

A u t o r e f e r a t

„Poszukiwanie podłoża molekularnego chorób tytoniozależnych”

Dr n. med. Iwona Ziółkowska-Suchanek

Instytut Genetyki Człowieka

Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 2021 rok

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Dr n. med. Iwona Ziółkowska-Suchanek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Tytuł magistra inżyniera biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2005 rok

Tytuł pracy magisterskiej: „Określenie częstości występowania heterozygotycznych nosicieli mutacji 657del5 w genie *NBS1* w wybranych regionach województwa wielkopolskiego”.

Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Nowak.

Stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, 2008 rok

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mutacje i polimorfizmy w genie *NBS1* u chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi”

Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Nowak

Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2005 r. – 2009 r.	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk stanowisko: biolog
-------------------	--

2009 r. – 2019 r.	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk stanowisko: adiunkt
-------------------	---

2019 r. – obecnie	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk stanowisko: asystent
-------------------	--

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów (oznaczonych jako H1 - H5) opublikowanych w recenzowanych czasopismach w latach 2013-2021. Łączna wartość współczynnika Impact Factor (IF) tych prac wynosi **26,397** oraz **385** punktów ministerialnych (Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW). Cztery artykuły stanowią prace badawcze dotyczące poszukiwania podłoża molekularnego chorób tytoniozależnych oraz wpływu hipoksji na właściwości komórek

nowotworowych. Jedna publikacja stanowi pracę przeglądową w której zebrałam dostępne w piśmiennictwie dane na temat modeli badawczych wykorzystywanych do analizy mikrośrodowiska raków płuc, zwłaszcza w kontekście niedotlenienia. W każdej z prac, wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, jestem pierwszym i korespondującym autorem.

H1. Ziółkowska-Suchanek I*, Mosor M, Wierzbicka MG, Rydzanicz MG, Baranowska M, Nowak J. The MRN protein complex genes: *MRE11* and *RAD50* and susceptibility to head and neck cancers.

Mol Cancer. 2013; 12 (1): 113.

IF₂₀₁₃ = 5,397

MNiSW₂₀₁₃ = 35

H2. Ziółkowska-Suchanek I*, Mosor M, Gabryel P, Grabicki M, Żurawek M, Fichna M, Strauss E, Batura-Gabryel H, Dyszkiewicz W, Nowak J. et al. Susceptibility loci in lung cancer and COPD: association of *IREB2* and *FAM13A* with pulmonary diseases.

Sci Rep. 2015; 5: 13502.

IF₂₀₁₅ = 5,228

MNiSW₂₀₁₅ = 40

H3. Ziółkowska-Suchanek I*, Mosor M, Podralska M, Iżykowska K, Gabryel P, Dyszkiewicz W, Słomski R, Nowak J. *FAM13A* as a Novel Hypoxia-Induced Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. J Cancer. 2017; 8 (19): 3933-3938.

IF₂₀₁₇ = 3,249

MNiSW₂₀₁₇ = 30

H4. Ziółkowska-Suchanek I*, Podralska I, Żurawek M, Łaczmąńska J, Iżykowska K, Dzikiewicz-Krawczyk A, Rozwadowska N. Hypoxia-Induced *FAM13A* Regulates the Proliferation and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells.

Int J Mol Sci. 2021; 22 (9): 4302.

IF₂₀₂₁ = 5,923

MNiSW₂₀₂₁ = 140

H5. Ziółkowska-Suchanek I*. Mimicking Tumor Hypoxia in Non-Small Cell Lung Cancer Employing Three-Dimensional In Vitro Models.

Cells. 2021; 10 (1): 141.

IF₂₀₂₁ = 6,6

MNiSW₂₀₂₁ = 140

*autor korespondujący

Szczegółowy opis mojego wkładu w powstanie każdej z prac jest zawarty w załączniku nr 4A. Udział głównych współautorów publikacji oraz mój zawarty jest w oświadczeniach zebranych w załączniku nr 6.

Tytuł osiągnięcia: „Poszukiwanie podłoża molekularnego chorób tytoniozależnych”

Wstęp

Choroby płuc i nowotwory etiologicznie związane z paleniem tytoniu stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów i stanowią poważny problem epidemiologiczny. Przedmiotem mojej pracy badawczej jest podłoże molekularne chorób tytoniozależnych, obejmujących przewlekłą obturacyjną chorobę płuc oraz nowotwory lite takie jak rak płuc, krtani, mnogie nowotwory pierwotne krtani oraz regionu głowy i szyi.

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) charakteryzuje się słabo odwracalnym ograniczeniem przepływu powietrza w drogach oddechowych, które zazwyczaj ma charakter postępujący. POChP spowodowana jest głównie paleniem tytoniu (średnio 80–90% chorych), które wytwarzając reaktywne formy tlenu, wywołuje przewlekły stan zapalny w płucach. 5-letnie przeżycia chorych na POChP wynoszą od 56% do 92% w zależności od ciężkości choroby. W Polsce POChP odpowiada za około 15 tys. zgonów rocznie, a objawy kliniczne POChP obserwuje się u około 10% populacji [1]. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), opublikowanego w 2020 roku, POChP i rak płuca są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, zajmując odpowiednio trzecie i szóste miejsce.

Rak płuc stanowi najczęściej diagnozowany nowotwór u mężczyzn i jest przyczyną największej liczby zgonów w grupie nowotworów (1,8 mln zgonów w 2020 r.). Według szacunków Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem, prowadzonych w ramach programu GLOBOCAN, rak płuc zdiagnozowano u 2,2 miliona chorych [2]. Gruczolakorak jest histologicznym podtypem niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. *Non-small cell lung cancer* - NSCLC), najczęściej diagnozowanym zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Pomimo stosowania nowatorskich rozwiązań terapeutycznych, 5-letnie przeżycia chorych z NSCLC wynoszą zaledwie 5-15% [3]. Niski wskaźnik przeżycia jest związany z późnym wykryciem choroby, będącej zazwyczaj w zaawansowanym stadium w momencie rozpoznania.

Kolejną jednostką chorobową zaliczaną do nowotworów tytoniozależnych jest rak krtani (ang. *Larynx cancer* - LC). Według szacunków uzyskanych w ramach programu GLOBOCAN, w 2020 roku na świecie, rozpoznano około 185 tys. nowych przypadków [2]. W Polsce, dane statystyczne wskazują na spadek liczby zachorowań, jednakże wskaźniki przeżywalności nie ulegają poprawie [4]. U 99,6% polskich chorych, stwierdza się raki płaskonabłonkowe. Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w leczeniu nowotworów regionu głowy i szyi jest występowanie drugiego lub kolejnego nowotworu pierwotnego (ang. *Multiple Primary Tumors* - MPT). Częstość występowania drugich nowotworów pierwotnych regionu głowy i szyi szacowana jest na 9-36%. Drugie ognisko nowotworowe jest przyczyną zgonu w 71% przypadków, podczas gdy pierwsze ognisko w 15% [5].

W etiologii chorób tytoniozależnych głównym czynnikiem sprawczym jest dym tytoniowy, który stanowi mieszaninę substancji chemicznych, w tym wielu reaktywnych form tlenu i azotu (ang. *reactive nitrogen and oxygen species* – RNOS). RNOS uszkadzają komórki poprzez szereg mechanizmów, powodując uszkodzenie DNA, peroksydację lipidów, utlenianie aminokwasów i utlenianie kofaktorów enzymów. Coraz więcej dowodów potwierdza kluczową rolę stresu oksydacyjnego, generowanego paleniem, w procesach zapalnych i karcynogenezie [6]. Warto zaznaczyć, że dym tytoniowy składa się z ogromnej liczby substancji rakotwórczych (arsen, chrom, nikiel, szereg węglowodorów aromatycznych) z których wiele działa poprzez mechanizmy niepowodujące uszkodzeń oksydacyjnych [7].

Uważa się, że w etiologii chorób tytoniozależnych duże znaczenie ma czynnik genetyczny, regulacja epigenetyczna i zmieniona ekspresja mikroRNA (miRNA), które kształtują indywidualne ryzyko rozwoju choroby. Do cech predysponujących do wystąpienia chorób tytoniozależnych zalicza się m.in. podwyższoną wrażliwość na mutageny, obniżoną wydajność naprawy DNA, deregulację transkrypcji istotnych funkcjonalnie genów oraz zaburzenia elementów regulatorowych [7]. Identyfikacja i charakterystyka tych czynników pozwoli wyjaśnić różną podatność osobniczą na procesy patologiczne związane z paleniem tytoniu.

Jednym z nurtów badawczych będących moim udziałem była analiza wariantów molekularnych genów kompleksu MRE11/RAD50/NBN (MRN) jako czynników ryzyka rozwoju nowotworów. Geny *MRE11*, *RAD50* i *NBN* kodują białka, które tworzą kompleks MRN uczestniczący w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (ang. *double strand breaks* - DSBs), rekombinacji DNA, mejozie i stabilizacji telomerów [8]. Kluczowym białkiem tego kompleksu jest nibryna, która jest produktem białkowym genu *NBN*. Bialleliczne mutacje genu *NBN* są odpowiedzialne za występowanie zespołu niestabilności chromosomowej Nijmegen (ang. *Nijmegen breakage syndrome* - NBS). Potwierdzono wyższą częstość heterozygotycznej mutacji c.657-661del genu *NBN* u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia* - ALL), chłoniakiem nieziarniczym (ang. *non-Hodgkin lymphoma* - NHL), czerniakiem, rakiem prostaty, piersi i jajnika [8]. W badaniach prowadzonych w Zakładzie Patologii Molekularnej, w którym pracuję, wykazano wysoką częstość heterozygotycznej substytucji p.I171V genu *NBN* u dzieci z ALL [9] oraz chorych z rakiem krtani, mnogimi nowotworami pierwotnymi głowy i szyi [10], rakiem piersi [11], jelita grubego [11] oraz rakiem płuc [12]. Oszacowano także częstości polimorfizmów i haplotypów wśród badanych grup chorych i zaobserwowano asocjacje z podwyższonym ryzykiem wystąpienia ALL [13] oraz nowotworów głowy i szyi [14].

W innym nurcie badań, których byłam inicjatorką, skupiono się na poznaniu funkcji genów *IREB2* i *FAM13A* w dwóch chorobach tytoniozależnych: POChP oraz raku płuc. *FAM13A* (MIM 613299) jest genem stosunkowo słabo poznanym. Produkt białkowy tego genu przypuszczalnie pełni rolę w transdukcji sygnałów i aktywuje białka modulujące adhezję komórkową. Uważa się, iż najważniejszą składową białka *FAM13A* jest zlokalizowana na końcu aminowym, domena aktywująca białko Rho, zależna od GTP (ang. *RhoGAP domain*) [15]. Podwyższona aktywność tej domeny jest związana z stresem oksydacyjnym oraz modulacją apoptozy, związanych z powstawaniem chorób nowotworowych i zapalnych płuc. Przypuszcza się, że warianty polimorficzne genu *FAM13A* mogą m. in. zaburzać funkcjonowanie domeny aktywującej RhoGAP, która pełni istotną rolę w procesach przeciwdziałających nowotworzeniu [16]. Liczne badania asocjacyjne całego genomu (ang. *Genome-wide Association Studies* - GWAS) wykazały, że gen *FAM13A* może mieć związek z prawidłowym funkcjonowaniem komórek w płucach oraz występowaniem chorób płuc, zwłaszcza POChP [15, 17].

Równolegle prowadzono badania których celem było określenie udziału genu *IREB2* w występowaniu raka płuc u polskich chorych. Zaburzenia funkcjonowania genu *IREB2* (MIM 147582), regulatora homeostazy żelazowej w komórce, mogą prowadzić do uszkodzeń oksydacyjnych, istotnych w rozwoju rozedmy i raka płuc. Wykazano asocjacje polimorfizmów genu *IREB2* z POChP. Dodatkowo, zwiększoną ekspresję *IREB2* stwierdzono w tkance płucnej pozyskanej od chorych z tą samą jednostką chorobową [18]. Potencjalna rola genu *IREB2* w procesach towarzyszących nowotworzeniu nie jest poznana, dlatego zdecydowano się zająć tą tematyką badawczą.

Przeprowadzone analizy asocjacyjne pozwoliły na określenie znaczenia wariantów polimorficznych genów *FAM13A* i *IREB2* w występowaniu POChP i raka płuc. W kolejnych

badaniach skupiono się nad przesłanką w piśmiennictwie sugerującą, że ekspresja obu genów może być modulowana obniżonym stężeniem tlenu [18, 19]. Niedotlenienie (hipoksja) jest zjawiskiem często obserwowanym w guzach litych i jest złym czynnikiem prognostycznym, gdyż może promować bardziej agresywny fenotyp nowotworu, zdolność do przerzutowania oraz oporność na leczenie. Hipoksja powoduje zmiany w ekspresji genów, a następnie zmiany proteomiczne, które mają wiele istotnych skutków dla różnych funkcji komórkowych i fizjologicznych oraz prowadzą do oporności na terapię. Celem prowadzonych badań było ustalenie czy chroniczna hipoksja wpływa na ekspresję genów *FAM13A* i *IREB2* w rakach płuc. Kontynuacją badań była ocena efektu wyłączenia genu *FAM13A* na właściwości komórek raka płuc.

Cel naukowy cyklu prac

Głównym celem prowadzonych przez mnie badań było poszukiwanie podłoża molekularnego chorób tytoniozależnych. Cel ten został osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

- określenie znaczenia mutacji genów *MRE11* i *RAD50* w występowaniu raka krtani i mnogich nowotworów pierwotnych zlokalizowanych w krtani oraz w regionie głowy i szyi,
- określenie udziału genów *IREB2* i *FAM13A* w występowaniu POChP i raka płuc za pomocą analiz asocjacyjnych,
- ocenę wpływu hipoksji na ekspresję genów *IREB2* i *FAM13A* w niedrobnokomórkowym raku płuc,
- badanie efektu wyłączenia genu *FAM13A* w komórkach raka płuc oraz jego roli w odpowiedzi na hipoksję.

Omówienie prac wchodzących w skład cyklu

H1. Ziółkowska-Suchanek I, Mosor M, Wierzbicka MG, Rydzanicz MG, Baranowska M, Nowak J.
The MRN protein complex genes: MRE11 and RAD50 and susceptibility to head and neck cancers.
Mol Cancer. 2013; 12(1): 113.

Jednym z nurtów badawczych w którym uczestniczyłam była analiza wariantów molekularnych genów kompleksu *MRE11/RAD50/NBN* (MRN) jako czynników ryzyka rozwoju nowotworów tytoniozależnych. Prowadzone prace badawcze miały na celu potwierdzenie roli genów kompleksu MRN w nowotworzeniu. Cel badań był realizowany poprzez określenie częstości mutacji, wariantów molekularnych oraz polimorfizmów genów *MRE11*, *RAD50* i *NBN*. We wcześniejszych badaniach, będących przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej, potwierdziłam znacznie wyższą częstość substytucji p.I171V genu *NBN* w grupie chorych z rakiem krtani i mnogimi nowotworami pierwotnymi krtani w porównaniu do grupy kontrolnej [10]. Uzyskane wyniki skłoniły mnie do poszukiwania wariantów molekularnych w pozostałych genach kompleksu MRN: *MRE11* i *RAD50*, które potencjalnie mogą być czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworów regionu głowy i szyi. Podjęta tematyka badawcza była nowatorska, ponieważ nie było żadnych doniesień w piśmiennictwie na temat roli wybranych podjednostek kompleksu MRN, w występowaniu nowotworów głowy i szyi.

Oznaczono częstości występowania mutacji i polimorfizmów w wybranych fragmentach genów *MRE11* i *RAD50* w grupie chorych z pojedynczym rakiem krtani (RK, n=175), mnogimi nowotworami pierwotnymi z pierwszym lub drugim ogniskiem nowotworowym zlokalizowanym w krtani (MNP-RK, n=115), mnogimi nowotworami pierwotnymi (n=68) głowy i szyi (MNP) oraz grupie zdrowych dawców (GK, n=506). Wybrane fragmenty obu genów zostały wcześniej opisane w piśmiennictwie jako mogące mieć związek z występowaniem nowotworów. Metoda wielotemperaturowego jednoniciowego polimorfizmu konformacyjnego (ang. *multitemperature single-strand conformation polymorphism* - MSSCP) została wykorzystana do analizy sekwencji kodujących i granic ekson-intron eksonów 3, 4, 5, 7, 21 i 25 genu *RAD50* oraz eksonów 5, 8, 9, 10, 14, 15, 17 i 19 genu *MRE11*.

Nie stwierdzono najczęstszych mutacji genów *MRE11* i *RAD50* w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej. Nie zidentyfikowano żadnego wariantu sekwencji w genie *MRE11*, poza intronowym c.1783-86delAG wykrytego u chorych z RK (39/175), w grupie MNP-RK (18/115), MNP (20/68) oraz w GK (61/279). Nie stwierdzono mutacji c.687delT genu *RAD50* wśród 358 pacjentów z rakiem i 506 kontroli. W sekwencji genu *RAD50* zidentyfikowano wariant p.V127I (2/175 RK, 2/506 GK; OR = 2,91; 95% CI 0,41 - 20,85) i wariant p.V315L (2/115 MNP-RK, 1/506 GK; OR = 8,96; 95%CI 0,81-99,68). Oba warianty były zmianami typu *missense*. Analizy SIFT i PolyPhen przewidujące wpływ danej zmiany molekularnej na funkcjonalność białka wykazały, że oba warianty są tolerowane. W intronie 4 genu *RAD50* zidentyfikowano jeden polimorfizm c.551+19G>A (rs17166050), którego genotyp GA był istotnie częstszy w grupie kontrolnej niż w grupie MNP (P = 0,0205), co może wskazywać na efekt ochronny tego wariantu.

Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości wykrytych wariantów molekularnych pomiędzy grupą chorych z nowotworami głowy i szyi w porównaniu do grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki sugerują, że warianty sekwencji nukleotydowej genów *MRE11* i *RAD50* nie stanowią czynnika ryzyka raków krtani i mnogich nowotworów pierwotnych w populacji polskiej. Wykazano, po raz pierwszy, że w przeciwieństwie do innych nowotworów, badane geny prawdopodobnie nie pełnią istotnej roli w etiopatogenezie nowotworów tytoniozależnych.

H2. Ziółkowska-Suchanek I, Mosor M, Gabryel P, Grabicki M, Żurawek M, Fichna M, Strauss E, Batura-Gabryel H, Dyszkiewicz W, Nowak J.

Susceptibility loci in lung cancer and COPD: association of IREB2 and FAM13A with pulmonary diseases.

Sci Rep. 2015; 5 : 13502.

W kolejnym nurcie badań, którego byłam inicjatorką, skupiono się na poznaniu funkcji genów *IREB2* i *FAM13A* w dwóch chorobach tytoniozależnych: POChP oraz raku płuc. W etiopatogenezie POChP i raka płuc uczestniczy wiele genów, jednak podłoże molekularne tych chorób nadal nie jest w pełni poznane. Geny *FAM13A* i *IREB2* nie były dotychczas analizowane u polskich chorych. Badania realizowane były w ramach projektu „Badania asocjacji i ekspresji genów *IREB2* i *FAM13A* jako czynników ryzyka rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc i raka płuc” (grant NCN SONATA 1 którego byłam kierownikiem). Celem prowadzonych badań było określenie udziału genów *IREB2* i *FAM13A* w występowaniu POChP i raka płuc u polskich chorych. Cel badań był realizowany poprzez określenie częstości polimorfizmów genu *FAM13A* (rs1903003, rs7671167, rs2869967) i *IREB2* (rs2568494, rs2656069, rs10851906, rs13180) w grupie 1141 osób (468 z rakiem płuc, 149 z POChP oraz

524 osób zdrowych). Analiza genotypowania wybranych miejsc polimorficznych genów *IREB2* i *FAM13A* została przeprowadzona w oparciu o reakcję PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*) z wykorzystaniem sond *TaqMan*[®]. Porównano częstości genotypów i alleli uzyskane w grupach chorych i w grupie kontrolnej, wykonano analizę haplotypów oraz ocenę ryzyka w zależności od liczby alleli ryzyka (ang. *Cumulative Genetic Risk Score analysis* - CGRS).

Stwierdzono asocjację polimorfizmu rs2869967 genu *FAM13A* z ryzykiem występowania POChP (genotyp CC: $P = 0,0007$, OR = 2,414). Dla polimorfizmów rs1903003 i rs7671167 genu *FAM13A*, zaobserwowano obniżone ryzyko POChP ($P < 0,002$, OR < 0,405). Częstość genotypu AA rs2568494 genu *IREB2*, była wyższa w grupie chorych z RP ($P = 0,0081$, OR = 1,682).

Wyniki genotypowania umożliwiły konstrukcję bloków haplotypowych genów *FAM13A* i *IREB2* oraz określenie ich częstości. Wykazano obecność 6 haplotypów genu *FAM13A* i 7 haplotypów genu *IREB2* w badanych grupach chorych i zdrowych osób. W sumie analiza objęła 8 najczęściej występujących haplotypów (po 4 dla każdego genu). Wykazano podwyższone ryzyko raka płuc dla haplotypu AAAT genu *IREB2* ($P = 0,0021$, OR = 1,513) oraz POChP w przypadku obecności haplotypu TTC genu *FAM13A* ($P = 0,0013$, OR = 1,822).

Dokonano także oceny ryzyka wystąpienia choroby w zależności od liczby alleli ryzyka. Dwa polimorfizmy (rs2568494, rs13180) genu *IREB2* w grupie chorych z rakiem płuc nie wykazały znaczącego wzrostu wartości OR: dla nosicieli ≥ 3 alleli ryzyka OR = 1,5957 (1,1717 - 2,1730). Dla genu *FAM13A* allele ryzyka zostały określone jako T dla polimorfizmów rs13180, rs7671167 oraz A dla rs2568494. Średnia wartość wskaźnika ryzyka wyniosła ($3,54 \pm 1,97$) w grupie chorych z POChP i była znacząco wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,001$). Analiza CGRS wykazała, że ryzyko rozwoju POChP wzrasta wraz z liczbą alleli ryzyka genu *FAM13A*, gdyż dla nosicieli ≥ 5 alleli w grupie chorych z POChP wskaźnik ryzyka (OR) wyniósł 2,998 w porównaniu do osób zdrowych.

Wykazano, że polimorfizmy genu *IREB2* zwiększają ryzyko rozwoju raka płuc, natomiast warianty polimorficzne genu *FAM13A* mogą predysponować do rozwoju POChP. Badaniami objęto dwie jednostki chorobowe co pozwoliło na obserwację, że geny te nie stanowią wspólnego, genetycznego czynnika ryzyka dla POChP i raka płuc. Uzyskane wyniki w przyszłości mogą stanowić punkt odniesienia do oceny ryzyka zaburzeń funkcjonowania płuc i wystąpienia raka płuc w przypadku obecności wariantów genów *IREB2* i *FAM13A*, co pozwoli na zastosowanie działań prewencyjnych i opracowanie programu monitorowania chorych.

H3. Ziółkowska-Suchanek I, Mosor M, Podralska M, Iżykowska K, Gabryel P, Dyszkiewicz W, Słomski R, Nowak J.

FAM13A as a Novel Hypoxia-Induced Gene in Non-Small Cell Lung Cancer.

J Cancer. 2017; 8 (19): 3933-3938.

Wyniki przedstawione w poprzedniej pracy oraz jedno doniesienie w piśmiennictwie były podstawą do podjęcia badań mających na celu ocenę wpływu hipoksji na ekspresję genów *IREB2* i *FAM13A* w niedrobnokomórkowym raku płuc. Cel badań był realizowany poprzez porównanie poziomu ekspresji, na poziomie mRNA, genów *FAM13A* i *IREB2* w liniach NSCLC i prawidłowych komórek płuc oraz wycinków guzów płuc, hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i hipoksji. Dodatkowo, określono wpływ hipoksji na ilość produktu białkowego badanych genów.

Materiał do badań stanowiły trzy linie komórkowe: A549 (NSCLC), CORL-105 (NSCLC) oraz HL (fibroblasty pozyskane z płuc od zdrowego dawcy), pozyskane z bazy ECACC (ang. *The European Collection of Cell Cultures*). Wycinki guzów płuc pozyskano od dziewięciu

chorych z NSCLC. W sumie przebadano 37 fragmentów guzów (17 hodowano w hipoksji, 20 w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu). Komórki linii oraz wycinki hodowano przez trzy dni w 37°C w atmosferze 21% i 1% stężenia tlenu. Minimum 3 niezależne doświadczenia zostały przeprowadzone dla każdej z linii. Oceny ekspresji genów *FAM13A*, *IREB2*, *HIF1α* i *GUSB* (gen referencyjny) dokonano w oparciu o reakcję PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond *TaqMan*. Gen *HIF1α* został włączony do badań jako marker hipoksji. Dodatkowo, przy użyciu metody *Western Blot* określono ilość białka *FAM13A* i *IREB2*.

Zaobserwowano znaczące podwyższenie poziomu mRNA genu *FAM13A* w liniach NSCLC (A549, CORL-105; $P < 0,001$) oraz linii prawidłowych fibroblastów (HL; $P < 0,001$). Wartość wskaźnika zmiany ekspresji (ang. *expression fold change value* - FCh) wyznaczono na podstawie metody $FCh = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdzie wartość była skorygowana względem genu referencyjnego w stosunku do normoksji. Wartości FCh > 2 , były definiowane jako nadekspresja, podczas gdy $< 0,5$ obniżenie ekspresji.

Wartość wskaźnika zmiany ekspresji dla genu *FAM13A* była wyższa w przypadku linii nowotworowych, gdyż wyniosła 3,1 dla linii A549 oraz 54,8 dla linii CORL-105, a w linii prawidłowych fibroblastów płuc HL wyniosła 2,3. Nadekspresję białka *FAM13A* potwierdzono w dwóch liniach NSCLC oraz w linii HL po hipoksji. Znaczący wzrost ekspresji *FAM13A* na poziomie mRNA stwierdzono także w wycinkach guzów płuc po ekspozycji na hipoksję ($P = 0,0004$; 6/9 próbek guzów). Analiza ekspresji mRNA genu *IREB2* wykazała istotne obniżenie po ekspozycji na hipoksję w linii A549 (FCh = 0,36; $P < 0,0001$). Spadek ekspresji zaobserwowano także na poziomie białka w analizie *Western Blot* linii A549 w dwóch niezależnych eksperymentach. W analizie wycinków guzów nie stwierdzono znaczących różnic.

Analiza ekspresji genu *HIF1α* nie wykazała znaczących różnic po hipoksji, w przypadku linii komórkowych oraz wycinków guzów, co wskazuje, że ten gen nie jest właściwym markerem chronicznej hipoksji.

W naszych badaniach, po raz pierwszy dokonano oceny wpływu hipoksji na ekspresję genów *IREB2* i *FAM13A* w NSCLC, zarówno w badaniach *in vitro* jak i wycinkach guzów płuc, hodowanych *ex vivo*. Wykazano, że hipoksja indukuje nadekspresję genu *FAM13A*, zwłaszcza w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i fragmentach pozyskanych z guzów płuc. Uzyskane wyniki wskazują, że gen *FAM13A* może być markerem hipoksji, często obserwowanej w guzach litych, będącej złym czynnikiem prognostycznym.

H4. Ziółkowska-Suchanek I, Podralska M, Żurawek M, Łaczmańska J, Iżykowska K, Dzikiewicz-Krawczyk A, Rozwadowska N.

Hypoxia-Induced FAM13A Regulates the Proliferation and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells.

Int J Mol Sci. 2021 Apr 21;22(9):4302.

Kolejna praca włączona do cyklu dotyczy efektu wyłączenia genu *FAM13A* na komórki rakowe. Wyniki uzyskane w poprzednich badaniach dotyczące indukcji ekspresji genu *FAM13A* przez hipoksję, były podstawą do kontynuowania tej tematyki badawczej. Funkcja genu *FAM13A* oraz jego udział w rozwoju raka płuc nie był wcześniej badany w kontekście niedotlenienia. Badania realizowane były w ramach projektu „Efekt wyłączenia genu *FAM13A* w komórkach raka płuc” (grant NCN SONATA 11 którego byłam kierownikiem).

Kontynuowane w ramach niniejszego projektu prace badawcze skupiły się ocenie efektu wyłączenia genu *FAM13A* w komórkach NSCLC oraz jego roli w hipoksji. W tym celu przeprowadzono szereg testów funkcjonalnych, których zadaniem było określenie m.in.

prolifracji, migracji oraz inwazyjności komórek NSCLC z wyłączonym genem *FAM13A*. Wyciszenia ekspresji genu dokonano przy pomocy interferencji RNA z użyciem dwóch shRNA (ang. *short-hairpins RNA*) (FAM13Ash1, FAM13Ash2). Do wyprowadzenia dwóch linii raka płuc (A549, CORL-105), z stabilnym wyciszeniem genu *FAM13A*, wykorzystano lentiwirusowy system III generacji. Kontrolę stanowiły komórki obu linii transdukowane wektorami z insertami kontrolnymi (Kontrola 1: NT2 i kontrola 2: SCR). Wektory lentiwirusowe zawierały marker białka zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescence Protein* - GFP), co umożliwiło ocenę wydajności transdukcji przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego oraz cytometrii przepływowej. Wyciszenie badanego genu w komórkach NSCLC potwierdzono na poziomie mRNA (analiza ekspresji) oraz białka (Western blot). Komórki linii raka płuc hodowano w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i hipoksji (1% O₂ przez 72 godziny) a następnie oceniano zmiany ich właściwości (prolifracja, cykl komórkowy, migracja, inwazyjność, ocena apoptozy i cytoszkieletu komórkowego).

Analizę proliferacji komórek i cyklu komórkowego wykonano przy pomocy barwienia znacznikiem fluorescencyjnym VPD450 (ang. *Violet proliferation dye 450*) z użyciem cytometru przepływowego oraz testu MTS (reakcja konwersji soli tetrazolowej). Wyniki testu VPD wykazały znaczące obniżenie indeksu proliferacji (ang. *proliferation index* - PI) komórek A549 FAM13Ash1 (PI = 3,05 ± 0,16) i FAM13Ash2 (PI = 3,73 ± 0,4) w porównaniu z kontrolami (Kontrola1 PI = 4,02 ± 0,71; Kontrola2 PI = 4,41 ± 0,42), w warunkach niedotlenienia (P < 0,05). Wyciszenie *FAM13A* znacząco zmniejszyło proliferację komórek A549 również przy atmosferycznym stężeniu tlenu. W komórkach CORL-105 wyciszenie *FAM13A* znacząco zmniejszyło proliferację komórek (FAM13Ash1: PI = 2,4 ± 0,04; FAM13Ash2: PI = 2,54 ± 0,09; Kontrola1 PI = 3,13 ± 0,15; Kontrola2 PI = 2,95 ± 0,02) po 96 godzinach hodowli w warunkach hipoksji. Tendencję do obniżenia tempa proliferacji w komórkach rakowych z inhibowanym genem *FAM13A* obserwowano również w teście MTS zarówno w komórkach A549, jak i CORL-105.

Oznaczenia cyklu komórkowego dokonano przy pomocy testu inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) w połączeniu z znakowaniem komórek barwinkiem 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD) i cytometrii przepływowej. Komórki z inhibowanym *FAM13A* wykazywały niewielki spadek odsetka populacji komórek w fazie S w normoksji w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Natomiast po hipoksji, odsetek populacji komórek A549 FAM13Ash1/sh2 w fazie S był znacznie niższy niż obserwowany dla komórek kontrolnych (8,4% dla FAM13Ash1/2 w porównaniu z 12,21% dla kontroli; P < 0,05). Wyniki te potwierdziły, że inhibicja *FAM13A* powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S w komórkach raka płuc w hipoksji. Podsumowując, przy pomocy trzech testów wykazano, że wyciszenie genu *FAM13A* moduluje wzrost komórek raka płuc w warunkach niedotlenienia.

Dodatkowo oceniono procent komórek apoptotycznych w badanych wariantach. Analiza cytometryczna z użyciem barwienia aneksyną V skoniugowaną z APC oraz 7-AAD wykazała, że wyciszenie genu *FAM13A* nie miało wpływu na indukcję apoptozy w komórkach A549 i CORL-105 w obu warunkach tlenowych.

W kolejnym etapie badań oceniono migrację komórek raka płuc z inhibowanym *FAM13A*. Oznaczenia tempa migracji komórek dokonano przy pomocy tzw. testu gojenia rany (ang. *wound healing assay*). Monitorowano migrację komórek do wolnej przestrzeni i równolegle sprawdzano poziom konfluencji. Wykazano, że hipoksja powoduje spowolnienie migracji komórek w porównaniu do normalnych warunków tlenowych w obu liniach komórkowych (P < 0,05). Migracja komórek A549 FAM13Ash1/sh2 była znacząco spowolniona w obu warunkach tlenowych (P < 0,001 w normoksji, P < 0,01 w hipoksji). Silniejszy wpływ na

hamowanie migracji komórek obserwowano w przypadku komórek CORL-105, zubożonych w FAM13A, w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu. Podsumowując wykazano, że komórki obu linii NSCLC z wyciszonym genem *FAM13A* migrowały znacznie wolniej w porównaniu do komórek kontrolnych w warunkach normoksji a efekt ten ulegał wzmocnieniu w hipoksji.

Migracja komórek w znacznej mierze zależy od cytoszkieletu aktynowego, dlatego oceniono fenotyp cytoszkieletu komórek z wyciszonym genem *FAM13A*. Fluorescencyjne znakowanie F-aktyny falloidyną umożliwiło wykrycie licznych zmian m.in. w kształcie komórek, utarcie kontaktów komórka-komórka, licznie obecnych po hodowli w warunkach hipoksji. Zaburzenia cytoszkieletu aktynowego były widoczne w postaci włókien stresowych F-aktyny, dużych agregatów i licznych ziarnistości F-aktyny. Zmiany cytoszkieletu obserwowano w większej liczbie w komórkach z wyłączonym genem *FAM13A* w porównaniu do kontroli. Po ekspozycji na hipoksję fenotyp cytoszkieletu ulegał zmianie również w komórkach kontrolnych, jednakże skala zmian była znacznie większa w przypadku komórek NSCLC z inhibowanym FAM13A.

Oceny inwazyjności komórek dokonano przy użyciu testu opartego na komorze Boydena, w którym komórki migrują przez błonę podstawną. Wskaźniki inwazyjności były znacząco obniżone dla komórek A549 z inhibowanym FAM13A w porównaniu do komórek kontrolnych, w warunkach normoksji i hipoksji. Najbardziej znaczący spadek wskaźnika inwazji (%) zaobserwowano dla komórek FAM13Ash2 A549 względem Kontroli1 ($M = 73,93 \pm 8,1$) w normoksji oraz FAM13Ash1 A549 względem Kontroli1 ($M = 54,2 \pm 2,0$) i Kontroli2 ($M = 49,2 \pm 2,5$) w warunkach hipoksji. To samo doświadczenie przeprowadzono na komórkach CORL-105, jednak nie zaobserwowano żadnego istotnego wpływu wyciszenia genu *FAM13A* na inwazyjny fenotyp komórek tej linii. Uzyskane wyniki sugerują, że inhibicja FAM13A hamuje inwazję raka płuc w sposób specyficzny dla danego typu komórek.

Rezultaty przedstawionych badań wykazały, że inhibicja genu *FAM13A* w liniach niedrobnokomórkowego raka płuc, hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i hipoksji, powoduje ograniczenie proliferacji, spowolnienie tempa migracji oraz zmniejszenie inwazyjności. Dodatkowo, zidentyfikowano mechanizmy powodujące zmiany właściwości komórek rakowych z wyłączonym FAM13A. Wykazano, że zaburzenia cyklu komórkowego powodują obniżoną proliferację komórek rakowych, natomiast zmiany w cytoszkieciele komórkowym prowadzą do spowolnienia migracji komórek.

Podsumowując, po raz pierwszy wykazano, że gen *FAM13A* moduluje potencjał przerzutowy komórek raka płuc, co może być wykorzystane w opracowaniu nowych terapii leczenia chorych z nowotworami metastatycznymi.

H5. Iwona Ziółkowska-Suchanek.

Mimicking Tumor Hypoxia in Non-Small Cell Lung Cancer Employing Three-Dimensional In Vitro Models. Cells. 2021 Jan 12;10(1):141.

Do cyklu włączona została także praca przeglądowa, stanowiąca obszernie omówienie udziału hipoksji jako głównej cechy mikrośrodowiska guza i jej wpływu na progresję, potencjał metastatyczny komórek nowotworowych. W pracy tej, dokonałam przeglądu aktualnej wiedzy z zakresu roli hipoksji w NSCLC, obejmującej biologię, biomarkery, badania *in vitro* i *in vivo*, a także obrazowanie i wykrywanie stanu niedotlenienia. Wykonałam również porównanie klasycznych dwuwymiarowych (2D) modeli *in vitro* z trójwymiarowymi (3D). Liczne doniesienia w piśmiennictwie wskazują, że modele 2D wykazują pewne cechy zależne od hipoksji, jednakże

modele oparte na hodowlach 3D dokładniej odwzorowują mikrośrodowiska guza związane z niedotlenieniem. W pracy przeglądowej przedstawiłam systematyczny przegląd aktualnych modeli 3D NSCLC, które zostały wykorzystane do badań hipoksji takich jak: wielokomórkowe sferoidy nowotworowe, organoidy, rusztowania pochodzenia naturalnego i syntetycznego, urządzenia mikroprzepływowe oraz biodrukarki 3D. Opisałam nie tylko wady i zalety każdego modelu badawczego ale także ich potencjał do badania różnych parametrów biologicznych oraz testowania nowych leków zwłaszcza w aspekcie medycyny spersonalizowanej.

W trakcie przygotowania tej pracy znacząco poszerzyłam swoją wiedzę w zakresie badania zjawiska hipoksji na modelach 2D i 3D w rakach płuc co umożliwiło wdrożenie niektórych technik w praktykę laboratoryjną. Opracowano m. in. sposób generowania sferoidów z komórek NSCLC, który będzie wykorzystany jako model badawczy w kilku projektach.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań

Do najważniejszych osiągnięć prac badawczych opisanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego należą:

1. Wykazano, po raz pierwszy, że warianty sekwencji genów *MRE11* i *RAD50* nie stanowią czynnika ryzyka raków krtani i mnogich nowotworów pierwotnych głowy i szyi.
2. Określono udział genów *IREB2* i *FAM13A* w występowaniu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) i raka płuc u polskich chorych:
 - Wykazano, że polimorfizmy genu *IREB2* zwiększają ryzyko rozwoju raka płuc, natomiast warianty polimorficzne genu *FAM13A* mogą predysponować do rozwoju POChP.
 - Wykazano podwyższone ryzyko raka płuc dla haplotypu AAAT genu *IREB2* oraz POChP dla haplotypu TTC genu *FAM13A*.
 - Oszacowano, że ryzyko wystąpienia POChP wzrasta wraz z liczbą alleli ryzyka genu *FAM13A*.
3. Po raz pierwszy dokonano oceny wpływu hipoksji na ekspresję genów *IREB2* i *FAM13A* w niedrobnokomórkowym raku płuc, zarówno w badaniach *in vitro*, na liniach komórkowych, jak i wycinkach guzów płuc, hodowanych *ex vivo*:
 - Wykazano, że hipoksja znacznie zwiększa ekspresję genu *FAM13A* w dwóch liniach niedrobnokomórkowego raka płuc oraz linii prawidłowych fibroblastów płuc oraz większości wycinków guzów płuc.
 - Zaobserwowano istotne obniżenie ekspresji genu *IREB2* w jednej linii niedrobnokomórkowego raka płuc.
4. Wykazano, że gen *FAM13A* moduluje potencjał przerzutowy komórek raka płuc gdyż jego inhibicja w liniach niedrobnokomórkowego raka płuc, hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i w hipoksji, powodowała ograniczenie proliferacji, spowolnienie tempa migracji oraz zmniejszenie inwazyjności komórek.

5. Potwierdzono udział FAM13A w odpowiedzi na hipoksję, gdyż komórki raka płuc z inhibowanym genem *FAM13A* poddane niedotlenieniu charakteryzowały się znacząco mniejszą inwazyjnością w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu.
 6. Wskazano mechanizmy za pomocą których inhibicja genu *FAM13A* wpływa na komórki raka płuc (zaburzenia cyklu i cytoszkieletu komórkowego).
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. Omówienie pozostałych kierunków badań.

Opis kierunków badawczych realizowanych w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora:

Ocena mutacji i wariantów molekularnych genu *NBN* w różnych nowotworach

Od początku mojej pracy w Instytucie Genetyki Człowieka PAN uczestniczyłam w pracach badawczych dotyczących analizy wariantów molekularnych genów kompleksu MRN jako czynników ryzyka rozwoju nowotworów. W piśmiennictwie potwierdzono wyższą częstość heterozygotycznej mutacji c.657-661del genu *NBN* u chorych z ALL, NHL, czerniakiem, rakiem prostaty, piersi i jajnika [20]. Częstości wariantów molekularnych badanych genów nie były wcześniej badane w populacji polskiej dlatego podjęcie tej tematyki badawczej było niezwykle interesujące. Oceniono częstości mutacji w 16 eksonach genu *NBN* oraz polimorfizmów i haplotypów w wybranych nowotworach hematologicznych oraz guzach litych (rak krtani, drugie pierwotne nowotwory głowy i szyi, rak piersi, jelita grubego, płuc).

Badania wariantów molekularnych genu *NBN* przeprowadzono u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (n= 191, ang. *acute lymphoblastic leukemia* - ALL), ostrą białaczką szpikową (n=32, ang. *acute myeloid leukemia* - AML), przewlekłą białaczką szpikową (n=9, ang. *chronic myeloid leukemia* - CML), guzami centralnego układu nerwowego (n=39) oraz nerwiakiem zarodkowym (n=53, ang. *neuroblastoma*). Zmiany w eksonach genu *NBN* identyfikowano badaniem polimorfizmu konformacji jednoniciowego DNA (ang. *Single Strand Conformation Polymorphism* - SSCP) lub polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism* – RFLP) i potwierdzano bezpośrednim sekwencjonowaniem. Zidentyfikowano ośmiu nosicieli heterozygotycznej mutacji p.I171V w genie *NBN* w białaczkach wieku dziecięcego (5/191 chorych z ALL, 2/32 z AML, 1/9 z CML) a w grupie kontrolnej 12/2400. Tranzycja c.511A>G (p.I171V), jest zlokalizowana w domenie BRCT nibryny, powoduje zamianę aminokwasu leucyny w walinę. Analiza DNA pozyskanego z komórek nabłonka chorych, potwierdziła germinalny charakter tej mutacji we wszystkich przypadkach. Analiza statystyczna potwierdziła zwiększone ryzyko rozwoju białaczki u heterozygotycznych nosicieli p.I171V ($P < 0,0001$). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż substytucja p.I171V może być czynnikiem predysponującym do rozwoju ALL a wyniki opublikowano w pracy: Mosor M, Ziolkowska I, Pernak-Schwarz M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2006;20(8):1454-6.

W kolejnych badaniach związanych z nowotworami wieku dziecięcego przeprowadzono analizy asocjacyjne w oparciu o sześć miejsc polimorficznych genu *NBN*: c.102G>A, c.553G>C, c.1124+18C>T, c.1197T>C, c.2016A>G c.2071-30A>T [9, 13, 21]. W grupie dzieci z ALL (n=157) stwierdzono wyższą częstość genotypu TT polimorfizmu c.2071-30A>T w porównaniu do grupy

kontrolnej (n=275). W przypadku dwóch haplotypów zaobserwowano asocjację z podwyższonym ryzykiem wystąpienia ALL. Wyniki opublikowano w pracy: *Mosor M, Ziolkowska I, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene in childhood acute leukaemia. Eur J Cancer. 2008;44(15):2226-32.*

Poszukiwania wariantów molekularnych genu *NBN* kontynuowano w guzach litych. Zidentyfikowano dziesięciu heterozygotycznych nosicieli mutacji p.I171V: czterech w grupie 175 chorych z rakiem krtani (2,3%), pięciu wśród 104 chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi krtani (4,8%) i jednego wśród mnogich nowotworów pierwotnych głowy i szyi (1,7%). W grupie kontrolnej liczącej 1174 próbek wykryto ośmiu nosicieli mutacji p.I171V (0,68%). Częstość substytucji p.I171V w grupie chorych z rakiem krtani i mnogimi nowotworami pierwotnymi krtani była znacznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki badań opublikowano w pracy: *Ziolkowska I, Mosor M, Wierzbička M, Rydzanicz M, Pernak-Schwarz M, Nowak J. Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene. Cancer Sci. 2007;98(11):1701-5.* Powyższe badania stały się również przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt. „*Mutacje i polimorfizmy w genie NBS1 u chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi*”. Praca doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Wyniki badań zostały także zaprezentowane na 5th European Workshop on Basic Biology of Head & Neck Cancer, (16-18 listopada 2006 r., Poznań) podczas którego otrzymałam pierwszą nagrodę za plakat pt.: „*Frequency of Heterozygous I171V Mutation in the NBS1 Gene in Multiple Primary Tumors and Larynx Cancer*”.

Rezultaty uzyskane w poprzednich badaniach skłoniły mnie do kontynuowania tematyki nowotworów tytoniozależnych. Część z nich wykonałam po uzyskaniu stopnia doktora. Analiza asocjacji wybranych polimorfizmów genu *NBN* nie wykazała istotnego związku z występowaniem nowotworów głowy i szyi. Wykazano natomiast, że haplotypy GGTTAA ($P<0,0001$) i ACCCGT ($P=0,002$) występowały częściej w raku krtani a GGCCAA ($P<0,0001$) i GCCCGT ($P=0,0386$) u chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi. W pracy: *Ziolkowska-Suchanek I, Mosor M, Wierzbička M, Fichna M, Rydzanicz M, Nowak J. Association of polymorphisms and haplotypes of the NBN gene with laryngeal cancer and multiple primary tumors of the head and neck. Head Neck. 2012 Mar;34(3):376-83* wykazano, że niektóre haplotypy genu *NBN* mogą być związane z występowaniem nowotworów głowy i szyi.

W kolejnych badaniach skupiono się na identyfikacji nosicieli mutacji p. I171V genu *NBN* w różnych grupach chorych z guzami litymi. Częstość mutacji p.I171V oszacowano w grupie kobiet z nieselekcjonowanym rakiem piersi (5/270), u chorych z rakiem jelita grubego (3/131) oraz NSCLC (17/453). Podsumowując, potwierdzono wysoką częstość heterozygotycznej substytucji p.I171V w badanych grupach chorych co wskazuje, że mutacja ta może być czynnikiem predysponującym do rozwoju badanych nowotworów. Wyniki opublikowano w kolejnych dwóch pracach (zawarto w wykazie, załącznik nr 4A).

Opis kierunków badawczych realizowanych w okresie po uzyskaniu stopnia doktora:

Ocena mutacji i wariantów molekularnych genów *RAD50* i *MRE11* w różnych nowotworach.

Poszukiwania genów ryzyka nowotworzenia kontynuowałam po uzyskaniu stopnia doktora, poszerzając zakres badań o pozostałe składowe kompleksu MRN: geny *RAD50* i *MRE11*. Wydaje się, że również u heterozygotycznych nosicieli mutacji w tych genach mechanizm naprawy DNA może być uszkodzony. Przeanalizowano mutacje i polimorfizmy genów *MRE11* i *RAD50* w opisanych wcześniej grupach chorych z nowotworami hematologicznymi oraz guzami litymi. W żadnej z grup nie zidentyfikowano mutacji w badanych

sekwencjach genów. Oszacowano także częstości genotypów i alleli polimorfizmu c.551+19G>A w genie *RAD50*. Genotyp GG występował znacznie statystycznie częściej w ALL w odniesieniu do grupy kontrolnej (OR = 0,2407; CI: 0,1162 - 0,4988; P < 0,0001) wskazując możliwie charakter ochronny genotypu AA. Analizy genu *MRE11* nie wykazały istotnych zmian sekwencji tego genu w badanych grupach chorych i w grupie kontrolnej. Wyniki opublikowano m.in. w pracy: Mosor M, Ziolkowska-Suchanek I, Nowicka K, Dzikiewicz-Krawczyk A, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. Germline variants in *MRE11/RAD50/MBN* complex genes in childhood leukemia. *BMC Cancer*. 2013;13:457 oraz Mosor M, Ziolkowska-Suchanek I, Roznowski K, Baranowska M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. *RAD50* gene mutations are not likely a risk factor for breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(2):607-9 (praca wyróżniona Nagrodą Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN). Praca dotycząca nowotworów głowy i szyi została włączona do cyklu habilitacyjnego.

Podsumowując, w badaniach genów kompleksu MRN wykazano, że heterozygotyczna mutacja p.I171V w genie *NBN* może być czynnikiem predysponującym do rozwoju ALL, raka krtani, mnogich nowotworów pierwotnych głowy i szyi, raka piersi, jelita grubego oraz raka płuc. Mutacje genów *MRE11* i *RAD50* prawdopodobnie nie mają istotnego znaczenia w występowaniu badanych nowotworów hematologicznych i guzów litych.

Znaczenie polimorfizmów genów *PPARγ-2* i *ADR-β3* w chorobach tkanki łącznej oraz zaburzeniach lipidowych.

Jednym z kierunków badawczych w jakich uczestniczyłam było poszukiwanie molekularnego podłoża chorób tkanki łącznej oraz zaburzeń lipidowych. Realizacja tych badań była możliwa dzięki współpracy z dr hab. n. med. Bogną Grygiel-Górniak z Katedry i Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego. W badaniach skupiono się na analizie polimorfizmów (ang. *single nucleotide polymorphisms* – SNP) genu receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów - *PPARγ-2* i genu receptorów β-3-adrenergicznych - *ADR-β3*. Nowatorstwo naszych badań polegało na ocenie roli obu genów w kontekście terapii statynami oraz modulowaniu ciśnienia krwi u pacjentów z chorobami tkanki łącznej (ang. *connective tissue disease* – CTD). Grupę badaną stanowiło 104 pacjentów z CTD oraz 103 osoby zdrowe, dopasowanych pod względem płci, wieku oraz leczenia statynami. Do genotypowania wykorzystano sondy TaqMan® oraz metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *polymerase chain restriction fragment length polymorphism* - PCR-RFLP). Analizie poddano 3 miejsca polimorficzne: rs1801282 (p.Pro12Ala) i rs3856806 (c.C1431T) genu *PPARγ-2* oraz rs4994 (p.Trp64Arg) genu *ADR-β3*. Rutynowymi metodami oceniono pomiary antropometryczne i biochemiczne pacjentów. Nie zaobserwowano istotnych różnic między częstością występowania alleli i genotypów między CTD a grupą kontrolną, jednakże zauważono interesujące powiązania lipidowo-genowe. U chorych z CTD stwierdzono wyższy poziom trójglicerydów (TAG) i stosunku TAG/lipoproteina o wysokiej gęstości (HDL) w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobne różnice odnotowano w grupie CTD i grupie kontrolnej bez statynoterapii. Ponadto genotypy Pro12Pro, C1431C, Trp64Trp wykazywały asocjację z wyższymi stosunkami TAG i TAG/HDL u pacjentów z CTD. Najwyższe wartości TAG zaobserwowano w obecności genotypu Trp64Trp. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zaburzenia lipidowe występowały w obu grupach niezależnie od leczenia statynami. Obecność genotypów Pro12Pro, C1431C i Trp64Trp jest związana z wyższym poziomem TAG w CTD, z których SNP Trp64Trp może być traktowany jako czynnik predykcyjny hipertriglicydemii. Wyniki opublikowano w pracy: Grygiel-Górniak B, Ziolkowska-Suchanek I, Kaczmarek E, Mosor M, Nowak J, Puszczewicz M. *PPARγ-2* and

ADRB3 polymorphisms in connective tissue diseases and lipid disorders. Clin Interv Aging. 2018 Mar 22;13:463-472.

W kolejnej pracy: Grygiel-Górniak B, Ziółkowska-Suchanek I, Kaczmarek E, Puszczewicz M, Rozwadowska N. *Genetic Background of Hypertension in Connective Tissue Diseases. J Immunol Res. 2020 Feb 3;2020:7509608*, skupiono się na analizie asocjacji badanych SNP z nadciśnieniem u chorych z CTD. Rola genów *PPARγ-2* i *ADR-β3* jako czynników ryzyka nadciśnienia tętniczego została wcześniej opisana w piśmiennictwie [22, 23], jednak nie było danych obejmujących chorych z CTD. Oszacowane w naszych badaniach częstości genotypów i alleli były porównywalne między pacjentami z CTD i grupą kontrolną, a także osobami z nadciśnieniem i bez nadciśnienia. Wykazano, że chorzy z CTD mają niższy poziom tkanki tłuszczowej, większą ilość wody w organizmie, a także wyższy poziom glukozy i TAG w surowicy. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że osoby z nadciśnieniem tętniczym z polimorfizmem Ala12/X lub Trp64Trp mają wyższą masę ciała w porównaniu z osobami z prawidłowym ciśnieniem. Polimorfizm Trp64Trp charakteryzował się również wyższym poziomem TAG, podczas gdy osoby z genotypem T1431/X miały większy obwód w talii. Obecność CTD, rozkład trzewnej tkanki tłuszczowej oraz podeszły wiek są czynnikami ryzyka rozwoju nadciśnienia tętniczego. W naszych badaniach potwierdzono, że pacjenci z nadciśnieniem u których zidentyfikowano genotyp Trp64Trp genu *ADR-β3* mają zwiększone ryzyko rozwoju otyłości trzewnej i powikłań metabolicznych, co z kolei wpływa na wartość ciśnienia tętniczego. Dodatkowo wykazano, że obecność genotypów Ala12/X i T1431/X genu *PPARγ-2* moduluje rozkład trzewnej tkanki tłuszczowej u osób z nadciśnieniem.

Poszukiwanie czynników genetycznych i epigenetycznych związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w cukrzycy typu 1.

Cukrzyca typu 1 (ang. *type 1 diabetes* - T1D) jest chorobą autoimmunologiczną w której limfocyty T doprowadzają do selektywnego uszkodzenia komórek β wysp trzustkowych, produkujących insulinę. T1D jest konsekwencją złożonych procesów, na które mają wpływ czynniki genetyczne, epigenetyczne i środowiskowe. W naszych badaniach, prowadzonych we współpracy z dr hab. n. med. Martą Fichną z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego oraz dr hab. n. med. Magdaleną Żurawek z Instytutu Genetyki Człowieka PAN, skupiono się na poszukiwaniu czynników genetycznych i epigenetycznych związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w T1D. Wcześniejsze badania wykazały, że warianty polimorficzne w *locus* interleukiny-2 (*IL-2*) mogą być czynnikami ryzyka chorób autoimmunologicznych [24]. W naszych badaniach przeprowadzono analizę asocjacji czterech polimorfizmów *IL-2* (rs6822844, rs6534349, rs2069762 i rs3136534) z T1D w polskiej populacji oraz korelację uzyskanych wyników z stężeniem *IL-2* w surowicy. Do badania włączono 543 niespokrewnionych pacjentów z T1D oraz 706 zdrowych osób włączonych do grupy kontrolnej. Wykazano, że częstość allelu T rs6822844 była znacznie niższa w T1D w porównaniu z grupą kontrolną ($P = 0,002$; OR 0,71; 95% CI 0,571 - 0,880). Podobnie częstość występowania genotypu TT była rzadsza w grupie chorych ($P = 0,007$). Ponadto, przeprowadzona stratyfikacja w grupie kontrolnej według genotypu rs6822844 ujawniła istotne różnice w stężeniach *IL-2* w surowicy ($P = 0,037$), z najwyższymi poziomami w przypadku obecności genotypów ochronnych TT. Dla trzech pozostałych SNP nie wykazano różnic znamiennych statystycznie w częstościach alleli i genotypów.

Podsumowując, wykazano, że polimorfizm rs6822844 genu *IL-2* jest związany z T1D a uzyskane wyniki opublikowano w pracy: Fichna M, Żurawek M, Fichna P, Ziółkowska-Suchanek

I, Januszkiewicz D, Nowak J. Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. Mol Biol Rep. 2013;40(12):6957-63.

Badania obejmujące tematykę T1C rozszerzono o analizę epigenetycznych czynników T1D czyli wybranych mikroRNA. MikroRNA (miRNA) to małe niekodujące RNA regulujące ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Udział miRNA jako regulatorów ośrodkowej i obwodowej tolerancji immunologicznej został potwierdzony w piśmiennictwie [25], dlatego ważnym zagadnieniem jest badanie cząsteczek RNA w kontekście patogenezy T1D.

W pracy Żurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Izykowska K, Ziółkowska-Suchanek I, Skowronska B, Czainska M, Podralska M, Fichna P, Przybylski G, Fichna M, Nowak J. *miR-487a-3p upregulated in type 1 diabetes targets CTLA4 and FOXO3. Diabetes Res Clin Pract. 2018;142:146-153* opisano wyniki profilowania miRNA u chorych z T1D. Do badań globalnej ekspresji miRNA wykorzystano analizę mikromacierzową (Affymetrix GeneChip miRNA 4.0), która umożliwiła wskazanie 24 miRNA o podwyższonej ekspresji oraz 67 miRNA o obniżonej ekspresji u chorych z T1D w porównaniu do osób zdrowych. Walidacja wyników potwierdziła nadekspresję miR-487a-3p, która wcześniej nie była opisywana w kontekście cukrzycy, dlatego zdecydowano o włączeniu tego miRNA do dalszych analiz. Co więcej zaobserwowano, że pacjenci z ciężkim początkiem klinicznym, manifestowanym kwasicą ketonową, prezentowali wyższy poziom ekspresji miR-487a-3p w porównaniu z grupą o łagodnym przebiegu początku choroby. Analiza *in silico* umożliwiła wskazania genów docelowych dla miR-487a-3p o potencjalnej roli w autoimmunizacji: *CTLA4*, *FOXO3*, *MARCH5* i *PTPN2*. Następnie oceniono *in vitro* oddziaływanie miR-487a-3p z sekwencjami 3'UTR wybranych genów docelowych w komórkach linii Jurkat, z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy. Reasumując, w naszych badaniach po raz pierwszy wykazano funkcjonalny charakter miR-487a-3p jako regulatora ekspresji kluczowych genów odpowiedzi immunologicznej: *CTLA4* i *FOXO3*, poprzez wiązanie się do ich sekwencji 3'UTR.

Wyniki uzyskane w ramach poprzednich badań były podstawą do kontynuowania poszukiwań miRNA o istotnym znaczeniu w T1D. Celem kolejnych badań było zbadanie poziomu ekspresji miR-652-5p na początku rozpoznania T1D oraz wpływu jego ekspresji na potencjalne geny docelowe: *ADAR* i *MARCH5*. Ekspresję miR-652-5p zbadano w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej nowo zdiagnozowanych pacjentów pediatrycznych z T1D (n = 28) i osób zdrowych w podobnym wieku (n = 28). Wykazano statystycznie istotne podwyższenie ekspresji miR-652-5p w grupie chorych T1D w porównaniu do grupy kontrolnej (p < 0,05). Test reporterowy lucyferazy nie potwierdził interakcji miR-652-5p z genami *ADAR* i *MARCH5*. Nasze badania wykazały, że miR-652-5p może być wykorzystany jako marker T1D. Wyniki opublikowano w pracy: Żurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Izykowska K, Ziółkowska-Suchanek I, Skowronska B, Czainska M, Kazimierska M, Podralska M, Fichna M, Przybylski GP, Nowak J, Fichna M, Rozwadowska N. *Overexpression of miR-652-5p in new onset type 1 diabetes. Clinical Diabetology. 2018;7(4):189-195.*

Ocena mutacji i wariantów molekularnych genu *ATM* u polskich chorych z zespołem ataksji-teleangiektazji oraz z nowotworami.

W efekcie wieloletniej współpracy z dr n. med. Martą Podralską zainteresowałam się tematyką zespołu ataksji-teleangiektazji (AT, MIM#208900) który jest chorobą neurodegeneracyjną i wiąże się z defektami naprawy DNA. Za rozwój AT odpowiedzialne są bialleliczne mutacje genu *ATM*, który pełni istotną rolę w monitorowaniu i utrzymywaniu integralności genomu. *ATM* koordynuje progresję cyklu komórkowego i odpowiedź komórkową na powstałe dwuniciowe pęknięcia DNA poprzez fosforylację kilku substratów taki jak p53,

BRCA1, CHEK2 i nibryna. Pacjenci z AT mają silną predyspozycję do nowotworów złośliwych, zwłaszcza białaczek i chłoniaków (zarówno z komórek B jak i T). U chorych z dłuższym czasem przeżycia występują również inne typy nowotworów, takie jak rak jajnika i piersi, rak żołądka, czerniak, mięsniaki gładkie i mięsaki [26]. Ponadto wykazano, że również nosiciele mutacji monoallelicznych w genie *ATM* mogą mieć zwiększone ryzyko zachorowania na różne typy nowotworów [27].

Przedmiotem naszych badań było określenie spektrum mutacji genu *ATM*, u polskich chorych z AT, celem uaktualnienia panelu zmian molekularnych dotychczas opisanych w piśmiennictwie. Badania przesiewowe genu *ATM* objęły 24 polskie rodziny z AT i ujawniły 38 zmian sekwencji DNA. Wskaźnik zmian DNA w badanej grupie wynosił około 80% (38 wykrytych wariantów/48 oczekiwanych mutacji). Zidentyfikowano różne rodzaje mutacji: 21 nonsensownych (55,3%), 12 splicingowych (31,6%), 3 duże delecje genomowe (7,9%) oraz zmiany typu *missense* (5,3%). Większość wariantów była w układzie heterozygotycznym, mieszanym. Zastosowanie metody MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) umożliwiło wykrycie dużej delecji eksonów 62 i 63 genu *ATM*. Dziesięć wykrytych wariantów było nowych: c.8441delC, c.6145T>G, c.434T>G, c.6754_6754delA, c.4007_4008insA, c.7606G>A, c.3402+30_3402+32delATC, delecja eksonów 19 - 20, delecja eksonu 63, delecja eksonów 62 i 63. Dodatkowo, dla nowo wykrytych zmian *ATM* przeprowadzono analizę *in silico* oraz analizę funkcjonalną w celu oceny wpływu zidentyfikowanych wariantów intronowych: c.3402+30_3402+32delATC. Wyniki opublikowano w pracy Podralska MJ, Stembalska A, Ślęzak R, Lewandowicz-Uszyńska A, Pietrucha B, Kołtan S, Wigowska-Sowińska J, Pilch J, Mosor M, **Ziółkowska-Suchanek I**, Dzikiewicz-Krawczyk A, Słomski R. *Ten new ATM alterations in Polish patients with ataxia-telangiectasia. Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2014 Nov; 2 (6): 504-11.

Kontynuację badań związanych z genem *ATM*, oparto na założeniu, że zaburzenia naprawy DNA mogą prowadzić do nowotworzenia. W pracy Podralska M, **Ziółkowska-Suchanek I**, Żurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Słomski R, Nowak J, Stembalska A, Pesz K, Mosor M. *Genetic variants in ATM, H2AFX and MRE11 genes and susceptibility to breast cancer in the polish population. BMC Cancer*. 2018 Apr 20;18(1):452, oceniono rolę wariantów molekularnych badanych genów jako czynników predysponujących do rozwoju raka piersi. Przenalizowano 3 mutacje genu *ATM* (c.5932G>T, c.6095G>A i c.7630-2A>C), polimorfizmy genu *H2AFX* (rs643788, rs8551, rs7759 i rs2509049) oraz *MRE11* (rs1061956 oraz rs2155209) w grupie 315 kobiet z rakiem piersi i 515 osób zdrowych. Wykazano, że polimorfizmy genu *H2AFX* mogą być czynnikiem predysponującym do rozwoju raka piersi.

Powyższe badania, dotyczące wariantów molekularnych genu *ATM*, przeprowadzono także u pacjentów z chorobami tytoniozależnymi: 468 z rakiem płuca (NSCLC), 153 z pojedynczym rakiem krtani, 86 z mnogimi guzami pierwotnymi zlokalizowanymi w krtani i 76 mnogimi guzami pierwotnymi zlokalizowanymi w obrębie głowy lub szyi. Grupa kontrolna składała się z 464 zdrowych osób z populacji polskiej. W grupie chorych wykryto tylko jedną mutację c.7630-2A>C. Nie stwierdzono nosicieli mutacji c.5932G>T, c.6095G>A. Uzyskane wyniki wskazują, że badane warianty genu *ATM* nie wydają się być związane z nowotworami tytoniozależnymi w Polsce i zostały opublikowane w pracy: Podralska M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Mosor M, Żurawek M, Iżykowska K, Słomski R, Rydzanicz M, Gabryel P, Dyszkiewicz W, **Ziółkowska-Suchanek I**. *The most frequent Polish ATM mutations are not susceptibility factors for tobacco-related cancers. Arch Med Sci*, 2021, 17 (5): 1158-1163.

Poszukiwanie podłoża molekularnego Zespołu Sezary'ego.

Zespół Sezary'ego (ang. *Sezary Syndrome* - SS) to agresywna postać skórno-krwotoczny chłoniaka T-komórkowego, charakteryzująca się wieloma złożonymi zmianami w genomie, transkryptomie oraz zmianami metylacji DNA. W badaniach prowadzonych we współpracy z dr n. med. Katarzyną Łżykowską wykazano, że ekspresja genu *TMEM244*, kodującego białko transbłonowe, u pacjentów z SS oraz liniach komórkowych SS jest ujemnie skorelowana z poziomem metylacji jego promotora. Ponadto potwierdzono, że ekspresja *TMEM244* może być aktywowana *in vitro* przez swoistą demetylację regionu promotora *TMEM244*, indukowaną przez CRISPR-dCas9. Wyniki opublikowano w pracy: Łżykowska K, Rassek MS, Żurawek M, Nowicka K, Paczkowska J, **Ziółkowska-Suchanek I**, Podralska M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Joks M, Olek-Hrab K, Giefing M, Przybylski GK. *Hypomethylation of the promoter region drives ectopic expression of TMEM244 in Sézary cells. J Cell Mol Med, 2020, 24 (18): 10970-10977.*

Inne kierunki badawcze.

W ostatnich latach, uczestniczyłam w realizacji projektu pod kierownictwem dr hab. n. med. Agnieszki Dzikiewicz-Krawczyk, dotyczącego identyfikacji funkcjonalnych miejsc wiązania MYC oraz odpowiadających im genów docelowych. Zidentyfikowano kilka znanych i nowych celów MYC, istotnych dla wzrostu komórek przewlekłej białaczki szpikowej K562. Wyniki zostały opisane w manuskrypcie: Kazimierska M, Podralska M, Żurawek M, Wozniak T, Kasprzyk ME, Sura W, Losiewski W, **Ziółkowska-Suchanek I**, Kluiver JL, van den Berg A, Rozwadowska N, Dzikiewicz-Krawczyk A. *CRISPR/Cas9 screen for functional MYC binding sites reveals MYC-dependent vulnerabilities in K562 cells (doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.02.454734>)*, który został zdeponowany w repozytorium bioRxiv i jest w trakcie procesu publikacyjnego.

Aktualnie uczestniczę w realizacji trzech projektów badawczych. Badania prowadzone we współpracy z dr Jackiem Kolanowskim (kierownik projektu NCN SONATA 13) mają na celu opracowanie sond bioluminescencyjnych do obrazowania i oceny rodzaju guza nowotworowego na podstawie wybranych cech jego mikrośrodowiska takich jak hipoksja oraz poziom żelaza.

W kolejnym projekcie (NCN OPUS 14), we współpracy z dr hab. n. med. Agnieszką Dzikiewicz-Krawczyk oraz dr n. med. Martą Podralską, prowadzone badania mają na celu identyfikację długich niekodujących RNA (ang. *long non-coding RNA* – lncRNA) indukowanych przez napromieniowanie i oddziałujących z *ATM* oraz funkcjonalna charakterystyka wybranych lncRNA w kontekście odpowiedzi na uszkodzenia DNA.

W ramach projektu NCN SONATA 15, we współpracy z dr n. med. Katarzyną Łżykowską, zaplanowano ocenę wpływu deacetylaz histonowych klasy II: HDAC9 i HDAC10 na funkcjonowanie komórek nowotworowych chłoniaków skórnych z limfocytów T, zwłaszcza komórek SS.

Plany

Aktualnie pracuję nad nowym modelem badawczym, który umożliwia znakowanie komórek raka płuc po ekspozycji na niedotlenienie. W badaniach wykorzystywany jest lentiwirusowy system dwuwektorowy do znakowania komórek hipoksyjnych który umożliwia trwałe oznaczanie komórek niedotlenionych poprzez wyzwolenie fluorescencyjnego przełączenia z DsRed na GFP. Znakowanie komórek umożliwi ocenę czy ekspozycja na przewlekłą hipoksję umożliwi komórkom rakowym uzyskanie fenotypu oporności na stres oksydacyjny, co sprzyja ich przeżyciu po reoksygenacji, zwiększając prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutu. Równolegle będę aplikować do NCN o finansowanie powyższych badań

w ramach konkursu OPUS 22. W projekcie zaplanowano analizę sekwencjonowania pojedynczych komórek (ang. *single-cell RNA-sequencing*), uzyskanych z sferoidów oraz guzów pozyskanych z ortotopowych modeli mysich. Analiza będzie wykonana w ramach współpracy z dr Michałem Kolářem, w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki, Instytutu Genetyki Molekularnej Czeskiej Akademii Nauk. W przypadku uzyskania finansowania planuję odbyć staż naukowy w powyższej placówce celem zapoznania się z technikami przygotowania materiału badawczego do sekwencjonowania pojedynczych komórek oraz przygotowania bibliotek sekwencyjnych.

Piśmiennictwo:

1. Makowska, M., et al., [Genetics risk factors in chronic obstructive pulmonary disease]. Pol Merkur Lekarski, 2010. **28**(166): p. 302-6.
2. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Molina, J.R., et al., *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(5): p. 584-94.
4. Rzepakowska, A., M. Zurek, and K. Niemczyk, *Review of recent treatment trends of laryngeal cancer in Poland: a population-based study*. BMJ Open, 2021. **11**(4): p. e045308.
5. Leon, X., et al., *Second primary tumors in head and neck cancer patients*. Acta Otolaryngol, 2002. **122**(7): p. 765-78.
6. Szalontai, K., et al., *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers, and Paving the Way to Lung Cancer*. J Clin Med, 2021. **10**(13).
7. Caliri, A.W., S. Tommasi, and A. Besaratinia, *Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer*. Mutat Res, 2021. **787**: p. 108365.
8. Dzikiewicz-Krawczyk, A., *The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer*. Mutat Res, 2008. **659**(3): p. 262-73.
9. Mosor, M., et al., *Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(8): p. 1454-6.
10. Ziolkowska, I., et al., *Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene*. Cancer Sci, 2007. **98**(11): p. 1701-5.
11. Nowak, J., et al., *Heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene have a significantly increased risk of solid malignant tumours*. Eur J Cancer, 2008. **44**(4): p. 627-30.
12. Kaluzna, E.M., et al., *Heterozygous p.I171V mutation of the NBN gene as a risk factor for lung cancer development*. Oncol Lett, 2015. **10**(5): p. 3300-3304.
13. Mosor, M., et al., *Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene in childhood acute leukaemia*. Eur J Cancer, 2008. **44**(15): p. 2226-32.
14. Ziolkowska-Suchanek, I., et al., *Association of polymorphisms and haplotypes of the NBN gene with laryngeal cancer and multiple primary tumors of the head and neck*. Head Neck, 2012. **34**(3): p. 376-83.
15. Cho, M.H., et al., *Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Genet, 2010. **42**(3): p. 200-2.
16. Jiang, Z., et al., *A Chronic Obstructive Pulmonary Disease Susceptibility Gene, FAM13A, Regulates Protein Stability of beta-Catenin*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **194**(2): p. 185-97.

17. Young, R.P., et al., *FAM13A locus in COPD is independently associated with lung cancer - evidence of a molecular genetic link between COPD and lung cancer*. Appl Clin Genet, 2011. **4**: p. 1-10.
18. DeMeo, D.L., et al., *Integration of genomic and genetic approaches implicates IREB2 as a COPD susceptibility gene*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(4): p. 493-502.
19. Chi, J.T., et al., *Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers*. PLoS Med, 2006. **3**(3): p. e47.
20. Steffen, J., et al., *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland*. Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 67-71.
21. Mosor, M., et al., *Germline variants in MRE11/RAD50/NBN complex genes in childhood leukemia*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 457.
22. Ostgren, C.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Pro12Ala polymorphism and the association with blood pressure in type 2 diabetes: skaraborg hypertension and diabetes project*. J Hypertens, 2003. **21**(9): p. 1657-62.
23. Ringel, J., et al., *The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with hypertension in men with type 2 diabetes mellitus*. Am J Hypertens, 2000. **13**(9): p. 1027-31.
24. Malek, T.R. and I. Castro, *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 153-65.
25. Simpson, L.J. and K.M. Ansel, *MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity*. J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2242-9.
26. Reiman, A., et al., *Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours*. Br J Cancer, 2011. **105**(4): p. 586-91.
27. Thompson, D., et al., *Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(11): p. 813-22.

Podsumowanie współpracy naukowej:

W trakcie mojej pracy naukowej współpracowałam lub współpracuję z następującymi ośrodkami naukowymi:

- Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wieloletnia współpraca z prof. dr hab. n. med. Małgorzatą Wierzbicką zaowocowała opublikowaniem pięciu prac obejmujących analizę wariantów molekularnych genów kompleksu *MRE11/RAD50/NBN* jako czynników ryzyka rozwoju nowotworów głowy i szyi. Tematyka ta była również przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

- Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Współpraca z dr hab. n. med. Marta Fichną, obejmująca poszukiwanie czynników genetycznych i epigenetycznych związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w cukrzycy typu 1, umożliwiła opublikowanie dwóch prac.

- Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii im. Eugenii i Janusza Zeylandów, Oddział Torakochirurgii, Poznań

Wieloletnia współpraca z dr n. med. Piotrem Gabryelem i prof. dr hab. Wojciechem Dyszkiewiczem w zakresie udziału genów *IREB2* i *FAM13A* w występowaniu raka płuc u polskich chorych. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu NCN SONATA 1 (pod moim kierownictwem) oraz zostały opublikowane w trzech pracach.

- Klinika Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

Współpraca z dr n. med. Marcinem Grabickim oraz prof. dr hab. n. med. Haliną Baturą-Gabryel dotyczyła udziału genów *IREB2* i *FAM13A* w występowaniu POChP u polskich chorych. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu NCN SONATA 1 oraz zostały opublikowane w jednej pracy.

- Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

Współpraca z dr hab. n. med. Bogną Grygiel-Górniak obejmowała poszukiwanie genetycznego podłoża chorób tkanki łącznej oraz zaburzeń lipidowych. W ramach współpracy opublikowano dwie prace.

- Zakład Sond Molekularnych i Proleków, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Obecnie współpracuję z dr Jackiem Kolanowskim nad opracowaniem sond bioluminescencyjnych, dzięki którym możliwe będzie monitorowanie parametrów biochemicznych guzów nowotworowych.

- Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Obecnie nawiązałam współpracę z dr hab. inż. Wojciechem Juzwą dzięki której możliwe jest sortowanie komórek znakowanych fluorescencyjnie po hipoksji. Otrzymanie homogennej populacji komórek jest niezbędne do przeprowadzenia badań funkcjonalnych oraz analizy profilu ekspresji genów.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne:

Podczas mojej pracy pełniłam funkcję promotora jednej pracy inżynierskiej, trzech prac magisterskich oraz sprawowałam opiekę nad siedmioma praktykantami lub stażystami.

- Praca inżynierska:
Joanna Łączmańska
„Inhibicja genu *FAM13A* w komórkach raka płuc”
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia. Poznań 2018 r.
- Prace magisterskie:
Marlena Marek

„Ocena częstości występowania mutacji: c.5932G>T, c.6095G>A, c.7630-2A>C w genie *ATM* u polskich chorych z rakiem płuc”

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia. Poznań 2015 r.

Marianna Pewińska

„Przygotowanie i walidacja linii komórkowych raka płuc z konstytutywną ekspresją lucyferazy do badania nowych substratów bioluminogennych”

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia. Poznań 2019 r.

inż. Joanna Łaczmajska

„Efekt wyciszenia genu *FAM13A* w komórkach raka płuc”

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek: Biotechnologia, Poznań 2019 r.

- Opieka nad praktykantem, stażystą, magistrantem:
Marlena Marek (styczeń-czerwiec, 2015, praca magisterska)
Joanna Łaczmajska (styczeń-czerwiec, 2018, praca inżynierska)
Marianna Pewińska (styczeń-czerwiec 2019, praca magisterska)
Joanna Łaczmajska (styczeń-czerwiec 2019, praca magisterska)
Wiktoria Nitka (kwiecień-czerwiec 2019, praktyka studencka)
Michalina Krakowiak (lipiec 2019, praktyka studencka)
Karolina Ładziak (listopad-grudzień 2019, praktyka studencka)

Działalność organizacyjna:

W trakcie mojej pracy naukowej pełniłam funkcję kierownika dwóch projektów badawczych, realizowanych w Instytucie Genetyki Człowieka PAN:

- Narodowe Centrum Nauki SONATA 1, nr 2011/01/D/NZ5/02841
„Badania asocjacji i ekspresji genów *IREB2* i *FAM13A* jako czynników ryzyka rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc i raka płuc”
Czas trwania: 1.12.2011-29.02.2016 r.
- Narodowe Centrum Nauki, SONATA 11, nr 2016/21/D/NZ5/00072
„Efekt wyłączenia genu *FAM13A* w komórkach raka płuc”
Czas trwania: 8.02.2017-7.02.2021 r.

Prowadzenie zajęć-wykładów o charakterze popularnonaukowym:

Od początku mojej pracy naukowej jestem zaangażowana w działalność stowarzyszenia Gen-i-już, działającego przy Instytucie Genetyki Człowieka PAN, którego celem jest popularyzacja nauki wśród dzieci przedszkolnych i wczesnoszkolnych. W ramach tej działalności prowadziłam i nadal prowadzę cykl wykładów połączonych z warsztatami badawczymi organizowanymi stacjonarnie w IGCz PAN oraz na zajęciach wyjazdowych w ramach Mobilnej Akademii Nauki.

Wybrane wykłady popularyzujące naukę:

- Lekcja genetyki: "DNA, komórki i nowotwory", Instytut Genetyki Człowieka PAN, 29.09.2018 r.
- Cykl wykładów: "Komórki i DNA czyli po nitce do kłębka"; Instytut Genetyki Człowieka PAN. 2017-obecnie.

Wykłady popularyzujące naukę na warsztatach wyjazdowych:

- "DNA, komórki i przedszkolaki", Przedszkole Piraciki, Suchy Las, 5.02.2018 r.
- "Komórki i DNA czyli po nitce do kłębka", Szkoła Podstawowa nr 12 im. Wielkopolskiej Brygady Kawalerii, 21.11.2019 r.

Ponadto czynnie uczestniczyłam w organizacji innych wydarzeń popularyzatorskich takich jak Noc Biologów (2021 r.) oraz Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki (2021 r.).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

- Pierwsza nagroda za prezentację plakatową pt.: *"Frequency of Heterozygous I171V Mutation in the NBS1 Gene in Multiple Primary Tumors and Larynx Cancer"*. 5th European Workshop on Basic Biology of Head & Neck Cancer, Poznań, 16-18.11.2006 r.
- Nagroda Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN za wyróżnioną pracę doktorską, 2008 r.
- Nagroda Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN za artykuł oryginalny pt. *„RAD50 gene mutations are not likely a risk factor for breast cancer in Poland”*, Mosor M, Ziolkowska-Suchanek I, Roznowski K, Baranowska M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. Breast Cancer Res Treat. 2010;123(2):607-9.
- Stypendium START dla wybitnych młodych naukowców przyznane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, 2014 r.
- Nagroda "Aegean Conference Travel Award" za wygłoszony wykład pt. *"Hypoxia-induced FAM13A modulates lung cancer cells growth, metastatic potential and actin cytoskeleton organization"* na konferencji 7th International Conference on Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic Targets, Kos, Grecja, 18-25.09.2021 r.

Odbyte kursy i szkolenia:

- Kurs hodowli komórkowych pod patronatem Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ang. American Type Culture Collection - ATCC), Poznański Park Naukowo-Technologiczny, 2015 r.
- Szkolenie dla osób uczestniczących w procedurach na zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 8 - 21.06.2018 r.
- Zarządzanie zespołem międzynarodowym – trening międzykulturowy, Instytut Genetyki Człowieka PAN, 24-25.02.2021 r.
- Łączone szkolenie „PolLasa” dla osób odpowiedzialnych za planowanie, wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta, pod patronatem Krajowej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, Warszawa, 1 – 28.07.2020 r.
- Szkolenie w ramach projektu Next Level pt. „Experiments with the use of laboratory animals – is it so difficult? Practical, ethical and legal aspects of working with laboratory animals”, Instytut Genetyki Człowieka PAN, 20.04.2021 r.

Przerwy w pracy naukowej:

Podczas swojej pracy miałam dwie dłuższe przerwy związane z urlopami macierzyńskimi:

- 01.05.2009 - 17.09.2009 (140 dni)
- 03.05.2012 - 17.10.2012 (168 dni)

Podsumowanie dorobku naukowego:

Jestem autorką 24 prac naukowych (w tym 21 prace posiadają IF).

W ośmiu pracach jestem pierwszym i jednocześnie korespondującym autorem.

W dziewięciu pracach jestem autorem wiodącym, w jednej senioralnym.

Dane bibliometryczne (z dnia 5.11.2021):

Sumaryczny IF (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji): **82,788**

Sumaryczna liczba punktów ministerialnych (MNiSzW): **1083**

Indeks Hirscha (wg Web of Science): **8**

Liczba cytowań (wg Web of Science): **133**

Ponadto:

Jestem współautorką 26 doniesień zjazdowych.

Sprawowałam opiekę naukową nad czterema stażystami .

Byłam promotorem jednej pracy inżynierskiej oraz trzech prac magisterskich.

Byłam stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (START 2014).

Prowadzę działalność popularyzującą naukę.

Byłam członkiem Zespołu Ekspertów Narodowego Centrum Nauki w dwóch edycjach konkursu PRELUDIUM oraz jednej edycji MINIATURY.

Brałam/biorę udział w realizacji dziesięciu projektów badawczych, w tym w dwóch jako kierownik.

Szczegółowy opis wszystkich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku nr 4A.

Jwona diotkowska-Suchanek

(podpis wnioskodawcy)

Poznań, 29.11.2021r.