

AUTOREFERAT

Załącznik nr 2

Dr n. med. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

Poznań 2018

SPIS TREŚCI

I. Dane wnioskodawcy.....	3
II. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem rozprawy doktorskiej.....	3
III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
IV. Dorobek naukowy.....	4
V. Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.....	5
VI. Omówienie prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.....	6
VII. Omówienie innych kierunków badawczych.....	14

I. Dane wnioskodawcy

Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

II. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem rozprawy doktorskiej

Tytuł magistra socjologii, 2005

Wydział Nauk Społecznych Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Tytuł pracy magisterskiej: „Genetyka a określanie tożsamości. Rozwój genetyki w społecznej świadomości”
Promotor: Prof. dr hab. Marek Ziółkowski

Tytuł licencjata biotechnologii, 2005

Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Tytuł pracy licencjackiej: „Zastosowanie markerów mitochondrialnego DNA do diagnostyki nowotworów”
Promotor: Dr hab. Mirosława Dabert

Tytuł magistra biotechnologii, 2007

Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Tytuł pracy magisterskiej: „Mechanizm NMD (ang. nonsense-mediated decay) w mutantach *Arabidopsis thaliana* o obniżonej ekspresji genów *ATCBP20* i *ATCBP80*”
Promotor: Prof. dr hab. Artur Jarmołowski

Stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, 2012

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania funkcjonalne heterozygotycznych mutacji genu *NBN*”
Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Nowak
Rozprawa doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008-2013	Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu Stanowisko: biolog
20013-obecnie	Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu Stanowisko: adiunkt

W latach 2015-2016 przebywałam na dwuletnim stażu podoktorskim w University Medical Center Groningen, Groningen, Holandia.

IV. Dorobek naukowy

Jestem autorką 21 prac naukowych, w skład których wchodzi:

- 15 prac oryginalnych (12 posiada Impact Factor)
- 5 prac przeglądowych (4 posiada Impact Factor)
- 1 pracy metodycznej (nie posiada Impact Factor)

Dane bibliometryczne (z dnia 18.12.2018):

- Sumaryczny Impact Factor, zgodnie z rokiem opublikowania prac: **67,651**
- Indeks Hirscha (wg Web of Science): **7**
- Liczba cytowań (wg Web of Science): **106** (96 bez autocytowań)

Jestem także autorką 6 doniesień zjazdowych ustnych i 4 doniesień zjazdowych plakatowych, prezentowanych na kongresach polskich i międzynarodowych. W trakcie swojej pracy naukowej uczestniczyłam lub uczestniczę w realizacji 10 projektów naukowych (w tym 5 jako kierownik). Szczegółowy opis osiągnięć naukowych znajduje się w załączniku nr 4 „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej oraz popularyzacji nauki”.

V. Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (według 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.)

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Rola mikroRNA w patogenezie nowotworów hematologicznych”

Łączny Impact Factor prac wchodzących w skład szczególnego osiągnięcia naukowego: **29,216**; liczba punktów MNiSW: **185**.

1. **Dzikiewicz-Krawczyk A**, Diepstra A, Rutgers B, Kortman G, de Jong D, Koerts J, Bulthuis M, van der Sluis T, Seitz A, Visser L, Kok K, Kluiver J, van den Berg A. Argonaute 2 RNA Immunoprecipitation Reveals Distinct miRNA Targetomes of Primary Burkitt Lymphoma Tumors and Normal B Cells.

Am J Pathol. 2018; 188(5):1289-1299.

IF 4,069; MNiSW 40

Mój udział procentowy szacuję na 60%

2. Yuan Y, Niu F, Nolte IM, Koerts J, de Jong D, Rutgers B, Osinga J, Azkanaz M, Terpstra M, Bystrykh L, Diepstra A, Visser L, **Dzikiewicz-Krawczyk A**, Kok K, Kluiver J, van den Berg A. MicroRNA High Throughput Loss-of-Function Screening Reveals an Oncogenic Role for miR-21-5p in Hodgkin Lymphoma.

Cell Physiol Biochem. 2018; 49(1):144-159.

IF 5,500; MNiSW 30

Mój udział procentowy szacuję na 15%

3. **Dzikiewicz-Krawczyk A**, Kok K, Slezak-Prochazka I, Robertus JL, Bruining J, Tayari MM, Rutgers B, de Jong D, Koerts J, Seitz A, Li J, Tillema B, Guikema JE, Nolte IM, Diepstra A, Visser L, Kluiver J, van den Berg A. ZDHHC11 and ZDHHC11B are critical novel components of the oncogenic MYC-miR-150-MYB network in Burkitt lymphoma.

Leukemia. 2017; 31(6):1470-1473.

IF 10,023; MNiSW 45

Mój udział procentowy szacuję na 60%

4. **Dzikiewicz-Krawczyk A***, Macieja A, Mały E, Januskiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Fichna M, Strauss E, Nowak J. Polymorphisms in microRNA target sites modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding.

J Hematol Oncol. 2014; 7:43.

IF 4,812; MNiSW 35

* autor korespondencyjny

Mój udział procentowy szacuję na 80%

5. **Dzikiewicz-Krawczyk A.** MicroRNA-binding site polymorphisms in hematological malignancies.

J Hematol Oncol. 2014; 7:83.

IF 4,812; MNiSW 35

Mój udział procentowy szacuję na 100%

VI. Omówienie prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe

Nowotwory hematologiczne to choroby charakteryzujące się niekontrolowanym namnażaniem komórek krwi, szpiku kostnego, węzłów chłonnych i układu chłonnego. Stanowią one do 10% wszystkich zachorowań na nowotwory i mają zróżnicowane rokowanie: od bardzo złego do ponad 90% przeżywalności, w zależności od typu i stopnia zaawansowania choroby. Na podstawie linii hematopoetycznej, z której się wywodzą, nowotwory hematologiczne można podzielić na dwie główne grupy: 1) nowotwory mieloidalne, do których zalicza się m. in. nowotwory mielodysplastyczne i mieloproliferacyjne oraz białaczki szpikowe; 2) nowotwory limfoidalne, obejmujące białaczki limfoblastyczne i chłoniaki z komórek B i T [1, 2]. Wykazano, że szereg mutacji i aberracji genomowych zaangażowanych jest w patogenezę nowotworów hematologicznych. Dla niektórych z nich, np. fuzji *BCR-ABL* opracowano skuteczne terapie celowane, jednak dla innych, np. translokacji obejmujących onkogen *MYC* wciąż brak możliwości terapeutycznych. Naukowcy nie ustają więc w poszukiwaniu nowych czynników zaangażowanych w patogenezę nowotworów hematologicznych, które pozwoliłyby lepiej zrozumieć mechanizmy choroby oraz wskazać nowe cele terapeutyczne. Oprócz genów kodujących białka, u podstaw wielu chorób leżą też zaburzenia ekspresji niekodujących RNA, takich jak mikroRNA czy długie niekodujące RNA.

MikroRNA (miRNA) to małe (ok. 22-nukleotydowe) regulatorowe cząsteczki RNA, konieczne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmów. Mechanizm ich działania u zwierząt polega na niewymagającym całkowitej komplementarności wiązaniu się miRNA do regionu 3' nieulegającego translacji (ang. *3' untranslated region*, 3'UTR) docelowego mRNA, przez co blokowana jest synteza białka [3]. miRNA kodowane są zarówno przez geny zlokalizowane w intronach genów kodujących białka, jak i przez niezależne geny. W procesie biogenezy pierwotny długi transkrypt ulega obróbce przez szereg enzymów, by dać dojrzałą postać 18-24 nt miRNA związanego z indukowanym przez RNA kompleksem wyciszającym (ang. *RNA-induced silencing complex*, RISC) [4]. Jak dotąd zidentyfikowano ponad 2500 ludzkich miRNA, jednak szczegółowo scharakteryzowano pod względem funkcji i docelowych transkryptów zaledwie ułamek [5]. Zakłócenia w regulacji ekspresji genów przez miRNA mogą przyczyniać się do nieprawidłowości w funkcjonowaniu organizmów i powodować szereg chorób, w tym chorób nowotworowych. Zaburzenia mogą występować na poziomie miRNA lub ich docelowych genów, w efekcie prowadząc do zmiany poziomu białek regulowanych przez miRNA. Amplifikacje, insercje lub delecje genów miRNA, jak i deregulacja czynników kontrolujących ekspresję i dojrzewanie miRNA mogą przełożyć się na zmieniony poziom dojrzałych miRNA. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) w genach miRNA mogą wpływać na biogenezę miRNA oraz ich wiązanie do docelowych transkryptów. Z kolei SNP w 3'UTR docelowych genów mogą eliminować miejsca wiązania miRNA lub tworzyć nowe, wpływając na poziom białek regulowanych przez miRNA [6].

W ostatnich latach badania wykazały, że szereg miRNA zaangażowanych jest we wszystkie kluczowe etapy prawidłowej hematopoezy, kierując przebiegiem różnicowania i dojrzewania w poszczególnych liniach komórek hematopoetycznych [7, 8]. Natomiast zmiany w ekspresji miRNA powodują zaburzenia w procesie hematopoezy, prowadząc w konsekwencji do szeregu chorób, w tym nowotworów hematologicznych. Wykazano przykładowo, że miR-15, miR-16, miR-200, miR-150 i miR-34 to supresorowe miRNA, których ekspresja często jest obniżona w nowotworach hematologicznych. Z kolei miR-155, miR-21 i klaster miR-17~92 mają charakter onkogenny i często wykazują podwyższony poziom w nowotworach hematologicznych [9, 10]. Zróżnicowane profile ekspresji miRNA pozwalają na rozróżnienie typów nowotworów, często też skojarzone są z dobrym lub złym rokowaniem [11, 12]. Nadzieję budzi też wykorzystanie miRNA lub ich genów docelowych jako nowych celów terapeutycznych. Aby takie podejście mogło być skuteczne, konieczne

jest wcześniejsze poznanie roli i mechanizmów działania miRNA i regulowanych przez nie genów w nowotworach hematologicznych.

W powyższy nurt badań wpisują się prace, wchodzące w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego. **Celem badań była identyfikacja i funkcjonalna charakterystyka zaburzeń w oddziaływaniach miRNA z genami docelowymi i ich znaczenia w patogenezie nowotworów hematologicznych.** Prowadzone przeze mnie badania były wykonane zarówno w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, gdzie obecnie pracuję, jak i w University Medical Center Groningen w Holandii, gdzie spędziłam w ramach stażu podoktorskiego dwa lata w grupie prof. Anke van den Berg.

Pierwszym zastosowanym przeze mnie podejściem była identyfikacja polimorfizmów w miejscach wiązania miRNA związanych z ryzykiem białaczki, w ramach kierowanego przeze mnie projektu MNiSW N N401 570740 „Analiza polimorfizmów miejsc wiązania microRNA (miRSNP) w 3’UTR genów związanych z białaczkami oraz ich wpływu na ekspresję białek”. miRSNP w 3’UTR genów docelowych mogą zaburzać mechanizm regulatorowy miRNA poprzez osłabienie lub wzmocnienie oddziaływań miRNA-mRNA, co prowadzi do zmian w poziomie białek w komórce [13]. Szczególnie ważne są miRSNP w onkogenach i genach supresorowych, gdyż mogą przyczyniać się do procesu nowotworzenia. W pierwszym etapie projektu przeprowadzono analizę *in silico* w celu wytypowania potencjalnych SNP wpływających na wiązanie miRNA. Za pomocą dostępnych algorytmów (miRanda, PITA, Patrocles, PolymiRTS) przeanalizowano SNP zlokalizowane w rejonie 3’UTR genów o znanym powiązaniu z białaczkami. Spośród 111 zidentyfikowanych potencjalnych miRSNP, do dalszych badań wybrano 10: *ABL1_rs7457*, *ARHGAP26_rs187729*, *ATM_rs227091*, *ETV6_rs1573613*, *IRF4_rs1877176*, *IRF8_rs10514611*, *NBN_rs2735383*, *PML_rs9479*, *TLX1_rs1051723*, *TLX1_rs2742038*. Kryterium wyboru stanowiły: 1) zgodność przynajmniej dwóch zastosowanych algorytmów oraz 2) ekspresja przewidywanego miRNA w krwi, szpiku kostnym lub białaczkach i chłoniakach.

Rozkład genotypów wybranych polimorfizmów został określony w grupach chorych z ostrą białaczką szpikową (AML, n=87), przewlekłą białaczką szpikową (CML, n=140), dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, n=101) i zdrowych osób (n=471) przy zastosowaniu sond TaqMan lub reakcji PCR-RFLP. Wykazano powiązanie polimorfizmów *TLX1_rs2742038* i *ETV6_rs1573613* ze zwiększonym ryzykiem ALL, podczas gdy *PML_rs9479* powiązany był z obniżonym ryzykiem ALL. Dla białaczek szpikowych u dorosłych zaobserwowano istotny związek pomiędzy polimorfizmem *PML_rs9479* i

obniżonym ryzykiem AML oraz pomiędzy polimorfizmami *ARHGAP26_rs187729* i *IRF8_rs10514611* a zwiększonym ryzykiem CML. Dodatkowo stwierdzono istotny statystycznie trend dla rosnącego ryzyka ALL i CML wraz ze zwiększającą się liczbą współwystępujących genotypów ryzyka. Iloraz szans (OR) dla nosicieli 3 lub 4 genotypów ryzyka dla ALL i 2 genotypów ryzyka dla CML znacznie przewyższało sumę OR dla poszczególnych genotypów analizowanych osobno.

Dla miRSNP istotnie powiązanych z ryzykiem białaczek sprawdzono następnie przy pomocy systemu reporterowego z lucyferazą ich wpływ na wiązanie miRNA przewidywanych w analizie *in silico*. Badanie to wykazało, że allel C *ARHGAP26_rs187729* powoduje powstanie nowego miejsca wiązania dla miR-18a-3p, podczas gdy allel A *PML_rs9479* wzmacnia wiązanie miR-510-5p, a allel C *ETV6_rs1573613* osłabia siłę wiązania miR-34c-5p i miR-449b-5p. Stanowi to potwierdzenie, że polimorfizmy miejsc wiązania miRNA mogą wpływać na ekspresję kodowanych białek.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu wskazują na znaczenie polimorfizmów miejsc wiązania miRNA jako czynników ryzyka w białaczkach. Szczególnie zaobserwowany addytywny efekt miRSNP w przypadku ryzyka ostrej białaczki limfoblastycznej i przewlekłej białaczki szpikowej sugeruje, że polimorfizmy te mogłyby być wykorzystane w praktyce klinicznej jako markery ryzyka. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie zmienności genetycznej w regionie 3' nieulegającym translacji w rozwoju białaczek i stanowią przesłankę do prowadzenia dalszych badań w tym kierunku. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy: **Dzikiewicz-Krawczyk A, Macieja A, Mały E, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Fichna M, Strauss E, Nowak J. Polymorphisms in microRNA target sites modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding. J Hematol Oncol. 2014; 7:43.**

W czasie, gdy praca ta została opublikowana, jedynie dla kilku miRSNP wykazano powiązanie z ryzykiem bądź prognozowanym czasem przeżycia w nowotworach hematologicznych, takich jak szpiczak mnogi, chłoniak Hodgkina, chłoniaki nieziarnicze i ostra białaczka szpikowa. Wszystkie dotychczasowe badania opublikowane w tej tematyce zebrałam i usystematyzowałam w pracy przeglądowej: **Dzikiewicz-Krawczyk A. MicroRNA-binding site polymorphisms in hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2014; 7:83.** Analiza literatury wskazała, że miRSNP mają duży potencjał jako narzędzia diagnostyczne i prognostyczne oraz mogą też przyczynić się do głębszego poznania złożonych sieci oddziaływań miRNA w nowotworach hematologicznych. W pracy tej zaproponowałam też schemat kompleksowego podejścia do identyfikacji i charakterystyki

miRSNP o znaczeniu w nowotworach lub innych jednostkach chorobowych, począwszy od wyboru potencjalnych miRSNP do badań w oparciu o dostępną wiedzę i analizę bioinformatyczną, poprzez określenie częstości genotypów w grupie badanej i kontrolnej, po potwierdzenie wpływu miRSNP na wiązanie miRNA i ekspresję białka oraz charakterystykę funkcjonalnych konsekwencji wybranych miRSNP, które mogłyby wyjaśnić obserwowany związek z ryzykiem choroby lub wartością prognostyczną. Tak jak przewidywałam w omawianej pracy, badania nad miRSNP w nowotworach hematologicznych i innych chorobach wciąż się rozwijają, dostarczając nowych informacji na temat mechanizmów patogenezy.

Zmieniony patologiczny poziom miRNA w nowotworach hematologicznych może występować na skutek deregulacji czynników transkrypcyjnych kontrolujących ekspresję miRNA. Podczas mojego stażu podoktorskiego w grupie prof. Anke van den Berg w University Medical Center Groningen w Holandii podjęłam się funkcjonalnej charakterystyki miR-150 w chłoniaku Burkitta. Cechą charakterystyczną chłoniaka Burkitta jest konstytutywna nadekspresja onkogenu MYC, wynikająca z translokacji genu *MYC* z regionem enhancerowym genu kodującego łańcuch ciężki immunoglobulin (*IGH*) [14]. MYC jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję wielu genów, w tym również miRNA [15]. Wykazaliśmy, że ekspresja miR-150 jest hamowana przez MYC w chłoniaku Burkitta, a ektopowa nadekspresja miR-150 silnie spowalniała wzrost komórek chłoniaka Burkitta. W celu identyfikacji genów docelowych miR-150 zastosowaliśmy procedurę immunoprecypitacji RNA przy użyciu przeciwciała anti-AGO2 (AGO2-RIP) w komórkach chłoniaka Burkitta z nadekspresją miR-150. Technika ta pozwala na uzyskanie frakcji RNA oddziałujących z miRNA związanymi z białkiem AGO2, kluczowym komponentem kompleksu wyciszającego. Następnie dzięki analizie mikromacierzowej lub sekwencjonowaniu nowej generacji zidentyfikowane są transkrypty oddziałujące z miRNA. Zidentyfikowaliśmy m. in. *MYB*, znany gen regulowany przez miR-150 [16], oraz dwa nowe geny – *ZDHHC11* i *ZDHHC11B*. Te wysoce homologiczne geny ulegają transkrypcji zarówno na mRNA kodujące białko, jak i długie niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA). *ZDHHC11* i *ZDHHC11B* mają znacznie podwyższoną ekspresję w chłoniakach z komórek B i zawierają niespotykane wysoką liczbę miejsc wiązania miR-150, odpowiednio 18 i 62. Wśród niekodujących transkryptów zidentyfikowaliśmy kolisty RNA *ZDHHC11*, który najsilniej oddziałuje z miR-150, co sugeruje jego potencjalną rolę jako „gąbka” lub kompetytywnej RNA (ang. *competing endogenous RNA*, ceRNA), odciągający miR-150 od innych jego genów docelowych. Aby stwierdzić, czy *ZDHHC11* i *ZDHHC11B*

są istotne dla wzrostu komórek nowotworowych wyciszyliśmy ich ekspresję w dwóch liniach chłoniaka Burkitta. Spowodowało to znaczące zahamowanie wzrostu komórek, a przy tym zaobserwowaliśmy obniżony poziom MYB. Wyciszenie MYB skutkowało jeszcze silniejszym zahamowaniem wzrostu komórek, porównywalnym z efektem obserwowanym po wyciszeniu MYC lub nadekspresji miR-150, potwierdzając że jest on niezbędny dla proliferacji komórek chłoniaka Burkitta. Badania te zostały opisane w pracy: **Dzikiewicz-Krawczyk A, Kok K, Slezak-Prochazka I, Robertus JL, Bruining J, Tayari MM, Rutgers B, de Jong D, Koerts J, Seitz A, Li J, Tillema B, Guikema JE, Nolte IM, Diepstra A, Visser L, Kluiver J, van den Berg A. ZDHHC11 and ZDHHC11B are critical novel components of the oncogenic MYC-miR-150-MYB network in Burkitt lymphoma. Leukemia. 2017; 31(6):1470-1473.**

Uzyskane wyniki wskazują na nową onkogeną sieć promującą proliferację komórek chłoniaka Burkitta, obejmującą MYC, miR-150, ZDHHC11, ZDHHC11B i MYB. Wykazaliśmy, że MYC zapewnia podwyższony poziom MYB niezbędny dla wysokiej proliferacji poprzez dwa mechanizmy. Po pierwsze, MYC hamuje ekspresję miR-150, co uwalnia MYB spod kontroli przez miR-150. Po drugie, MYC indukuje ekspresję ZDHHC11 i ZDHHC11B, co dalej zapewnia utrzymanie wysokiego poziomu MYB, prawdopodobnie poprzez niedopuszczenie do oddziaływania pozostałych cząsteczek miR-150 z mRNA MYB. Podsumowując, nasze wyniki wskazują na kluczową rolę ZDHHC11 i ZDHHC11B w utrzymaniu onkogennej osi MYC-miR-150-MYB w chłoniaku Burkitta. Zidentyfikowaliśmy nowy, wcześniej nieopisany onkogeny mechanizm w chłoniaku Burkitta. Jego potencjał terapeutyczny jest dalej badany w ramach grantu przyznanego dr. Joost Kluiver przez fundację Lymph & Co, w którym biorę udział jako wykonawca.

Zastosowana w powyższej pracy technika immunoprecypitacji RNA przy użyciu przeciwciała anti-AGO2 (AGO2-RIP) jest powszechnie stosowana w celu identyfikacji genów docelowych oddziałujących z miRNA [17]. Ze względu na wymagania tej techniki, dotyczące chociażby dużej liczby komórek, jest ona stosowana na liniach komórkowych. Wiadomo jednak, że nowotworowe linie komórkowe mogą znacząco różnić się od materiału pierwotnego pochodzącego od pacjentów. Dlatego w kolejnym projekcie realizowanym w laboratorium prof. van den Berg podjęliśmy próbę globalnej charakterystyki genów docelowych miRNA w pierwotnym materiale od dwóch chorych z chłoniakiem Burkitta oraz w prawidłowych komórkach B wyizolowanych z migdałków trzech osób poddających się tonsillektomii. AGO2-RIP, a następnie analiza mikromacierzowa wykazały znaczne różnice w genach oddziałujących z miRNA w materiale od chorych z chłoniakiem Burkitta i

prawidłowych komórkach B. W przeciwieństwie do prawidłowych komórek B, w chłoniaku Burkitta znaczna część genów docelowych miRNA była regulowana przez onkogenny klaster miR-17~92 i były one głównie zaangażowane w cykl komórkowy i apoptozę. Barwienie immunohistochemiczne na materiale od chorych z chłoniakiem Burkitta i tkance z migdałków potwierdziło zmieniony poziom białek kodowanych przez dwa z sześciu wybranych genów docelowych miRNA – NEDD9 i KAT7 – zgodnie z różnicami obserwowanymi w AGO2-RIP. Porównaliśmy też geny oddziałujące z miRNA zidentyfikowane w pierwotnym materiale i w liniach komórkowych chłoniaka Burkitta, co wskazało znaczące różnice pomiędzy materiałem pierwotnym a liniami komórkowymi. Wyniki te zostały opublikowane w pracy: **Dzikiewicz-Krawczyk A, Diepstra A, Rutgers B, Kortman G, de Jong D, Koerts J, Bulthuis M, van der Sluis T, Seitz A, Visser L, Kok K, Kluiver J, van den Berg A. Argonaute 2 RNA Immunoprecipitation Reveals Distinct miRNA Targetomes of Primary Burkitt Lymphoma Tumors and Normal B Cells. Am J Pathol. 2018; 188(5):1289-1299.**

W pracy tej po raz pierwszy wykazaliśmy możliwość wykonania procedury AGO2-RIP na mrożonych próbkach tkanek guza, co wskazuje na nowe perspektywy badania genów regulowanych przez miRNA w materiale pierwotnym. W świetle znaczących różnic w porównaniu z liniami komórkowymi, nasze wyniki wskazują, że badanie oddziaływań miRNA z genami docelowymi w pierwotnym materiale od chorych jest wysoce wskazane i technicznie możliwe.

Szereg badań wskazało na zmienione profile ekspresji miRNA w nowotworach hematologicznych [18]. Wciąż jednak nie poznano w pełni, które spośród miRNA o zaburzonej ekspresji są istotne dla wzrostu i przetrwania komórek nowotworowych. Aby to ocenić, można sprawdzić wpływ nadekspresji lub inhibicji miRNA na wybrane cechy komórek nowotworowych, takie jak proliferacja, apoptoza czy inwazyjność. W przypadku, gdy chcemy przebadać kilkanaście lub kilkadziesiąt miRNA, wymagałoby to dużo czasu. Alternatywnie, można zastosować wysokoprzepustowe badanie przesiewowe, gdzie komórki transdukowane są biblioteką lentiwirusowych wektorów do inhibicji lub nadekspresji RNA, a następnie przy pomocy sekwencjonowania nowej generacji określone są zmiany w liczbie komórek zawierających dany konstrukt w trakcie hodowli [19]. Umożliwia to szybsze wyłonienie miRNA wpływających na wzrost komórek nowotworowych, a zatem interesujących kandydatów do dalszych badań funkcjonalnych. W pracy: **Yuan Y, Niu F, Nolte IM, Koerts J, de Jong D, Rutgers B, Osinga J, Azkanaz M, Terpstra M, Bystrykh L, Diepstra A, Visser L, Dzikiewicz-Krawczyk A, Kok K, Kluiver J, van den Berg A.**

MicroRNA High Throughput Loss-of-Function Screening Reveals an Oncogenic Role for miR-21-5p in Hodgkin Lymphoma. Cell Physiol Biochem. 2018; 49(1):144-159,

zastosowaliśmy takie wysokoprzepustowe podejście do identyfikacji onkogennych miRNA w chłoniaku Hodgkina. W pierwszym etapie skonstruowaliśmy bibliotekę lentiwirusową zawierającą konstrukty do inhibicji 63 miRNA i 5 kontrolnych konstruktów. Biblioteka ta została użyta do transdukcji trzech linii chłoniaka Hodgkina w duplikacie. Zidentyfikowaliśmy cztery inhibitory miRNA, których liczebność w puli komórek zmniejszyła się w każdej linii komórkowej w przynajmniej jednej transdukcji: miRZIP-449a-5p, miRZIP-625-5p, miRZIP-let-7f-2-3p i miRZIP-21-5p. Opierając się na wcześniej opublikowanych własnych wynikach sekwencjonowania nowej generacji miRNA [20], stwierdziliśmy że spośród powyższych miRNA, miR-21-5p ma najwyższą ekspresję w komórkach chłoniaka Hodgkina, istotnie wyższą niż w prawidłowych komórkach B. Wpływ inhibicji miR-21-5p na wzrost komórek chłoniaka Hodgkina potwierdziliśmy testem kompetycyjnego wzrostu we wszystkich trzech liniach komórkowych użytych w badaniu przesiewowym. Dalsza analiza wykazała, że inhibicja miR-21-5p zwiększa odsetek komórek ulegających apoptozie, nie ma natomiast wpływu na cykl komórkowy. Posługując się wcześniej opublikowanymi własnymi wynikami AGO2-RIP w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina [20], wśród genów oddziałujących z miRNA zidentyfikowaliśmy 26 genów będących potwierdzonymi genami docelowymi miR-21-5p oraz 13 przewidywanych. Analiza Gene Ontology wykazała, że 1/3 tych genów zaangażowana jest w proliferację lub apoptozę. Spośród nich, *PEL11* i *BTG2* wykazywały najwyższą ekspresję w prawidłowych komórkach B i znacznie obniżony poziom w komórkach chłoniaka Hodgkina. Dla obu genów potwierdziliśmy ich interakcję z miR-21-5p za pomocą systemu reporterowego lucyferazy. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy znacznie wyższy poziom białka PEL11 w dwóch liniach chłoniaka Hodgkina po inhibicji miR-21-5p.

Podsumowując, zastosowane przez nas podejście wysokoprzepustowego badania przesiewowego pozwoliło na identyfikację czterech miRNA o onkogennej funkcji w chłoniaku Hodgkina. Dalsze eksperymenty wskazały miR-21-5p jako czynnik chroniący komórki chłoniaka Hodgkina przed apoptozą. Rola miR-21-5p nie była wcześniej opisana w chłoniaku Hodgkina. Uzyskane wyniki wykazały wysoką przydatność wysokoprzepustowych badań przesiewowych do identyfikacji miRNA o funkcjonalnym znaczeniu w nowotworach hematologicznych.

Najważniejsze wyniki uzyskane podczas opisanych badań oraz ich możliwe zastosowanie:

1. Zidentyfikowaliśmy pięć polimorfizmów w miejscach wiązania miRNA powiązanych z ryzykiem białaczek. Dla trzech z nich potwierdziliśmy ich wpływ na wiązanie miRNA. Opisane polimorfizmy mają potencjał zastosowania w praktyce klinicznej jako markery ryzyka rozwoju białaczki.
2. Zidentyfikowaliśmy nowy, wcześniej nieopisany onkogeny mechanizm w chłoniaku Burkitta, w którym kluczową rolę w utrzymaniu onkogennej osi MYC-miR-150-MYB pełnią geny *ZDHHC11* i *ZDHHC11B*. Potencjał terapeutyczny tego odkrycia jest dalej badany w ramach grantu przyznanego dr. Joost Kluiver przez fundację Lymph & Co, w którym biorę udział jako wykonawca.
3. Po raz pierwszy wykazaliśmy możliwość wykonania procedury AGO2-RIP na mrożonych próbkach tkanek guza, co wskazuje na nowe perspektywy badania genów regulowanych przez miRNA w materiale pierwotnym. Zwłaszcza w świetle znaczących różnic w porównaniu z liniami komórkowymi, nasze wyniki wskazują, że badanie oddziaływań miRNA z genami docelowymi w pierwotnym materiale od chorych jest wysoce wskazane i technicznie możliwe.
4. Przy użyciu wysokoprzepustowego badania przesiewowego dla inhibicji miRNA zidentyfikowaliśmy cztery miRNA o onkogennej funkcji w chłoniaku Hodgkina. Wykazaliśmy, że jeden z nich, miR-21-5p, chroni komórki chłoniaka Hodgkina przed apoptozą. Zidentyfikowaliśmy dwa regulowane przez miR-21-5p geny, *PELI1* i *BTG2*, prawdopodobnie odpowiedzialne za obserwowany efekt inhibicji miR-21-5p na wzrost komórek. Zarówno miR-21-5p jak i *PELI1* i *BTG2* mogą stanowić potencjalne nowe cele terapii w chłoniaku Hodgkina.

VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostałe kierunki prowadzonych przez mnie badań, poza opisanym osiągnięciem, obejmują następujące główne obszary zainteresowań:

1. Powiązanie mutacji i polimorfizmów w genach zaangażowanych w naprawę złamań DNA z nowotworami.

Utrzymanie integralności genomu jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania i przeżycia organizmów. W celu wyeliminowania szkodliwych skutków uszkodzeń DNA, komórki rozwinęły szybką i skuteczną odpowiedź. Najniebezpieczniejszym typem uszkodzeń

DNA są złamania dwuniciowego DNA, wywoływane m. in. przez promieniowanie jonizujące. W rozpoznaniu i naprawę złamań DNA zaangażowanych jest szereg białek, wśród których kluczową rolę pełni kompleks MRN (MRE11-RAD50-NBN), kinaza ATM oraz histon H2AX [21]. Mutacje i polimorfizmy w genach kodujących te białka mogą negatywnie wpływać na ich funkcje, tym samym przyczyniając się do niestabilności genomowej i rozwoju nowotworów.

W pracy doktorskiej podjęłam się oceny funkcjonalnych konsekwencji heterozygotycznych wariantów w genie *NBN* na funkcje kodowanego białka, nibryny. Dotychczasowe badania w niejednoznaczny sposób wskazywały na powiązanie heterozygotycznych mutacji c.657-661del, p.I171V and p.R215W z ryzykiem nowotworów. Nie było jednak wiadomo, czy i do jakiego stopnia wpływają one na funkcje nibryny. W ramach kierowanego przeze mnie projektu MNiSW N N407 128836 „Badania funkcjonalne heterozygotycznych mutacji genu *NBS1* u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną” wykonaliśmy szereg badań funkcjonalnych w liniach komórkowych wyprowadzonych od chorych z heterozygotycznymi mutacjami w genie *NBN*. Wykazaliśmy, że naprawa dwuniciowych złamań DNA była mniej wydajna w komórkach z heterozygotyczną mutacją c.657-661del (**Dzikiewicz-Krawczyk et al. Mutagenesis. 2012**). Uzyskane wyniki potwierdziły, że heterozygotyczne mutacje w genie *NBN* mogą stanowić czynnik niskiego ryzyka nowotworów, zwłaszcza w połączeniu z mutacjami w innych genach lub w szczególnych warunkach wysokiego zapotrzebowania na wydajną naprawę DNA w zmianach przednowotworowych.

Omawianą tematykę badawczą kontynuowałam we współpracy z dr Marią Mosor oraz dr Martą Podralską. Analiza wybranych fragmentów genów *MRE11*, *RAD50* i *NBN* w grupie 220 dzieci z białaczką i 504 zdrowych dawców wykazała istotne powiązanie polimorfizmu rs17166050 w genie *RAD50* z obniżonym ryzykiem ostrej białaczki u dzieci. Mimo iż rs17166050 zlokalizowany jest w pobliżu miejsca splicingu, nie zaobserwowaliśmy wpływu polimorficznego allelu na splicing pre-mRNA *RAD50*. Analiza allelo-specyficznej ekspresji wykazała istotne różnice pomiędzy ekspresją obu alleli mRNA *RAD50*. Ponadto, potwierdziliśmy wcześniej opisaną wyższą częstość heterozygotycznej mutacji p.I171V u chorych z białaczką (**Mosor et al. BMC Cancer. 2013**).

Innym kluczowym białkiem zaangażowanych w naprawę złamań DNA jest kinaza ATM. Mutacje na obu allelach genu *ATM* są przyczyną zespołu ataksji teleangiektazji (AT) [22]. Aby ocenić spektrum mutacji i wariantów molekularnych w genie *ATM* wśród polskich chorych z AT, przeprowadziliśmy analizę molekularną na materiale od 24 pacjentów z AT.

Wykryliśmy 38 zmian w DNA, z czego większość (76%) stanowiły częste, wcześniej opisane mutacje c.5932G>T, c.6095G>A, c.7630-2A>C i c.7010_7011delGT. 10 wykrytych przez nas zmian nie było wcześniej opisanych. Siedem z nich prowadziło do zamiany aminokwasu lub wprowadzało przedwczesny kodon stop. Dodatkowo, u jednego pacjenta wykryliśmy dużą delecję obejmującą eksony 62 i 63 (**Podralska et al. Mol Genet Genomic Med. 2014**).

Celem kolejnej pracy była ocena powiązania mutacji i polimorfizmów w genach *H2AX*, *ATM* i *MRE11* z ryzykiem raka piersi. Analiza trzech mutacji w genie *ATM*, czterech polimorfizmów w genie *H2AX* i dwóch w genie *MRE11* w polskiej populacji 315 chorych z rakiem piersi i 515 zdrowych dawców wykazała istotne statystycznie powiązanie trzech polimorfizmów w genie *H2AX* (rs7759, rs8551 i rs2509049) z podwyższonym ryzykiem raka piersi. Ryzyko wzrastało wraz z rosnącą liczbą alleli ryzyka powyższych trzech polimorfizmów i w przypadku współwystępowania czterech lub więcej alleli ryzyka było 1,7 razy wyższe od ryzyka populacyjnego (**Podralska et al. BMC Cancer. 2018**).

2. Genetyczne aspekty chorób autoimmunologicznych

W ostatnich latach współpracowałam też z dr Magdaleną Żurawek przy badaniach dotyczących genetycznego podłoża cukrzycy typu 1 i pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy, zwanej też chorobą Addisona. Są to choroby wynikające z zaburzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu, czego konsekwencją jest proces autoimmunizacyjny. Cukrzyca typu 1 rozwija się w wyniku zniszczenia komórek beta trzustki przez autoreaktywne komórki jednojądrzaste, co prowadzi do niedoboru insuliny i wymaga dożywotniej suplementacji tym hormonem. Przyczyną choroby Addisona jest autoimmunologiczne zniszczenie kory nadnerczy i konieczna jest regularna substytucja glukokortykosteroidami i mineralokortykosteroidami. W etiologii obu chorób rolę odgrywają zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne; najsilniejszy związek w przypadku obu chorób zaobserwowano z haplotypami głównego układu zgodności tkankowej [23, 24]. Podjęte badania miały na celu identyfikację nowych czynników ryzyka dla cukrzycy typu 1 i choroby Addisona w kontekście nieswoistej odpowiedzi immunologicznej.

Cytoplazmatyczna helikaza *IFIH1* aktywuje szlak sygnałowy interferonu I w odpowiedzi na infekcję wirusową. Niewłaściwa aktywacja *IFIH1* sprzyja rozwojowi środowisk zapalnego i pośrednio może przyczyniać się do autoagresji immunologicznej. Ponieważ patogenezą cukrzycy typu 1 jest silnie związana z czynnikami wirusowymi, sprawdziliśmy czy warianty polimorficzne genu *IFIH1* związane są z ryzykiem cukrzycy typu 1. Analiza częstości czterech SNP: rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767 w grupie

514 chorych z cukrzycą i 713 zdrowych dawców wykazała asocjację wszystkich badanych polimorfizmów z ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 1. Ponadto, wykazaliśmy addytywny efekt wariantów polimorficznych genu *IFIH1*: podczas gdy iloraz szans (OR) wystąpienia cukrzycy dla pojedynczych alleli ryzyka wynosił od 1,336 do 1,799, u nosicieli >6 alleli ryzyka wzrastał do 3,13 (**Zurawek et al. Diabetes Res Clin Pract. 2015**).

W aktywacji szlaku sygnałowego interferonu I, helikaza *IFIH1* oddziałuje z przezbłonowym białkiem mitochondrialnym MAVS. Wykazano, że zaburzenia ekspresji lub struktury białka MAVS mogą prowadzić do autoagresji układu immunologicznego [25]. W kolejnej pracy postanowiliśmy więc zbadać związek czterech polimorfizmów: rs17857295, rs7262903, rs45437096 i rs7269320 w genie *MAVS* z cukrzycą typu 1 i chorobą Addisona. Żaden z badanych polimorfizmów nie wykazywał istotnej statystycznie asocjacji z ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 1 ani choroby Addisona (**Zurawek et al. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017**).

Innym czynnikiem, który może odgrywać rolę w procesie autoimmunizacji, są miRNA. Celem kolejnej pracy była identyfikacja miRNA o zmienionej ekspresji w cukrzycy typu 1. Globalna mikromacierzowa analiza ekspresji miRNA w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów pediatrycznych z cukrzycą typu 1 (n=15) w porównaniu ze zdrowymi dziećmi (n=3) wykazała 24 miRNA o podwyższonej i 67 miRNA o obniżonej ekspresji, z czego dla 8 miRNA różnice były przynajmniej dwukrotne. Spośród nich tylko miR-487a-3p wykazywał podwyższoną ekspresję, co zostało potwierdzone przy pomocy ilościowego PCR w czasie rzeczywistym na rozszerzonej grupie pacjentów (n=28) i zdrowych dawców (n=28). Aby zidentyfikować potencjalnie regulowane przez miR-487a-3p geny zaagnazowane w nieswoistą odpowiedź immunologiczną, przeprowadziliśmy analizę miejsc wiązania miR-487a-3p *in silico* przy użyciu algorytmów TargetScan, miRWALK 2.0 i PITA. Geny *CTLA4*, *FOXO3*, *MARCH5* i *PTPN2* zostały wskazane jako przewidywane geny docelowe miR-487a-3p. Aby zweryfikować wiązanie miR-487a-3p do 3'UTR tych genów, przeprowadziliśmy test reporterowy lucyferazy, który potwierdził oddziaływanie miR-487a-3p z mRNA *CTLA4* i *FOXO3*. Oba geny są istotne dla tolerancji immunologicznej, a ich represja przez miR-487a-3p może przyczyniać się do rozwoju autoimmunizacji (**Zurawek et al. Diabetes Res Clin Pract. 2018**). Analiza wyników mikromacierzy wśród chorych z cukrzycą z ciężkim przebiegiem, manifestowanym kwasicą ketonową, w porównaniu z chorymi o łagodnym przebiegu choroby, wykazała podwyższoną ekspresję miR-652-5p w pierwszej grupie. Obserwacja ta została potwierdzona przy pomocy ilościowego PCR na rozszerzonej grupie chorych. Analiza *in silico* wskazała *ADAR* i *MARCH5* jako geny

potencjalnie regulowane przez miR-652-5p, jednak test reporterowy lucyferazy nie potwierdził oddziaływania miR-652-5p z 3'UTR tych genów. Wskazane jest dalsze poszukiwanie genów regulowanych przez miR-652-5p, o znaczeniu w procesach autoimmunologicznych (**Zurawek et al. Clin Diabetol. 2018**).

3. Rola niekodujących sekwencji genomu w patogenezie nowotworów oraz podstawowych procesach komórkowych.

Aktualnie moje zainteresowania badawcze skupiają się wokół poznawania roli niekodujących sekwencji genomu (miRNA, lncRNA, eRNA, wzmacniacze transkrypcji, promotory i miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych) w patogenezie nowotworów oraz podstawowych procesach komórkowych. Podczas dwuletniego stażu podoktorskiego w University Medical Center Groningen w Holandii byłam głównym wykonawcą grantu „Identification of MYC-regulated lncRNAs that are critically involved in the pathogenesis of Burkitt lymphoma using a high throughput loss of function screen”. MYC jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję wielu genów, w tym także miRNA i długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA). Dodatkowo, niekodujące RNA mogą również wpływać na ekspresję i funkcje MYC. Tę skomplikowaną sieć wzajemnych powiązań o fundamentalnym znaczeniu dla wielu nowotworów opisaliśmy w pracy przeglądowej (**Swier, Dzikiewicz-Krawczyk et al. Mol Oncol. 2018**). Mimo coraz większej wiedzy o lncRNA regulowanych przez MYC, w chłoniaku Burkitta jak dotąd opisano tylko rolę jednego lncRNA [26], stąd konieczność dalszych badań w tym kierunku. Na potrzeby projektu skonstruowałam lentiwirusową bibliotekę zawierającą 48 short-hairpin RNA (shRNA) do wyciszenia 16 lncRNA aktywowanych przez MYC, wybranych na podstawie wcześniejszych analiz. Przy pomocy tej biblioteki zidentyfikowaliśmy w trzech liniach komórkowych chłoniaka Burkitta 8 transkryptów lncRNA istotnych dla wzrostu komórek. Obecnie jestem ko-promotorem pracy doktorskiej wykonywanej w grupie prof. van den Berg przez Fubiao Niu, w której kontynuowane są badania funkcjonalne dla trzech lncRNA o najsilniejszym wpływie na wzrost komórek chłoniaka Burkitta. Uzyskane dotąd wyniki wyraźnie wskazują na kluczową rolę lncRNA aktywowanych przez MYC w patogenezie chłoniaka Burkitta.

Zagadnienie roli MYC i regulowanych przez niego genów w nowotworach kontynuuję po powrocie do Polski. Mimo kluczowej roli MYC w szeregu nowotworów i wielu lat badań, wciąż nie opracowano skutecznej terapii nakierowanej na MYC. Brak też wszechstronnej analizy genów bezpośrednio regulowanych przez MYC o kluczowym znaczeniu dla różnych nowotworów. Celem kierowanego przeze mnie projektu realizowanego w ramach **programu**

SONATA NCN (2017-2020), jest kompleksowa identyfikacja funkcjonalnych miejsc wiązania MYC i docelowych genów niezbędnych dla wzrostu komórek nowotworowych przy użyciu innowacyjnego wysokoprzepustowego badania przesiewowego CRISPR/Cas9. Skonstruowaliśmy lentiwirusową bibliotekę naprowadzających RNA (ang. *single guide RNA*, sgRNA) mającą na celu uszkodzenie sekwencji E-box rozpoznawanych przez MYC w czterech liniach komórkowych reprezentujących różne typy nowotworów zależnych od MYC. Analiza NGS zmian w częstości występowania konstruktów sgRNA w trakcie hodowli wskaże miejsca wiązania MYC niezbędne dla wzrostu komórek nowotworowych. Dla wybranych sekwencji E-box i genów docelowych w niezależnych eksperymentach potwierdzimy ich funkcjonalne znaczenie w komórkach nowotworowych. Uzyskane wyniki umożliwią pełniejsze zrozumienie mechanizmów determinujących zależność komórek nowotworowych od MYC i mogą wskazać nowe kierunki potencjalnych terapii celowanych.

W kolejnym kierowanym przeze mnie projekcie „Identyfikacja i funkcjonalna charakterystyka długich niekodujących RNA zaangażowanych w zależną od ATM odpowiedź na uszkodzenia DNA” w ramach **programu OPUS NCN (2018-2021)** połączyłam moje zainteresowania odpowiedzią komórek na uszkodzenia DNA z tematyką lncRNA. Pomimo dużej wiedzy na temat procesów naprawy DNA, szczególnie mechanizmów rozpoznawania i sygnalizowania uszkodzeń DNA wciąż nie są w pełni poznane. W niniejszym projekcie chcemy zweryfikować hipotezę, że długie niekodujące RNA zależne od kinazy ATM są ważnym czynnikiem zaangażowanym w proces rozpoznawania i naprawy uszkodzeń DNA. Zostały postawione trzy cele: identyfikacja lncRNA indukowanych przez napromieniowanie, identyfikacja lncRNA oddziałujących z ATM oraz funkcjonalna charakterystyka wybranych lncRNA w kontekście odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Uzyskane wyniki przyczynią się do poszerzenia wiedzy w zakresie lncRNA zaangażowanych w proces rozpoznawania i naprawy uszkodzeń DNA, a co za tym idzie, do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. Ponadto, wyniki badań funkcjonalnych uzyskane w projekcie mogą też wskazać lncRNA jako nowy czynnik modulujący wrażliwość komórek na radioterapię, co może stanowić wstęp do dalszych zastosowań aplikacyjnych.

W kolejnym, właśnie rozpoczynającym się projekcie pt. „Funkcjonalna analiza regionu regulatorowego genu *IGH* w chłoniakach nieziarniczych z komórek B”, realizowanym w ramach **programu FIRST TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2019-2022)**, planuję zidentyfikować kluczowe elementy w regionie regulatorowym genu *IGH*, odpowiadające za nadekspresję onkogenów w chłoniakach z komórek B. Cechą charakterystyczną chłoniaków nieziarniczych z komórek B są translokacje onkogenów (np.

MYC, *BCL2*) z regionem regulatorowym genu kodującego łańcuch ciężki immunoglobuliny (IGH). Proliferacja wielu chłoniaków zależna jest od ekspresji powyższych onkogenów i ścieżek sygnałowych receptora komórek B (BCR), który ulega ekspresji z drugiego, funkcjonalnego allelu *IGH*. Elementy regulatorowe w genie *IGH* były badane w rozwoju prawidłowych komórek B, ale ich rola w komórkach nowotworowych nie została określona. Celem projektu jest identyfikacja i charakterystyka funkcjonalnych elementów w regionie regulatorowym *IGH* oraz enhancerowych RNA (eRNA) niezbędnych do wzrostu komórek chłoniaków B-komórkowych. W projekcie przeprowadzimy badanie przesiewowe CRISPR/Cas9, aby ustalić kluczowe elementy w regionie regulatorowym *IGH*. Równocześnie zastosujemy sekwencjonowanie GRO-seq w celu identyfikacji eRNA w locus *IGH*. Uzyskane wyniki i dalsze badania funkcjonalne pozwolą na identyfikację elementów regulatorowych i eRNA niezbędnych dla wzrostu komórek chłoniaka. Projekt pogłębi naszą wiedzę na temat roli regionów regulatorowych genu IGH w nowotworach i może wskazać nowe cele terapeutyczne w chłoniakach z komórek B. Projekt jest realizowany we współpracy z prof. Anke van den Berg, dr Joost Kluiver i dr Jeroen Guikema z Holandii oraz prof. Iannis Aifantis z USA.

Opisane powyżej badania w nurcie niekodujących sekwencji genomu realizuję jako kierownik (od listopada 2018) Samodzielnej Grupy Badawczej Funkcji Niekodujących Części Genomu w Instytucie Genetyki Człowieka PAN.

Podsumowanie

Jestem autorką 21 prac naukowych oraz 10 doniesień zjazdowych, brałam lub biorę udział w realizacji 10 projektów badawczych, w tym 5 jako kierownik. Opiekowałam się studentami na etapie pracy licencjackiej, dyplomowej i magisterskiej. Jestem ko-promotorem pracy doktorskiej wykonywanej w University Medical Center Groningen w Holandii. Obecnie jestem opiekunem naukowym jednego doktoranta, a od stycznia 2019 r. dwoje kolejnych doktorantów rozpocznie pracę naukową pod moją opieką. Od listopada 2018 r. jestem kierownikiem Samodzielnej Grupy Badawczej Funkcji Niekodujących Sekwencji Genomu w Instytucie Genetyki Człowieka PAN.

Poznań, 18 grudnia 2018

A. Szikiewicz-Kwasyk

Piśmiennictwo

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20):2375-90.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391-2405.
3. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2014; 431: 350-355.
4. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(8):509-24.
5. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42:D68-D73.
6. Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A. MicroRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clin Genet*. 2010; 77:306-313.
7. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*. 2012; 97(2):160-7.
8. Montagner S, Dehó L, Monticelli S. MicroRNAs in hematopoietic development. *BMC Immunol*. 2014; 15:14.
9. Lawrie CH. MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood Rev*. 2013;27: 143-154.
10. Kotaki R, Koyama-Nasu R, Yamakawa N, Kotani A. miRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7):1495.
11. Wang X, Zhu B, Huang Z, Chen L, He Z, Zhang H. MicroRNAs as biomarkers in leukemia. *Stem Cell Investig*. 2014; 1:11.
12. Fernandez-Mercado M, Manterola L, Lawrie CH. MicroRNAs in Lymphoma: Regulatory Role and Biomarker Potential. *Curr Genomics*. 2015; 16(5):349-58.
13. Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle*. 2008; 7(7): 853-858.
14. Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM. Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014; 4(2).
15. Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008;40(1):43-50.
16. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007; 131: 146-59.

17. Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OC, Poppema S, Kroesen BJ, Kok K, van den Berg A. A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2009 Nov;37(20):e137.
18. Gounaris-Shannon S., Chevassut T. The Role of miRNA in Haematological Malignancy. *Bone Marrow Res.* 2013; Article ID 269107.
19. Lemons D, Maurya MR, Subramaniam S, Mercola M. Developing microRNA screening as a functional genomics tool for disease research. *Front Physiol.* 2013; 4: 223.
20. Yuan Y, Kluiver J, Koerts J, de Jong D, Rutgers B, et al. miR-24-3p Is Overexpressed in Hodgkin Lymphoma and Protects Hodgkin and Reed-Sternberg Cells from Apoptosis. *Am J Pathol.* 2017; 187(6): 1343-1355.
21. Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr.* 2010; 1(1): 15.
22. Rothblum-Oviatt, C. et al. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis.* 2016; 11: 159.
23. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006; 103: 4074-9.
24. Gombos Z, Hermann R, Kiviniemi M, Nejentsev S, Reimand K, Fadeyev V, et al. Analysis of extended human leukocyte antigen haplotype association with Addison's disease in three populations. *European journal of endocrinology /European Federation of Endocrine Societies.* 2007; 157: 757-61.
25. Buskiewicz IA, Koenig A, Huber SA, Budd RC. Caspase-8 and FLIP regulate RIG-I/MDA5-induced innate immune host responses to picornaviruses. *Future virology.* 2012; 7: 1221-36.
26. Doose G, Haake A, Bernhart SH, et al. MINCR is a MYC-induced lncRNA able to modulate MYC's transcriptional network in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112(38): E5261-70.