Nadarajah, N.; Boeck, L.; Kern, W.; Haferlach, C.; Schnittger, S., et al. Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies. *Leukemia* **2013**, *27*, 1573-1578, doi:10.1038/leu.2013.65.
19. Parolini, M.; Mecucci, C.; Matteucci, C.; Giussani, U.; Intermesoli, T.; Tosi, M.; Rambaldi, A.; Bassan, R. Highly aggressive T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(8;14)(q24;q11): extensive genetic characterization and achievement of early molecular remission and long-term survival in an adult patient. *Blood Cancer J* **2014**, *4*, e176, doi:10.1038/bcj.2013.72.
20. Ntziachristos, P.; Abdel-Wahab, O.; Aifantis, I. Emerging concepts of epigenetic dysregulation in hematological malignancies. *Nat Immunol* **2016**, *17*, 1016-1024, doi:10.1038/ni.3517.
21. Roman-Gomez, J.; Jimenez-Velasco, A.; Agirre, X.; Prosper, F.; Heiniger, A.; Torres, A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 7043-7049, doi:10.1200/JCO.2005.01.4944.
22. van Dongen, J.J.M.; Langerak, A.W.; Bruggemann, M.; Evans, P.A.S.; Hummel, M.; Lavender, F.L.; Delabesse, E.; Davi, F.; Schuurink, E.; Garcia-Sanz, R., et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **2003**, *17*, 2257-2317, doi:10.1038/sj.leu.2403202.
23. Scrideli, C.A.; Tone, L.G. Ig and TCR gene rearrangements in childhood ALL is there ethnic and socio-economic diversity of rearrangement patterns? *Leuk Res* **2006**, *30*, 1065-1066, doi:10.1016/j.leukres.2006.01.012.
24. Friend, B.D.; Schiller, G.J. Closing the gap: Novel therapies in treating acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood Rev* **2018**, *32*, 122-129, doi:10.1016/j.blre.2017.09.005.

15.02.2019

Handwritten signature