

dr Zuzanna Bukowy-Bieryłło

Załącznik nr 3. AUTOREFERAT

Instytut Genetyki Człowieka PAN

Poznań 2022

I. IMIĘ I NAZWISKO:

Zuzanna Bukowy-Bierytło (nazwisko panieńskie: Bukowy)

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE - Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 2003 magister biotechnologii roślin i mikroorganizmów**
Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Temat pracy magisterskiej: „ *A study of the region 19q13.2-3 on the long arm of the chromosome 19 in association with breast cancer*”
Promotor: prof. dr hab. Zygmunt Hejnowicz
- 2009 doktor nauk biologicznych, specjalność biochemia**
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie
Tytuł pracy doktorskiej: „ *Czynniki regulujące aktywności białka WRN*”
Promotorzy: prof. dr hab. Barbara Tudek (IBB Warszawa) oraz prof. Tinna Stevnsner (Aarhus Universitet, Dania)

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.

- 2009-2012** Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
stanowisko: **badacz**
- 2012- 08.2014** Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Stanowisko: **asystent**
- 09.2014 - obecnie** Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Stanowisko: **adiunkt**
- 2017- obecnie** SWPS Uniwersytet Humanistycznospołeczny, Wydział Zamiejscowy w Poznaniu
Stanowisko: **wykładowca**

IV. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY.**Wprowadzenie**

Przedmiotem moich zainteresowań naukowych jest pierwotna dyskineza rzęsek (PCD), rzadka choroba genetyczna występująca u 1 na 10 000 do 1 na 20 000 żywych urodzeń [4,5]. Przyczyną PCD jest upośledzenie funkcji rzęsek ruchomych, zakonserwowanych ewolucyjnie organelli, które składają się z ciała podstawnego zakotwiczonego w błonie komórkowej oraz wystającej poza obręb komórki, otoczonej błoną, aksonemy (**1**). Rzęski ruchome występują na powierzchni komórek obecnych w wielu tkankach organizmu człowieka, takich jak drogi oddechowe, jajowody, witki plemników czy węzeł zarodkowy, gdzie pełnią funkcje motoryczno-transportowe.

Nieprawidłowy ruch lub brak ruchu rzęsek ruchomych związany jest z szeregiem objawów klinicznych, występujących w PCD. Upośledzone oczyszczanie dróg oddechowych z nagromadzonego śluzu i drobnoustrojów powoduje nawracające infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych (płuc, oskrzeli, zatok, uszu), które z biegiem czasu prowadzą do rozstrzeni oskrzeli i

upośledzenia funkcji oddechowej płuc, aż do konieczności transplantacji płuc włącznie (4). Defekty rzęsek ruchomych obecnych w jajowodach oraz witkach plemników powodują odpowiednio obniżoną płodność u kobiet oraz niepłodność u mężczyzn (4). Na skutek upośledzenia ruchu rzęsek ruchomych obecnych w węźle zarodkowym, około 50% pacjentów z PCD posiada odwrócone położenie serca i trzewi (łac. *situs inversus*). Ten podtyp PCD nosi nazwę zespołu Kartagenera, na cześć Manesa Kartagenera, który po raz pierwszy w 1936 roku opisał specyficzne połączenie objawów klinicznych: odwrócenia trzewi, rozstrzeni oskrzeli oraz przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (6).

U niektórych pacjentów PCD mogą występować także nieprawidłowości w innych układach ustroju niż te, w których występują rzęski ruchome (tzw. objawy syndromiczne). Objawy te związane są z innym typem rzęsek obecnym w organizmie człowieka, rzęskami pierwotnymi. Rzęski pierwotne pełnią w organizmie przede wszystkim rolę czuciową, natomiast podobieństwo struktury rzęsek pierwotnych i ruchomych powoduje, że niektóre geny są ważne jednocześnie dla funkcjonowania obydwu typów rzęsek. Patogenne warianty w takich genach mogą powodować syndromiczne przypadki PCD, w których u pacjentów oprócz objawów typowych dla PCD występują także np. zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, niepełnosprawność intelektualna, czy otyłość (4, 7).

Ze względu na niespecyficzne objawy kliniczne oraz brak jednego „złotego” testu diagnostycznego, wiarygodna diagnoza PCD nie jest łatwa. Zwykle PCD rozpoznaje się przez połączenie objawów klinicznych, specjalistycznych testów przesiewowych (pomiar stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym z nosa, *nNO*) oraz analizę funkcji i struktury rzęsek oddechowych za pomocą jednej lub kilku metod (np. wideomikroskopia w przyspieszonym tempie, *high-speed videomicroscopy*, HSVM; transmisyjna mikroskopia elektronowa rzęsek, TEM; barwienie immunofluorescencyjne rzęsek, IF) (4). Dopiero później identyfikuje się patogenne zmiany w konkretnych genach, będące przyczyną choroby.

Nawet w przypadku pacjentów z PCD, wszystkie te metody mogą dawać wyniki niejednoznaczne lub niewskazujące na PCD (np. w przypadku mutacji genów *DNAH11* i *HYDIN*, ultrastruktura rzęsek w TEM pozostaje niezmienną) (8, 9). Dlatego też, od wyniku pojedynczego testu diagnostycznego ważniejsza jest zbieżność pomiędzy wynikami różnych metod (4, 7). Dodatkowym utrudnieniem w procesie diagnozy PCD jest fakt, że na niektóre metody diagnostyczne mają wpływ również czynniki środowiskowe (np. infekcje, palenie tytoniu czy refluks żołądkowo-przłykowy mogą zaburzać ruch rzęsek ruchomych i wpływać na wynik analizy HSVM) (10). W takich wypadkach zwykle rozwiązaniem jest wykonanie analiz funkcjonalnych i strukturalnych rzęsek na pierwotnych (pobranych od pacjenta) komórkach nabłonka oddechowego (*airway epithelium*, AE) zróżnicowanych w hodowli *in vitro*, w nieobecności czynników powodujących wtórne upośledzenie ruchu rzęsek (10).

Ze względu na rzadkie występowanie PCD, niski stan wiedzy na temat choroby wśród lekarzy oraz wysoce kosztowne i specjalistyczne metody diagnostyczne, kompleksowa diagnostyka PCD jest wyzwaniem dla służby zdrowia. Nie wszystkie kraje mają możliwość całościowej diagnozy PCD w wyspecjalizowanych laboratoriach, takich jak np. PCD Service w Wielkiej Brytanii (11). Obecnie w Polsce diagnozowanie PCD możliwe jest dzięki współpracy między ośrodkami klinicznymi (np. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Rabce-Zdrój: klinika, pomiar *nNO*, HSVM), ośrodkami wykonującymi badania TEM (np. Katedra i Zakład Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz Instytutem Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu (HSVM, hodowla nabłonka *in vitro*, barwienia IF, badania genetyczne).

Leczenie PCD polega na zapobieganiu infekcjom oraz stosowaniu codziennej fizjoterapii w celu usunięcia śluzu z dróg oddechowych (12). W przypadku infekcji, dodatkowo stosuje się także

intensywną terapię antybiotykową. W przypadku problemów z niepłodnością, u mężczyzn z PCD można zastosować zapłodnienie *in vitro* (4, 7).

Upośledzenie funkcji rzęsek ruchomych powodujące PCD jest najczęściej związane z występowaniem patogennych wariantów w genach kodujących składniki strukturalne rzęsek odpowiedzialne za generację lub regulację ruchu.

Podstawowa struktura aksonemy rzęsek ruchomych obejmuje 9 dubletów mikrotubul (MT) ułożonych na obwodzie rzęski wraz z dodatkową parą MT ułożoną w centrum rzęski (tzw. układ 9+2). Obwodowe dublety MT połączone są szprychami promienistymi z parą centralną, a dublety MT są między sobą połączone za pomocą białek kompleksu neksynowo-dyneinowego.

Typowy ruch rzęsek składa się z fazy pracy, podczas której rzęska porusza się w pozornie sztywny sposób w kierunku działania siły, oraz z fazy powrotnej, podczas którego rzęska ugina się, a jej koniec powoli powraca do pozycji początkowej. Na poziomie molekularnym, ruch rzęsek jest generowany przez zewnętrzne ramiona dyneinowe, które przesuwają obwodowe dublety MT względem siebie a wzdłuż osi rzęski. Inne struktury obecne w rzęsce ruchomej, takie jak kompleks pary centralnej, szprychy promieniste i kompleks neksynowo-dyneinowy regulują aktywność ramion dyneinowych obecnych na poszczególnych dubletach obwodowych, zamieniając w ten sposób ruch posuwisty dubletów MT na ugięcie rzęski (1). Położenie pary centralnej MT wyznacza także kierunek, w którym porusza się (bije) rzęska. Dla skutecznego funkcjonowania rzęsek ruchomych w danej tkance, ważne jest, aby ruch rzęsek odbywał się w podobny kierunek, z podobną częstotliwością, odpowiednio zsynchronizowany.

Obecny stan wiedzy na temat podłoża genetycznego PCD jest doskonałym przykładem efektywności nowoczesnych technologii sekwencjonowania genomu w identyfikacji przyczyn chorób genetycznych. O ile sama choroba została odkryta na początku XX w. przez Manesa Kartagenera (6), o tyle dopiero 30 lat później, w 1967r., Bjorn Afzelius zaproponował związek objawów klinicznych pacjentów z nieprawidłową strukturą rzęsek ruchomych (13). Pierwszy gen odpowiedzialny za PCD został zidentyfikowany dopiero w 1999 (14). Do 2009 roku zidentyfikowano następne 9 genów (2, 8, 15–19). Ogromny przełom nastąpił dzięki zastosowaniu technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji, które znacznie przyspieszyły proces identyfikacji nowych genów związanych z PCD. Od 2009 roku, dzięki tym technikom, liczba genów związanych z patogenezą PCD zwiększyła się z 10 do ponad 50 (20–24). W jednej z prac włączonych do cyklu habilitacyjnego (rozdział w książce) przedstawiłam postępy w identyfikacji genów związanych z PCD, które dokonały się w latach 2009-2016 (3/ Witt i Bukowy-Bierytło 2016, Kartagener's syndrome).

Pomimo tak wysokiej liczby poznanych genów związanych z patogenezą PCD, u ok. 30% pacjentów przyczyna PCD wciąż pozostaje niewyjaśniona (20, 25). Oznacza to, że istnieją wciąż nieznane geny powodujące tę chorobę, a badania w tym kierunku są jak najbardziej uzasadnione.

Większość genów związanych z PCD koduje białka wchodzące w skład makrokompleksów białkowych występujących tylko w rzęskach ruchomych (np. ramiona dyneinowe, szprychy promieniste, kompleks pary centralnej, kompleks neksynowo-dyneinowy). Ponieważ elementy rzęsek są syntetyzowane w cytoplazmie komórki, skuteczny transport do- i wewnątrz- rzęskowy jest niezbędny do stworzenia właściwej jej struktury oraz funkcji (1). Dlatego też część poznanych genów sprawczych w PCD jest związana z transportem elementów strukturalnych rzęski z cytoplazmy do ciała podstawnego i wyrastającej z niego aksonemy (25). Niewielka liczba spośród poznanych genów związanych z PCD koduje białka zaangażowane w proces różnicowania rzęsek ruchomych – amplifikację ciałek podstawnych (multiciliogeneza – *MCIDAS*, *CCNO*, *FOXJ1*),

kotwiczenie ciałek podstawnych do błony komórkowej (*OFD1*) lub funkcjonowanie rejonu aksonemy pomiędzy ciałkiem podstawnym a aksonemą, tzw. strefy przejściowej (*transition zone*, gen *RPGR*) (25, 26). Mutacje *OFD1*, *RPGR* wpływają także na funkcjonowanie rzęsek pierwotnych i mogą być związane z występowaniem dodatkowych syndromicznych objawów PCD (np. zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, otyłość, polidaktylia, niepełnosprawność intelektualna) (2, 18). W dwóch pracach włączonych do cyklu habilitacyjnego podejmuję zagadnienie genetycznej i fenotypowej charakterystyki pacjentów PCD z mutacjami w tych genach (1/ Bukowy-Bierytło et al., *Pediatric Pulmonology* 2013; 2/ Bukowy-Bierytło et al., *J Med. Genet* 2019).

W diagnostyce PCD wykorzystuje się także hodowle komórek pierwotnych AE zróżnicowane w hodowli *in vitro*, w nieobecności czynników powodujących upośledzenie ruchu rzęsek [10]. Hodowle *in vitro* komórek pierwotnych AE człowieka mogą być także używane do weryfikacji funkcji nowych genów-kandydatów PCD lub do badania wpływu nowo zidentyfikowanych zmian w sekwencji DNA w znanych genach (tzw. warianty o nieznanym znaczeniu, *variant of unknown significance*, *VUS*) na przykład na ekspresję białka w trakcie różnicowania AE. Niestety, brak dokładnych danych na temat zmienności biologicznych procesów zachodzących podczas różnicowania AE (np. zmian ekspresji poszczególnych genów związanych z PCD lub różnicowaniem nabłonka w czasie) utrudnia i przedłuża prowadzenie takich badań. W jednej z prac włączonych do cyklu habilitacyjnego podjęłam się charakterystyki czasowych profili ekspresji 14 genów związanych z różnicowaniem różnych typów komórek AE w jednym z najbardziej znanych typów hodowli komórek AE, hodowli na styku powietrza i cieczy (*air-liquid interfacem ALI*) (4/ Bukowy-Bierytło et al., *Eur J Cell Biol*, 2022).

W związku z dynamicznym rozwojem nowych technologii związanych z modyfikacją genomu lub transkryptomu człowieka (technika CRISPR-Cas9, terapie genowe, stymulacja odczytu przedwczesnych kodonów stop), intensywnie badana jest możliwość zastosowania tych metod do zmniejszenia lub zniwelowania objawów występujących u pacjentów z chorobami genetycznymi. Jako że znaczny odsetek (30%) wszystkich chorób genetycznych człowieka jest spowodowany obecnością przedwczesnych kodonów STOP (*premature termination codons*, PTCs), wywołanych przez mutacje nonsensowne (27), celem wielu z tych technologii jest wyeliminowanie lub ograniczenie efektów przedwczesnej terminacji translacji białek.

Poza terapią genową, jedną z metod umożliwiających korektę efektów PTCs jest zastosowanie związków stymulujących zjawisko translacyjnego odczytu tych kodonów (*premature termination codon readthrough*, TC-RT). TC-RT to zjawisko zachodzące naturalnie w komórce eukariotycznej; polega ono na tym, że pomimo obecności PTC w mRNA, do syntetyzowanego peptydu włączany jest tRNA niosący aminokwas (zwykle Glu lub Trp) (28, 29). Dzięki temu translacja mRNA zawierającego PTC w ramce odczytu genu jest kontynuowana aż do naturalnego kodonu STOP, powodując powstanie białka pełnej długości, z substytucją pojedynczego (czasem nieprawidłowego) aminokwasu (27). W celach terapeutycznych, badane są możliwości zwiększenia częstości tego procesu, poprzez zastosowanie związków chemicznych stymulujących zjawisko TC-RT, takich jak np. antybiotyki aminoglikozydowe (AAG), ich pochodne i mimetyki. AAG, takie jak m.in. gentamycyna, paromycyna, amikacyna czy G418, wiążą się z rybosomem i wpływają m.in. na wierność wiązania kodon-antykodon. Zamiast terminacji translacji, AAG stymulują przyłączanie się tRNA do tworzonego polipeptydu i przejście przez PTC obecny w mRNA (27). Niestety, słaba przenikalność do komórek oraz oto- i nefrotoksyczność AAG ograniczają możliwość zastosowania wyższych stężeń w celu uzyskania wyższego poziomu stymulacji TC-RT (27).

Tym niemniej, zarówno na poziomie badań pilotażowych na liniach komórkowych, modelach zwierzęcych i w próbach przedklinicznych wykazano, że zastosowanie AAG może być skuteczną

metodą terapii w przypadku chorób genetycznych. Wykazano, że w przypadku pacjentów z pęcherzowym oddzielaniem się naskórka (*epidermolysis bullosa*), zastosowanie maści z AAG – gentamycyną, przyspiesza leczenie ran **(30)**. Stymulacja TC-RT przez AAG jest szczególnie skuteczna, gdy nie jest wymagany wysoki poziom ekspresji funkcjonalnego białka. Wykazano, że w przypadku mukowiscydozy (*cystic fibrosis*, CF), podniesienie poziomu białka CFTR do 5% naturalnego poziomu wystarczało do złagodzenia objawów chorobowych pacjentów **(31)**. Nie jest do końca wiadome, jak wysoki poziom białka były potrzebny do złagodzenia objawów u pacjentów z PCD.

Niestety, efektywność podejścia TC-RT zależy od dużej liczby czynników, takich jak np. rodzaj kodonu stop, sekwencja otaczająca kodon, zastosowany związek chemiczny, jego stężenie, poziom czynników degradujących transkrypty zawierające PTC (NMD, *nonsense-mediated decay*) w tkance, czy nawet rodzaj tkanki. W takim wypadku możliwość stymulacji TC-RT należy rozpatrywać i testować indywidualnie dla każdego badanego PTC. Dlatego też, w ostatniej pracy z cyklu, podejmuję zagadnienie wykorzystania stymulacji odczytu przedwczesnych kodonów stop w odniesieniu do mutacji genów PCD **(5/ Bukowy-Bierytło et al., RNA Biology 2016)**.

Główne cele podjętych przeze mnie badań w dziedzinie PCD były następujące:

- I. Identyfikacja genetycznych podstaw PCD, ze szczególnym uwzględnieniem syndromicznych form PCD w populacji słowiańskiej.
- II. Analiza biologicznych podstaw PCD, w tym ekspresji genów podczas różnicowania nabłonka oraz możliwości terapii poprzez stymulację translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP.

Powyższe problemy badawcze zostały podjęte przeze mnie w serii pięciu prac, które przedstawiam razem jako osiągnięcie naukowe zatytułowane:

”Pierwotna dyskineza rzęsek (wrodzona dysfunkcja rzęsek ruchomych) – podstawy genetyczne, biologiczne oraz możliwości terapii”

stanowiącą podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

*Omówienie prac włączonych do cyklu**Publikacja 1:*

Bukowy-Bieryłło Z, Ziętkiewicz E, Loges NT, Wittmer M, Geremek M, Olbrich H, Fliegauf M, Voelkel K, Rutkiewicz E, Rutland J, Morgan L, Pogorzelski A, Martin J, Haan E, Berger W, Omran H*, Witt M*. RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia. *Pediatr Pulmonol.* 2013 Apr;48(4):352-63. DOI: 10.1002/ppul.22632. *- wspólne autorstwo

Pierwszym aspektem badań genetycznego podłoża PCD, w moich badaniach po uzyskaniu stopnia doktora, był wątek syndromicznych form PCD – przypadków, w których oprócz objawów związanych z upośledzeniem funkcjonowania rzęsek ruchomych, występują także objawy upośledzenia funkcjonowania rzęsek pierwotnych. Pierwszym analizowanym genem był *RPGR*.

RPGR jest położony w chromosomie X i koduje białko obecne w strefie przejściowej aksonemy. Prawidłowe funkcjonowanie *RPGR* jest niezbędne dla właściwego funkcjonowania siatkówki oka, a mutacje *RPGR* odpowiadają za 70% przypadków retinopatii barwnikowej siatkówki sprzężonej z chromosomem X (*X-linked retinitis pigmentosa*, XLRP). Poprzednie badania wykazały, że niektóre mutacje *RPGR* mogą powodować przypadki syndromiczne, w których oprócz zaniku wzroku, pojawiają się dodatkowe objawy oddechowe typowe dla PCD, a czasem także upośledzenie słuchu (18, 32). Wykonana w naszym Zakładzie analiza tego genu w populacji polskich pacjentów z PCD pozwoliła na identyfikację pojedynczej rodziny z mutacjami *RPGR*. W rodzinie tej występowali mężczyźni z hemizygotyczną mutacją *RPGR*, którzy cierpieli na XLRP i objawy typowe dla PCD, ale w przeciwieństwie do wcześniejszych obserwacji (18), nie mieli objawów związanych z upośledzeniem słuchu, nie wykazywali też zmian w strukturze aksonemy. Dzięki współpracy międzynarodowej z innymi ośrodkami zajmującymi się PCD, zidentyfikowaliśmy także pacjenta z Australii z inną hemizygotyczną mutacją *RPGR*, który posiadał podobne objawy PCD; rzęski oddechowe tego pacjenta również nie wykazywały zmian w strukturze aksonemy.

Współpraca z prof. Heymutem Omranem w Universitätsklinikum Münster w Niemczech, umożliwiła przeprowadzenie ciliogenezy *in vitro* komórek od polskiego pacjenta i członków jego rodziny PCD (w tamtym czasie ta technika nie była jeszcze dostępna w naszym Zakładzie). Analiza HSVM wzoru bicia rzęsek oddechowych pacjenta i jego krewnych bez objawów PCD wykazała, że rzęski oddechowe były w sposób nieskoordynowany, mimo że poruszały się właściwym torem ruchu i z właściwą częstotliwością. Jako, że skuteczne funkcjonowanie nabłonka orzęsionego opiera się na skoordynowanym ruchu rzęsek w podobnym kierunku, brak koordynacji ruchu rzęsek mógłby być przyczyną upośledzenia oczyszczania śluzowo-rzęskowego, a przez to powodować PCD. Wykonana przeze mnie analiza orientacji par centralnych mikrotubul rzęsek w obrazach TEM wykazała dysorientację sąsiadujących ze sobą rzęsek oddechowych u pacjenta z mutacją *RPGR*, w porównaniu do osób cierpiących na nawracające infekcje dróg oddechowych, ale nie chorujących na PCD. Wyniki te sugerowały, że białko *RPGR* może również wpływać na proces oczyszczania śluzowo-rzęskowego dróg oddechowych, poprzez rolę w ustanowieniu właściwej orientacji rzęsek oddechowych.

Przeprowadzone przeze mnie porównanie z piśmiennictwem po raz pierwszy wykazało, że mutacje *RPGR* nie muszą być związane z upośledzeniem słuchu, czy zmianami w strukturze aksonemy. Nasze obserwacje potwierdziły także wcześniejsze doniesienia (33), że o ile mutacje *RPGR* zwykle są związane z występowaniem XLRP, o tyle związek *RPGR* z występowaniem objawów PCD jest bardziej skomplikowany i nie zawsze bezpośredni. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach (33), również w badanej przez nas rodzinie występowali mężczyźni z hemizygotyczną

mutacją RPGR, którzy cierpieli na XLRP, ale bez objawów PCD. Być może jest to związane z tkankowo-specyficzną rolą jednej z izoform RPGR (RPGR¹⁻¹⁹) (34).

Do tej pory ta praca pozostaje jedną z najlepiej cytowanych prac w moim dorobku podoktorskim (53 cytowania w bazie Web of Science na dzień 12.04.2022).

Publikacja 2:

Bukowy-Bieryłło Z, Rabiasz A*, Dabrowski M*, Pogorzelski A, Wojda A, Dmenska H, Grzela K, Sroczynski J, Witt M, Zietkiewicz E. Truncating mutations in exons 20 and 21 of *OFD1* can cause primary ciliary dyskinesia without associated syndromic symptoms. J Med Genet. 2019 Nov; 56(11):769-777. DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105918

*- wspólne autorstwo

OFD1 był kolejnym genem powodującym syndromiczną formę PCD, którego mutacje zostały zidentyfikowane w wyniku analizy genetycznej PCD prowadzonej w naszym Zakładzie. Podobnie jak *RPGR*, *OFD1* jest także położony w chromosomie X, a kodowane przez niego białko nie wchodzi bezpośrednio w strukturę aksonemy, koduje bowiem białko będące składnikiem centrioli oraz ciałek podstawnych rzęsek (35). Dane literaturowe wskazują, że *OFD1*, będąc składnikiem ciałek podstawnych, jest niezbędne do tworzenia rzęsek pierwotnych: bierze udział w kotwiczeniu ciałek podstawnych do błony komórkowej oraz w tworzeniu tzw. strefy przejściowej rzęski, z której następnie poprzez wydłużanie MT powstaje aksonema (36). Patogenne warianty tego genu są związane z występowaniem kilku zespołów chorobowych (ciliopatii): zespołu ustno-twarzowo-palcowego typu 1 (OFDS1), zespołu Jouberta typu 10 (JBS10) oraz zespołu Simpsona-Golabi-Behmela typu 2 (SGBS2) (2, 37, 38). Wspólną cechą tych zespołów jest występowanie defektów w tkankach posiadających rzęski pierwotne (np. układ szkieletowy lub nerwowy), co może prowadzić np. do dysmorfii twarzy, poli – lub brachydaktylii, upośledzonego rozwoju mózgu lub poważnej niepełnosprawności intelektualnej. Nasilenie objawów chorobowych u pacjentów w dużej mierze zależy jednak od stopnia skrócenia białka pod wpływem mutacji. Ponadto, u pacjentów z SGBS2, oprócz poważnych wad neurologicznych i szkieletowych, znaleziono także kliniczne objawy upośledzenia funkcjonowania układu oddechowego, podobne do tych obserwowanych w PCD. Doprowadziło to do zaklasyfikowania *OFD1* jako jednego z genów powodujących syndromiczną postać PCD związaną z chromosomem X (2). Praca ta zasugerowała też, że *OFD1* bierze również udział w funkcjonowaniu rzęsek ruchomych.

W toku diagnostyki PCD u pacjentów z naszego banku DNA, za pomocą sekwencjonowania całego eksomu (*whole exome sequencing*, WES), przeanalizowano grupę 120 pacjentów, u których wcześniejsze badania przesiewowe 80 najczęściej zmutowanych eksonów w 13 genach powodujących PCD nie zidentyfikowały żadnych mutacji. U dwóch pacjentów (581 i 855) zidentyfikowano dwie dotąd nieznane hemizygotyczne mutacje *OFD1*. Po potwierdzeniu zidentyfikowanych mutacji przez sekwencjonowanie metodą Sangera i określeniu segregacji wariantów w rodzinach, przeanalizowano resztę badanej grupy pod kątem mutacji *OFD1*, identyfikując kolejnych dwóch pacjentów posiadających kolejne nieznane dotąd mutacje *OFD1* w stanie hemizygotycznym (pacjenci 343 i 961). Wszystkie zidentyfikowane mutacje były zlokalizowane w części 3' genu (eksony 20 lub 21 z 23) i wprowadzały do transkryptów *OFD1*

przedwczesne kodony STOP. Wykazano, że u dwóch z czterech pacjentów (961 i 855) transkrypty *OFD1* nie były degradowane, ale ulegały ekspresji w skróconej formie. Za pomocą IF potwierdzono też obecność białka OFD1 w ciałkach podstawnych rzęsek AE.

W toku przeprowadzonej przeze mnie analizy fenotypu klinicznego pacjentów wykazano brak poważnych objawów związanych z zespołem OFD1S lub SGBS2, takie jak niepełnosprawność intelektualna czy dysmorfia twarzy. Jedyne objawy kliniczne związane z tymi zespołami ograniczały się do płaskostopia i zwiększonego obwodu głowy (pacjent 855), niepełnosprawności intelektualnej w stopniu lekkim połączonej z polidaktylią (pacjent 961) lub nieznaczną dysmorfia twarzy (pacjent 343). Badania metodą rezonansu magnetycznego głowy wykazały u pacjentów 855 i 961 brak szstandarowego dla JBST10 defektu struktury mózgu, tzw. znaku zęba trzonowego.

Wszyscy pacjenci z zidentyfikowanymi mutacjami OFD1 wykazywali szereg objawów typowych dla PCD, takie jak zespół ostrej niewydolności oddechowej w okresie noworodkowym, nawracające infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych, zapalenie ucha wewnętrznego z postępującą utratą słuchu, obturację oskrzelowo-płucną czy refluks żołądkowo-przłykowy. U pacjenta 855 występowało także odwrócenie trzewi, sugerujące, że OFD1 wpływa na ruch rzęsek węzła zarodkowego, odpowiedzialnych za ustalanie symetrii stron ciała. Zarówno wyniki oceny objawów klinicznych związanych z PCD za pomocą narzędzia PICADAR (39), jak i wyniki pomiarów [nNO] wskazywały na duże prawdopodobieństwo PCD u tych pacjentów.

Przeprowadzona przeze mnie analiza przyżyciowa ruchu rzęsek oddechowych pacjentów 855 i 961 za pomocą HSVM wykazała znaczne upośledzenie ruchu rzęsek (rzęski całkowicie lub prawie nieruchome); widoczny był także brak koordynacji ruchu rzęsek zlokalizowanych na tych samych lub sąsiadujących komórkach. W niektórych komórkach zaobserwowano także wyjątkowo długie rzęski – nawet pięciokrotnie dłuższe.

Analiza fenotypu rzęsek oddechowych za pomocą TEM i IF nie wykazała zmian w ultrastrukturze aksonemy. Jednakże, szczegółowa analiza preparatów TEM od pacjenta 581 wykazała radykalnie zmniejszoną liczbę rzęsek na powierzchni nabłonka oraz nieprawidłową lokalizację ciałek podstawnych rzęsek – przeważnie znajdowały się w cytoplazmie, zamiast na błonie komórkowej. Za pomocą IF, również dla pacjenta 855 wykazano akumulację ciałek podstawnych w cytoplazmie. Potwierdziło to opisywaną w literaturze rolę OFD1 w kotwiczeniu ciałek podstawnych rzęsek do błony komórkowej (36).

Porównanie naszych wyników z piśmiennictwem wykazało 12 innych przypadków pacjentów z mutacjami w OFD1, u których oprócz objawów zespołów neurodegeneracyjnych takich jak OFD1S, SGBS2 czy JBST10, zaobserwowano objawy ze strony układu oddechowego związane z rzęskami ruchomymi. Wszystkie mutacje zidentyfikowane u tych pacjentów znajdowały się w części dystalnej *OFD1*, w eksonach 16-21, a połowa (6/12) tych przypadków posiadała mutacje w eksonach 20 i 21 *OFD1*, podobnie jak czterech pacjentów polskich. Obserwacje te sugerowały, że mutacje w C-terminalnej części OFD1 mogą wpływać na funkcjonowanie rzęsek ruchomych, ale wpływ tych mutacji na funkcjonowanie rzęsek pierwotnych może być ograniczony. Szczegółowe porównanie struktury OFD1 oraz lokalizacji mutacji u pacjentów, u których występowały objawy ze strony układu oddechowego sugeruje także, że być może jedna z obecnych na końcu C białka OFD1 domen, tzw. rejon wewnętrznie nieustrukturyzowany, ma wpływ na funkcjonowanie rzęsek ruchomych. Ponadto, w związku z obecnością objawów oddechowych i brakiem silnych objawów związanych z rzęskami pierwotnymi u naszych pacjentów, uzasadnionym jest, aby eksony 20-21 *OFD1* były włączone do puli genów lub eksonów badanych podczas poszukiwania przyczyn PCD u pacjentów z klasycznymi objawami PCD.

Praca opublikowana w *Journal of Medical Genetics* była pierwszą obserwacją, że mutacje *OFD1* mogą powodować PCD bez objawów syndromicznych poza układem oddechowym. Ponadto, jest to także pierwsze doniesienie, że mutacje *OFD1* mają wpływ na długość rzęsek pacjentów - dotychczas opierano się jedynie na wynikach uzyskanych w modelach komórkowych i zwierzęcych (36, 40).

Obserwacje te stały się podstawą do złożenia wniosku o grant wewnętrzny Instytutu Genetyki Człowieka PAN, którego byłem kierownikiem (zał. IV, II.15). Zdobyte w ten sposób środki wykorzystałam do przygotowania komórek HEK zawierających mutacje skracające zlokalizowane w eksonie 14 lub 20 *OFD1* przy użyciu techniki CRISPR-Cas9. Nawiązałam także współpracę z prof. Mariusem Ueffingiem z Uniwersytetu w Tuebingen, który jest znanym autorytetem w dziedzinie proteomiki rzęsek oraz zdobyłam środki na szkolenie w zakresie tej techniki (zał. IV, II.11). Rezultaty badań zostały także wykorzystane jako wyniki wstępne we wniosku grantowym OPUS pt. „Charakterystyka interaktorów białka *OFD1* (oral-facial-digital syndrome type 1) oraz ich roli w biogenezie rzęsek ruchomych”, złożonym do Narodowego Centrum Nauki w Krakowie w grudniu 2019 roku.

Publikacja 3:

Witt M, Bukowy-Bierytło Z. **Primary Ciliary Dyskinesia (Kartagener Syndrome)**. Rozdział w: 'Epstein Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis' 3rd Edition, Oxford, UK. Oxford University Press 2016, pp.221-227

Uzupełnieniem cyklu moich prac doświadczalnych dotyczących genetyki PCD jest praca przeglądowa, w której podsumowano aktualny stan wiedzy dotyczący podstaw klinicznych i genetycznych PCD. Praca ta była naturalną konsekwencją mojej powiększającej się wiedzy na temat PCD, jak również intensywnego postępu w tej dziedzinie w ciągu ostatnich lat. Mimo, że w latach 2009-2016 zidentyfikowano 27 nowych genów PCD, intensywny rozwój w dziedzinie PCD obejmował nie tylko rosnącą wiedzę na temat podłoża genetycznego tej choroby. W wyniku kilku międzynarodowych programów integrujących naukowców i klinicystów pracujących nad PCD, takich jak Task Force of the European Respiratory Society, projekty Syscylia czy Bestcilia, światowi eksperci opracowali szereg zaleceń dotyczących rozpoznawania i leczenia PCD [7, 20, 25, 30]. Zasady te zostały podsumowane w pracy, wraz z listą możliwych powikłań, które mogą utrudniać i spowalniać proces diagnostyczny.

Ponadto, w pracy zawarto również opis objawów klinicznych PCD oraz częstości ich występowania w okresie niemowlęcym, dzieciństwie, okresie dojrzewania oraz dorosłości. Dokonano także kompleksowego przeglądu 32 znanych w tamtym okresie genów powodujących PCD, opisując ich funkcję oraz wady struktury lub ruchu rzęsek, spowodowane przez ich uszkodzenia. Ponieważ defekty rzęsek wywołane przez uszkodzenia genów związanych z PCD mogą być wykorzystane do ukierunkowania diagnostyki genetycznej pacjenta, opis ten był również przydatny dla diagnostów.

Praca ta została opublikowana przez prestiżowe wydawnictwo Oxford University Press, jako rozdział 19 w trzecim wydaniu sztandarowego dzieła genetyki medycznej, pt. „**Epstein Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis**”, gdzie otwierała dział poświęcony chorobom genetycznym związanym z zaburzeniami funkcji rzęsek.

Publikacja 4:

Bukowy-Bieryłło Z, Daca-Roszak P, Jurczak J, Przysiałowska- Macioła H, Jaksik R, Witt M, Ziętkiewicz E. *In vitro* differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – The framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies. Eur J Cell Biol, 2022 Jan, 101 (1): 151189, 13, doi: /10.1016/j.ejcb.2021.151189M

Jedną z najlepiej znanych i przebadanych metod hodowli pierwotnych komórek AE jest hodowla ALI, w której komórki pierwotne AE różnicuje się na porowatej membranie. Pozwala to na uzyskanie hodowli o strukturze bardzo podobnej dla dojrzałego AE dróg oddechowych (41). Dzięki temu podobieństwu, hodowle ALI są szeroko wykorzystywane w badaniach biologii, patofizjologii i toksykologii układu oddechowego.

Niestety, wykorzystanie hodowli ALI w badaniach genetyki PCD napotyka na kilka ograniczeń, m.in. brak informacji o zmienności ekspresji poszczególnych genów charakterystycznych dla poszczególnych typów komórek AE w czasie oraz o skali zmienności ekspresji poszczególnych genów między dawcami. Utrudnia to szybkie porównanie stanu zróżnicowania nabłonka pomiędzy pacjentami a osobami zdrowymi, między pacjentami z różnymi mutacjami, a także ustalenie wpływu nowych wariantów sekwencji DNA genów powodujących chorobę na dynamikę lub stopień różnicowania nabłonka. Ogranicza to także wykorzystanie hodowli ALI oraz badań ekspresji genów w procesie diagnostyki PCD. Co prawda takie badania mogą być wykonane z użyciem metod wysokoprzepustowych (np. sekwencjonowanie transkryptomu, RNAseq), jednak analiza wyników takich badań jest czasochłonna i wymaga specjalistycznych umiejętności, które nie są dostępne dla wszystkich laboratoriów.

Dlatego też celem naszej pracy była charakterystyka czasowego profilu ekspresji genów związanych z różnicowaniem nabłonka oddechowego. Analizę przeprowadzono w komórkach pierwotnych zdrowych dawców, utrzymywanych w warunkach hodowli ALI przy użyciu pożywki Pneumacult ALI, powszechnie stosowanej w badaniach pierwotnych komórek AE oraz w diagnostyce PCD. W badaniach skupiono się na 14 genach, które w różnych etapach różnicowania AE ulegały ekspresji w odmiennych typach komórek występujących w nabłonku dróg oddechowych. Szczególną uwagę zwrócono na geny związane z różnicowaniem i funkcjonowaniem komórek rzęskowych. Do badania wybrano: 2 geny zaangażowane w indukcję procesu ciliogenezy i namnażanie ciałek podstawnych rzęsek (*FOXJ1* i *CCP110*), 3 geny biorące udział w składaniu elementów strukturalnych rzęsek ruchomych (*DYX1C1*, *SPAG1*, *CFAP300*) oraz 4 geny kodujące elementy strukturalne rzęsek (*DNAH5*, *DNALI1*, *CCDC40*, *RSPH4A*). Za wyjątkiem *CCP110*, dla wszystkich genów z tej grupy udowodniono związek z patogenezą PCD. Ponadto, aby lepiej ocenić stan zróżnicowania hodowli, przeanalizowano także ekspresję genów specyficznych dla innych typów komórek AE, takich jak 2 geny charakterystyczne dla komórek macierzystych AE (*MKI67* i *KRT5*), związanych z regeneracją nabłonka po uszkodzeniu. Przebadano także ekspresję kilku genów związanych z różnicowaniem w kierunku innego typu komórek AE: komórek kolumnowych (*columnar cells*) lub komórek kubkowych (*SCGB1A1*, *MUC5AC* oraz *CFTR*), produkujących śluz. Poziom mRNA dla poszczególnych genów w różnych dniach hodowli ALI pochodzących od 4 dawców analizowano przy użyciu specjalnie zaprojektowanych macierzy TLDA (TaqMan Low-Density Array), opartych o metodę qRT-PCR. Profile czasowe ekspresji wszystkich analizowanych genów uzyskane metodą TLDA następnie porównywano z danymi uzyskanymi metodą RNAseq dla tego samego dawcy. W celu porównania poziomu transkryptów z poziomem odpowiedniego białka

(bądź białka pełniącego taką samą funkcję) wykonano także barwienie IF krioskrawków uzyskanych z poszczególnych hodowli.

Badania umożliwiły określenie czasowych profili w tym punktów maksymalnej ekspresji badanych 14 genów powiązanych z poszczególnymi typami komórek AE. Przeprowadzenie analizy TLDA w hodowlach ALI pochodzących od kilku dawców umożliwiło także zbadanie międzynosobniczych różnic w poziomach ekspresji. Dzięki analizie współczynnika zmienności (*coefficient of variation*, CV), statystycznej miary rozproszenia punktów danych ekspresji dla wszystkich dawców wokół średniej wykazano, że poziom ekspresji niektórych genów, bardziej niż innych, różnił się między dawcami. Największe różnice między dawcami zaobserwowano dla jednego z genów specyficznych dla komórek rzęskowych, *CCDC40* (uśredniona wartość CV dla wszystkich analizowanych punktów czasowych wynosiła ~112%). Wysokie różnice między dawcami wykazywały również dwa geny związane z komórkami kolumnowymi i kubkowymi, *SCGB1A1* i *MUC5AC* (średnie CV dla tych genów wynosiły odpowiednio 106% i 89%). Zgodnie z poprzednimi doniesieniami (42), bardzo niską zmienność poziomu ekspresji między dawcami zaobserwowano dla genu *CCP110* związanego z namnażaniem ciałek podstawnych rzęsek (średnie CV dla wszystkich punktów czasowych wynosiło tylko 10%). Nową obserwacją była stosunkowo niska zmienność ekspresji trzech genów związanych z komórkami rzęskowymi: *DNALI1*, *CFTR* i *DYX1C1*. Średnie CV dla tych genów wynosiło poniżej 30% (odpowiednio 28, 28 lub 30%). Sugeruje to, że podobnie jak w przypadku *CCP110*, poziomy transkryptów tych trzech genów także mogą być w jakiś sposób regulowane. Analiza jakościowa preparatów IF pochodzących z hodowli ALI od różnych dawców pozwoliła wysnuć wniosek, że obserwowane międzynosobnicze różnice w poziomach ekspresji obserwowane w TLDA mogą być spowodowane różnicami w składzie powstałego AE (np. w ilości komórek kubkowych lub rzęskowych). Jako, że takie jakościowe różnice były już wcześniej obserwowane w AE pochodzącym od pacjentów w różnych stanach zdrowia (43, 44), nasze wyniki potwierdzają, że czynniki zewnętrzne (np. infekcje) mogą wpływać na potencjał do różnicowania komórek macierzystych w kierunku różnych typów komórek AE.

Szczegółowe czasowe profile ekspresji 14 genów uzyskane za pomocą TLDA były bardzo podobne do profili czasowych uzyskanych metodą sekwencjonowania transkryptomu RNAseq dla próbek tego samego zdrowego dawcy. Wskazywało to, że metoda TLDA jest wiarygodną metodą badania ekspresji genów podczas różnicowania nabłonka w hodowli ALI. Ponadto, zaobserwowano dobrą korelację pomiędzy zmianami intensywności sygnałów białek w IF, a zmianami ilości transkryptów analizowanych metodą TLDA, co potwierdziło zasadność użycia macierzy TLDA do badań transkryptów.

Uzyskane w czasie badań profile czasowe ekspresji transkryptów badanych genów pozwoliły na identyfikację najlepszych punktów czasowych dla ewentualnych przyszłych analiz ekspresji genów AE z użyciem hodowli ALI i pożywki Pneumacult. Wyniki te mogą mieć zastosowanie do badań biologicznych podstaw PCD np. do potwierdzenia funkcji nowych genów-kandydatów PCD lub do analizy wpływu wariantów VUS w sekwencji DNA na ekspresję białka w trakcie różnicowania AE. Ze względu na wysoką popularność hodowli ALI w innych dziedzinach, uzyskane profile czasowe mogą stanowić także użyteczne odniesienie dla badań funkcjonalnych nabłonka oddechowego w innych chorobach układu oddechowego, np. w patofizjologii mukowiscydozy (CF) czy przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (COPD).

Podsumowując, uzyskana w badaniu wysoka korelacja wyników TLDA i RNAseq, poparta analizą IF białek ulegających ekspresji wykazała, że test TLDA jest wiarygodnym i nie wymagającym długotrwałej bioinformatycznej obróbki, podejściem do analizy ekspresji wybranych genów zaangażowanych w różnicowanie AE.

Uzyskane dane dotyczące profili ekspresji genów zostaną w wykorzystanie w badaniach prowadzonych w Zakładzie, m.in. do analizy ekspresji alternatywnych izoform białek (projekt doktorski Joanny Jurczak), a także do analizy różnicowania nabłonka w komórkach z wprowadzonymi VUS (weryfikacja genów-kandydatów PCD oraz badania mutacji białka OFD1).

Publikacja 5:

Bukowy-Bieryłło Z*, Dabrowski M*, Witt M, Zietkiewicz E. **Aminoglycoside-stimulated readthrough of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia.** RNA Biol. 2016 Oct 2;13(10):1041-1050. DOI: [10.1080/15476286.2016.1219832](https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1219832)

*- wspólne pierwsze autorstwo

Ostatnia z prac dotyczy nurtu związanego z biologicznymi podstawami PCD, a w szczególności oceny możliwości terapii poprzez stymulację translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP. Badania te prowadziłam wspólnie z doktorantem, mgr Maciejem Dąbrowskim (byłam jego promotorem pomocniczym), w ramach realizacji grantu nr NCN, 2011/01/B/NZ4/04840, którego byłam głównym wykonawcą (zał. IV, pkt.II.9).

Do badań wybrano 16 PTC obecnych w 5 genach PCD (*DNAH5*, *DNAH11*, *RSPH4A*, *CCDC40*, *SPAG1*), które zostały zidentyfikowane podczas naszych badań polskich pacjentów PCD. Geny te zostały tak dobrane, aby ich mutacje powodowały wyraźny defekt funkcji rzęsek, a ewentualne efekty TC-RT były łatwe do obserwacji.

Wstawki z sekwencjami 16 mutacji wraz z ich otoczeniem sekwencyjnym (min. 8 nt w każdym kierunku) wklonowano do wektora pDluc (dar dr J. Atkinsa, University of Utah, USA). Wektor ten koduje dwa geny lucyferaz o różnej specyficzności substratowej (lucyferaza *rluc* z meduzy oraz *fluc* ze świetlika). Sekwencje DNA obejmujące przedwczesny kodon STOP wraz z ich sekwencjami otaczającymi wklonowano w ramce odczytu do polilinkera znajdującego się pomiędzy lucyferazami *rluc* i *fluc*. Taka lokalizacja sekwencji powodowała, że w obecności PTC we wstawce, translacja białka kończyła się po lucyferazie *rluc*, co powodowało powstanie krótkiego białka, wykazującego luminescencję tylko po podaniu substratu dla lucyferazy *rluc*. W przypadku stymulacji procesu TC-RT, powstawało dłuższe białko, które wykazywało luminescencję po podaniu substratu dla lucyferazy *rluc* oraz *fluc*.

Dla każdej z 16 wstawek zawierających PTC przygotowano także wektor kontrolny z sekwencją typu dzikiego. Przygotowane pary wektorów (z PTC oraz z sekwencją typu dzikiego) przetestowano następnie w dwóch układach: *in vitro* transkrypcji i translacji oraz *ex vivo* w przejściowo transfekowanej linii komórkowej nabłonka nerki. Do badań wykorzystano 4 AAG o potwierdzonym działaniu stymulującym TC-RT: gentamycynę, genetycynę (G418), paromomycynę i amikacynę.

Analizy poziomu TC-RT w badaniach *in vitro* wykazały, że z 16 par wektorów, 5 z nich poddawało się stymulacji TC-RT. Z zastosowanych AAG, najwyższy poziom stymulacji uzyskano w obecności G418, następnie gentamycyny lub paromomycyny. Amikacyna nie wykazywała stymulacji TC-RT, dlatego została wykluczona z dalszych badań.

Pięć wektorów wykazujących najwyższy poziom TC-RT *in vitro* (*DNAH5* ex.32; *DNAH5* ex.49; *RSPH4a* ex.3a oraz ex.3b; *SPAG1* ex.16 i *DNAH5* ex.20) analizowano następnie *ex vivo* w przejściowo transfekowanej linii komórkowej HEK, w celu oceny efektywności TC-RT w komórkach w obecności maksymalnych możliwych (nie powodujących nefrotoksyczności) stężeń AAG.

Zaobserwowano, że poziom stymulacji PTC dla testowanych wektorów w zastosowanym modelu komórkowym był znacznie niższy (3-5 razy) w stosunku do wartości uzyskanych w badaniach *in vitro*, nawet jeśli *ex vivo* zastosowano stężenia AAG, które były o 2 rzędy wielkości wyższe. Oznacza to, że o ile system *in vitro* jest wystarczający do zbadania wrażliwości PTC na stymulację, o tyle nie wystarcza do badań poziomu stymulacji TC-RT w żywych komórkach.

W celu zbadania wpływu AAG na nabłonek oddechowy i jego różnicowanie, przeanalizowano także działanie AAG w hodowlach komórek pierwotnych AE zdrowych dawców hodowanych w kierunku ciliogenezy. Wykazano, że za wyjątkiem G418, większość badanych związków w ich najwyższych stężeniach nie zakłócała procesu ciliogenezy w hodowlach.

Analiza sekwencji DNA dla PTC, które poddawały się procesowi TC-RT sugerowała, że PTC zawierające kodony UGA były bardziej podatne na stymulację za pomocą AAG niż PTC zawierające kodony UAG. Nie zaobserwowano odczytu żadnego PTC zawierającego kodon UAA. Analiza nukleotydu następującego po PTC (tzw. nt +4) nie wykazała jasnej korelacji między rodzajem nukleotydu a stopniem podatności na TC-RT. Brak było również jasnej korelacji między rodzajem użytego AAG, a efektywnością stymulacji TC-RT. Po raz kolejny wskazuje to na fakt, że każdy PTC musi być indywidualnie testowany w zakresie związków, które mogą stymulować TC-RT.

Plakat opisujący postępy projektu zaprezentowany na IV Kongresie Genetyki w 2013 roku w Poznaniu otrzymał nagrodę Złotej Helisy za najlepszy plakat w sekcji *Wybrane choroby genetyczne w pediatrii, internie, neurologii i psychiatrii*. Kolejny plakat na temat projektu p.t. *Translational suppression of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia*, Dąbrowski M, Bukowy-Bierytło Z, Ziętkiewicz E. otrzymał nagrodę sponsora za najlepszy plakat na 1st Training School/ 2nd Young Researchers' Meeting of BEAT-PCD w 2016 roku w Paryżu. Praca uzyskała także wyróżnienie Poznańskiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk za najlepszą publikację oryginalną opublikowaną w 2016 roku, z młodym naukowcem jako pierwszym autorem (M. Dąbrowski). Praca ta stanowi także pierwsze i jak dotąd, jedyne opublikowane badanie dotyczące możliwości zastosowania TC-RT w PCD.

Rozpoczęte badania były kontynuowane w postaci dwóch wniosków grantowych złożonych przez mgr. Macieja Dąbrowskiego: w konkursie NCN Etiuda (*Stymulowany związkami chemicznymi translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w wybranych genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)*) oraz w konkursie NCN Preludium (*Translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek- stymulacja związkami nieaminoglikozydowymi jako alternatywa dla antybiotyków aminoglikozydowych*)
(<https://projekty.ncn.gov.pl/index.php?s=11840>) oraz
(<https://projekty.ncn.gov.pl/index.php?s=13686>)

Najważniejsze wyniki uzyskane podczas opisanych badań oraz ich możliwe zastosowanie:

1. Charakterystyka roli białka RPGR u pacjentów PCD ze współistniejącym zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki:
 - Charakterystyka alternatywnego fenotypu syndromicznego PCD związanego z mutacjami RPGR, obejmującego upośledzenie wzroku, bez upośledzenia słuchu.
 - Identyfikacja roli białka RPGR obecnego w ciałku podstawnym rzęsek w ustanowieniu właściwej orientacji rzęsek nabłonka oddechowego.

Informacja ta może zostać wykorzystana podczas diagnostyki genetycznych podstaw zwyrodnienia barwnikowego siatkówki ze współistniejącymi objawami oddechowymi.

2. Charakterystyka mutacji końca C białka OFD1:
 - Identyfikacja mutacji skracających położonych w eksonach 20-21 OFD1 jako przyczyny PCD bez silnych objawów syndromicznych.

Możliwość wykorzystania podczas diagnostyki genetycznych przyczyn PCD u pacjentów z klasycznymi objawami PCD.

3. Ocena możliwości terapii PCD poprzez stymulację translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP:
 - Charakterystyka wpływu AAG na stymulację translacyjnego odczytu PTC w odniesieniu do mutacji związanych z PCD.

Konieczność wykorzystania w terapii PCD związków innych niż AA G.

4. Analiza ekspresji genów związanych z różnicowaniem nabłonka oddechowego w hodowli ALI:

- Charakterystyka czasowych profili ekspresji dla klas genów powiązanych z poszczególnymi typami komórek AE zdrowych dawców.

Możliwość wykorzystania profili jako odniesienia podczas weryfikacji nowych genów PCD lub analizy wpływu wariantów VUS w znanych genach PCD.

*Łączny Impact Factor prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy JCR wynosi 15,632.
Suma punktów według list MNiSW/MEiN wynosi łącznie 305.
Według bazy Web of Science, prace te były cytowane 87 razy.*

V. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Pozostałe kierunki prowadzonych przez mnie badań, poza osiągnięciem wynikającym z art. 219 ust. 1 pkt. 2 lit. b 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), obejmują lub obejmowały następujące główne obszary zainteresowań:

Poszukiwanie markerów zasocjowanych z ryzykiem występowania nowotworów

Moje wczesne zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół zagadnień związanych z nowotworami, w szczególności poszukiwania markerów zasocjowanych z ryzykiem ich występowania. Badania te prowadziłam na Uniwersytecie Aarhus w Danii, gdzie w ramach wymiany studenckiej Erasmus realizowałam badania do pracy magisterskiej, obronionej później na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Celem badań było poszukiwanie markerów genetycznych w rejonie 19q13.2-3 zlokalizowanych w długim ramieniu chromosomu 19, które umożliwiłyby określenie ryzyka wystąpienia nowotworów różnego typu, a także pozwoliłyby na zaklasyfikowanie pacjentek do grup ryzyka.

Badania, w które byłam zaangażowana wykazały, że kilka polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphism*, SNP) położonych w pobliżu genu *RAI* (*RelA Associated Inhibitor*) jest silnie sprzężonych z ryzykiem wystąpienia raka podstawnokomórkowego skóry, a także nowotworów piersi oraz płuc (*Publikacje 1-3*). W ramach pracy magisterskiej przeprowadziłam badania SNP znajdujących się w rejonie promotorowym *RAI*. Badania te pozwoliły na identyfikację 4-nukleotydowej delecji w sąsiadującym z nim genem *XPD-d1* (dbSNP#3916791), która znacznie częściej występowała w grupie kobiet z rakiem piersi niż w grupie osób zdrowych ($p=0,0048$), co sugerowało, że SNP ten jest silnie sprzężony z chorobotwórczą mutacją. Połączenie *XPD-d1* z jednym z 3 SNP wykazującym najwyższą asocjację z chorobą (*RAI1*, *ASE1e1* lub *ERCC1e4*) istotnie zwiększało iloraz szans wystąpienia raka piersi u kobiet przed 55 rokiem życia (maksymalne OR=2,4, 95% CI: 1,297-4,461). Wyniki prowadzonych przeze mnie badań zostały wykorzystane w dalszych poszukiwaniach mutacji sprawczej zwiększającej ryzyko zachorowania na raka piersi (*Publikacja 4*). W pracy tej wykazano, że specyficzna kombinacja 9 SNP ponad 6-krotnie zwiększała względne ryzyko zachorowania na raka piersi przed 55 rokiem życia ($RR = 6.25 (1.72 - 20)$, $p(\text{trend}) = 0.005$). Zależność ta pozwoliła na wykorzystanie kombinacji SNP do stworzenia testu diagnostycznego pozwalającego na określanie poziomu ryzyka zapadalności na raka piersi. Test został opatentowany w kilku krajach (zał. 4, pkt III.3).

Wyniki zostały opublikowane w pracach:

1. Rockenbauer E, Bendixen MH, **Bukowy Z**, Yin J, Jacobsen NR, Hedayati M, Vogel U, Grossman L, Bolund L, Nexø BA. Association of chromosome 19q13.2-3 haplotypes with basal cell carcinoma: tentative delineation of an involved region using data for single nucleotide polymorphisms in two cohorts. *Carcinogenesis*, 2002 Jul;23(7):1149-53.
2. Nexø BA, Vogel U, Olsen A, Ketelsen T, **Bukowy Z**, Thomsen BL, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A. A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene *RAI* is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55. *Carcinogenesis*, 2003 May;24(5):899-904.

3. Vogel U, Laros I, Jacobsen NR, Thomsen BL, Bak H, Olsen A, **Bukowy Z**, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A, Nexø BA, Raaschou-Nielsen O. Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer. *Mutat Res*, 2004 Feb 26;546(1-2):65-74.
4. Nexø BA, Vogel U, Olsen A, Nyegaard M, **Bukowy Z**, Rockenbauer E, Zhang X, Koca C, Mains M, Hansen B, Hedemand A, Kjeldgaard A, Laska MJ, Raaschou-Nielsen O, Cold S, Overvad K, Tjønneland A, Bolund L, Børghlum AD. Linkage disequilibrium mapping of a breast cancer susceptibility locus near RAI/PPP1R13L/iASPP. *BMC Med Genet*, 2008 Jun 27;9:56. doi: 10.1186/1471-2350-9-56.

Badanie wpływu stresu oksydacyjnego na aktywności enzymatyczne białka WRN

Kolejnym wątkiem badawczym, w który byłam zaangażowana, był wpływ stresu oksydacyjnego na starzenie, a w szczególności na aktywności enzymatyczne białka WRN. Białko WRN jest helikazą i 3'-5' egzonukleazą należącą do konserwatywnej rodziny helikaz RecQ, a jego brak powoduje zespół przedwczesnego starzenia, znany jako zespół Wernera (Werner Syndrome, WS). Poprzednie badania wykazały, że egzonukleaza białka WRN jest hamowana przez pewne uszkodzenia DNA (m.in. 8-oksoguaninę oraz 8-oksoadeninę), bezpośrednio wywoływane w zasadach DNA przez reaktywne formy tlenu (RFT). Uszkodzenia te hamowały egzonukleazę WRN, gdy były zlokalizowane w nici substratu trawionej przez egzonukleazę WRN. Inhibicja ta była zniesiona w obecności białek Ku, heterodimeru biorącego udział w naprawie podwójnoniciowych pęknięć DNA.

Podczas pierwszej części studiów doktorskich, realizowanej na Uniwersytecie Aarhus w Danii pod kierunkiem promotora zagranicznego, prof. Tinny Stevensner, wykazałam, że szereg innych uszkodzeń zasad DNA ma także zdolność hamowania egzonukleazy WRN. Inhibicja ta miała miejsce, gdy uszkodzenia były zlokalizowane w nici trawionej substratu, a białka Ku mogły również stymulować egzonukleazę WRN do przejścia przez te uszkodzenia. Ponadto, udowodniłam też, że niektóre uszkodzenia zasad DNA mogą hamować egzonukleazę WRN także, kiedy są położone w nici substratu nietrawionej przez egzonukleazę WRN, jednakże w takim wypadku, białka Ku nie mogły znieść blokady egzonukleazy WRN. Badania te były finansowane z programu Unii Europejskiej *Research Training Network*, a wyniki badań zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research (Publikacja 1)*.

Podczas drugiej części studiów doktorskich, realizowanej w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. Barbary Tudek, badałam także zmiany aktywności białka WRN pod wpływem trans-4-hydrokso-2-nonenalu (HNE), jednego z produktów peroksydacji lipidów. HNE jest wysoce reaktywnym produktem powstającym w komórce pod wpływem stresu oksydacyjnego, ma zdolność reagowania z kwasami nukleinowymi i białkami, wpływając na ich funkcje. Podobnie jak inne produkty peroksydacji lipidów, poprzez swoją reaktywność, połączoną ze stosunkowo długim okresem półtrwania, HNE może być 'nośnikiem' stresu oksydacyjnego w komórce.

W trakcie swoich badań wykazałam, że komórki ze zmniejszoną ekspresją białka WRN mają opóźnioną naprawę uszkodzeń HNE-DNA oraz zwiększony poziom adduktów HNE do białek. Zaobserwowałam także *in vitro*, że HNE może wpływać na aktywność helikazy WRN, co sugeruje, że zwiększona peroksydacja lipidów może mieć wpływ na aktywności enzymatyczne białka WRN oraz innych helikaz RecQ, a co za tym idzie, mieć związek z procesem starzenia. Badania te były finansowane z grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, a ich wyniki stały się podstawą kolejnych dwóch prac (*Publikacje 2-3*). Uzyskane wyniki stały się także podstawą mojej pracy doktorskiej, wyróżnionej przez Radę Naukową Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie nagrodą za najlepszą pracę doktorską w roku 2009.

1. **Bukowy Z**, Harrigan JA, Ramsden DA, Tudek B, Bohr VA, Stevnsner T. WRN Exonuclease activity is blocked by specific oxidatively induced base lesions positioned in either DNA strand. *Nucleic Acids Res*, 2008 Sep;36(15):4975-87
2. Maddukuri L., Speina E., Christiansen M., Dudzińska D., Zaim J., Obtulowicz T., Kabaczyk S., Komisarski M., **Bukowy Z**, Szczegielniak J., Wójcik A., Kuśmerek J.T., Stevnsner T., Bohr V.A., Tudek B. - Cockayne syndrome group B protein is engaged in processing of DNA adducts of lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Mutation Res*, 2009, 666 (1-2): 23-31.
3. Czerwińska J, Poznański J, Dębski J, **Bukowy Z**, Bohr VA, Tudek B, Speina E. Catalytic activities of Werner protein are affected by adduction with 4-hydroxy-2-nonenal. *Nucleic Acids Res*, 2014;42(17):11119-35.

Podstawy genetyczne PCD

Po obronie doktoratu w 2009 roku, rozpoczęłam pracę w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W początkowym okresie mojej pracy przeprowadziłam genotypowanie mutacji sprawczych w kilku genach związanych z rozwojem PCD, m.in. *DNAI1*.

Badania dotyczące genu *DNAI1* zostały wykonane w grupie 185 pacjentów PCD z rodzin polskich i słowackich. Za pomocą techniki SSCP (*single strand conformation polymorphism*) oraz sekwencjonowania Sangera w 12 rodzinach wykryto w sumie 5 mutacji typu zmiany sensu *DNAI1*, w tym trzy poprzednio opublikowane (IVS1+2-3insT, L513P i A538T) oraz dwie, dotąd nieznane, substytucje (C388Y i G515S). Przeprowadzono analizę haplotypową SNP, która wykazała, że dwie najczęściej spotykane mutacje, IVS1+2-3insT oraz A538T, posiadały wspólne pochodzenie ewolucyjne. Ustalono także, że najczęstsza w polskiej grupie badanej mutacja IVS1+2-3insT, występowała także najczęściej wśród pacjentów PCD na świecie (54% wszystkich mutacji). Z kolei mutacja A538T, druga najczęstsza w grupie słowiańskiej mutacja sprawcza, znacznie częściej występowała wśród Słowian, niż u innych pacjentów (36% analizowanych chromosomów w populacji słowiańskiej, 1% na świecie). Co ciekawe, w naszej grupie badanej, mutacja ta była częstsza w grupie pacjentów z odwróceniem trzewi.

Wyniki tych badań zaowocowały publikacją w *Respiratory Research* (Publikacja 1). Znajomość konkretnych mutacji *DNAI1* i ich lokalizacji w populacji słowiańskiej pozwoliła także na opracowanie szybszej metody diagnostyki mutacji *DNAI1*, dzięki skupieniu większości mutacji *DNAI1* jedynie w 4 fragmentach tego genu - intronie 1 oraz eksonach 13, 16, oraz 17. Wiedza ta do tej pory jest wykorzystywana podczas diagnostyki genetycznych przyczyn PCD u pacjentów polskich prowadzonej w naszym Zakładzie.

W następnej kolejności byłam zaangażowana w badania dotyczące genów kodujących białka szprych promienistych rzęsek. Podstawowym celem tych badań była ocena częstości mutacji genów *RSPH4A* i *RSPH9* u pacjentów PCD w populacji słowiańskiej oraz porównanie defektów ultrastrukturalnych rzęsek oddechowych występujących u polskich pacjentów, do pacjentów z Europy Zachodniej i USA. Uzyskane dane dotyczące częstości mutacji sugerowały, że mutacje w genie *RSPH4A*, a nie *RSPH9*, mogą stanowić dość częstą przyczynę PCD w populacji wschodnioeuropejskiej – w grupie pacjentów z defektami ułożenia MT odpowiadały nawet za 12% przypadków. Ponadto, w pracy tej wykazano, że wszystkie zidentyfikowane mutacje skupiały się w okolicy eksonów 1 i 3 *RSPH4A*, co miało duże znaczenie w przyspieszeniu procesu identyfikacji mutacji tego genu u pacjentów. Dane te zostały od razu wykorzystane w schemacie diagnostyki PCD stosowanym w naszym Zespole, umożliwiając lepsze dostosowanie procesu diagnostycznego do fenotypu pacjentów i przyspieszenie diagnostyki PCD u pacjentów bez

odwrócenia trzewi, których rzęski oddechowe wykazywały w TEM defekty ułożenia dubletów obwodowych MT.

Wyniki badania zostały opublikowane w *Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients*, w PLoS One (Publikacja 2). Publikacja ta stanowiła pierwsze tak duże badanie mutacji genów *RSPH4A* i *RSPH9* w populacji wschodnioeuropejskiej. Praca ta do tej pory pozostaje jedną z najlepiej cytowanych prac w moim dorobku podoktorskim.

Kolejnym genem związanym z PCD, w którego badanie byłam zaangażowana, był gen *CFAP300*. Podobnie jak w przypadku *OFD1*, mutacje *CFAP300* zidentyfikowano podczas sekwencjonowania WES prowadzonego w naszym Zakładzie na grupie 120 polskich pacjentów PCD bez zidentyfikowanych znanych mutacji. Analiza WES pozwoliła na identyfikację kilku pacjentów PCD z mutacją skracającą c.[198_200delTTTinsCC] zlokalizowaną w eksonie 3 *CFAP300*. Podczas analizy *CFAP300* u reszty pacjentów PCD bez zidentyfikowanych mutacji w znanych genach PCD (ok. 80 osób), znaleziono kolejnych 10 pacjentów z tą mutacją, zidentyfikowano także 2 nowe mutacje tego genu. Ogółem mutacje *CFAP300* występowały u 3,6% polskich pacjentów PCD.

Wcześniejsze badania na organizmach modelowych wskazywały, że *CFAP300* jest odpowiedzialny za transport kompleksów białkowych ramion dyneinowych zewnętrznych oraz wewnętrznych do rzęsek ruchomych podczas ich tworzenia. Wykonane przez nas badania strukturalne rzęsek oddechowych pacjentów PCD z mutacjami *CFAP300* potwierdziły te obserwacje. Rzęski oddechowe pacjentów wykazywały w TEM lub IF brak lub niewłaściwą lokalizację białek markerowych obydwu ramion dyneinowych, co jest typowym defektem struktury rzęsek wynikającym z niewłaściwego funkcjonowania genów transportujących kompleksy ramion dyneinowych. Ponadto, w modelu zwierzęcym płazińca *Schmidtea mediterranea* wykazano, że obecność *CFAP300* jest niezbędna dla właściwego funkcjonowania rzęsek ruchomych, które służą robakowi do poruszania się po podłożu. W ten pośredni sposób potwierdzono, że mutacje nonsensowne/wprowadzające przedwczesną terminację translacji *CFAP300* obecne u naszych pacjentów, mogą być przyczyną PCD. Nasz Zespół był jedną z dwóch grup badawczych na świecie, które pierwsze potwierdziły udział tego genu w patogenezie PCD u ludzi (46).

Wyniki naszych badań zostały zaprezentowane przez Prof. Ewę Ziętkiewicz (kierownik grantu) na spotkaniu projektu COST Beat-PCD w 2018 roku w Lizbonie. Praca opisująca wyniki tych badań została opublikowana w *American Journal of Molecular and Cell Biology* (Publikacja 3).

1. Ziętkiewicz, E; Nitka, B; Voelkel, K; Skrzypczak U; **Bukowy Z**, Rutkiewicz E; Huminska K; Przystalowska, H; Pogorzelski A; Witt M. Population specificity of the DNAI1 gene mutation spectrum in primary ciliary dyskinesia (PCD). *Respiratory Res.* 2010, 11 (1):174, doi: 10.1186/1465-9921-11-174
2. Ziętkiewicz E, **Bukowy-Bieryłło Z**, Voelkel K, Klimek B, Dmeńska H, Pogorzelski A, Sulikowska-Rowińska A, Rutkiewicz E, Witt M. Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients. *PLoS One.* 2012;7(3):e33667. DOI: 10.1371/journal.pone.0033667.
3. Ziętkiewicz E; **Bukowy-Bieryłło Z**; Rabiasz A; Dąca-Roszak P; Wojda A; Voelkel K; Rutkiewicz E; Pogorzelski A; Rasteiro M; Witt M. *CFAP300: Mutations in Slavic Patients with Primary Ciliary Dyskinesia and a Role in Ciliary Dynein Arms Trafficking.* *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019 Oct;61(4):440-449. doi: 10.1165/rcmb.2018-0260OC

Modele komórkowe używane do badań nabłonka oddechowego

Równoległe z badaniami genetycznych podstaw PCD w populacji polskiej, po rozpoczęciu mojej pracy w ZGMiK, rozwijałam także wątek modeli komórkowych używanych do badań AE.

Wiadomo, że czynniki środowiskowe, takie jak bakterie lub wirusy, oraz czynniki związane ze stylem życia, takie jak palenie tytoniu, mają istotny wpływ na strukturę i ruchliwość rzęsek oddechowych. Takie nabyte zmiany w ruchliwości rzęsek, obserwowane w próbkach pobranych od pacjentów, mogą zakłócać lub uniemożliwiać prawidłowe rozpoznanie wrodzonych zmian w funkcjonowaniu rzęsek **(10)**. W takim przypadku, jedynym rozwiązaniem pozwalającym na wiarygodną analizę ruchu rzęsek u chorych z PCD, którzy często cierpią z powodu infekcji dróg oddechowych, jest analiza ruchliwości rzęsek w pierwotnych komórkach AE, które zostały poddane różnicowaniu *in vitro*. Takie zróżnicowane *in vitro* komórki AE mogą być również wykorzystane w badaniach procesu różnicowania nabłonka, mechanizmów wnikania patogenów oddechowych, rozwoju infekcji czy toksykologii.

Dużym ograniczeniem hodowli *in vitro* komórek AE jest brak możliwości wyprowadzenia linii komórkowych, ze względu na utratę zdolności komórek pierwotnych do tworzenia rzęsek ruchomych po unieśmiertelnieniu **(47)**. Niestety, nawet bez unieśmiertelnienia, komórki pierwotne AE tracą zdolność do tworzenia rzęsek, jeśli były pasażowane więcej niż 6-8 razy **(48)**. Dlatego też ten typ hodowli jest dość trudny, a sukces hodowli zależy od wielu czynników, m.in. od jakości i ilości materiału wyjściowego, składu i świeżości użytych pożywek itp. Tym niemniej, przy użyciu odpowiednich metod, nawet z wymazu z nosa można w celach diagnostycznych wyprowadzić pierwotne hodowle komórkowe w kierunku ciliogenezy **(48)**.

Jedną z metod hodowli komórek AE w kierunku ciliogenezy, znana jako metoda sekwencyjna, została przeze mnie wprowadzona do laboratorium ZGMiK już w połowie 2010 roku. Doświadczenia zdobyte podczas wprowadzania tej metody do repertuaru technik Zakładu umożliwiły mi napisanie artykułu przeglądowego dotyczącego dostępnych metod hodowli komórek AE w kierunku ciliogenezy z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej; artykuł ten został opublikowany w *Journal of Applied Genetics* (**Publikacja 1**).

Dzięki zatrudnieniu w ramach 7. Programu Ramowego Unii Europejskiej (program HealthProt, więcej w Sekcji VII), podczas pracy w ZGMiK miałam okazję odbyć dwa wyjazdy szkoleniowe do laboratorium prof. Heymuta Omrana w Klinice Dzieci i Młodzieży Uniwersytetu w Münster w Niemczech. Profesor Omran, który od wielu lat współpracuje z zespołem ZGMiK, jest cenionym autorytetem w dziedzinie szeroko pojętej diagnostyki PCD (także molekularnej) oraz organizacji długotrwałej opieki nad pacjentami z PCD.

Dzięki pierwszemu pobytowi w laboratorium prof. Omrana (od 09.2010 do 03.2011, zał. IV, II.11) zoptymalizowałam warunki sekwencyjnej hodowli komórek nabłonkowych dróg oddechowych do celów ciliogenezy *in vitro*, metody, którą już wcześniej wprowadziłam do laboratorium ZGMiK. Poznałam również nowe techniki diagnostyki PCD, które wprowadziłam do repertuaru technik Zakładu (analiza ruchu rzęsek przez HSVM, barwienie IF w komórkach z hodowli oraz wymazów z nosa). Uczestniczyłam również w projekcie badawczym dotyczącym roli genu *RPGR* w patogenezie PCD, którego efektem była publikacja Bukowy-Bierytło i in., *Pediatr Pulmonol* 2013 (cykl prac, **Publikacja nr 1**).

Drugi, krótszy wyjazd do laboratorium prof. Omrana w Münster (01.2012 to 03.2012, zał. IV, II.11), poświęciłam na projekt porównujący ówczesnie istniejące metody różnicowania *in vitro* komórek AE metodą ALI. Dzięki prowadzonym przeze mnie doświadczeniom, zarówno zespół prof. Omrana, jak i nasz Zakład wprowadziły metodę hodowli ALI do swojego repertuaru technik.

Zdobyte w czasie mojej pracy w ZGMiK oraz podczas stażu w Münster doświadczenie w hodowli komórek pierwotnych AE stało się także podstawą do uzyskania przeze mnie projektu grantowego **SONATA** p.t. „Wpływ czynników zewnętrznych na dynamikę różnicowania nabłonka oddechowego w kontekście wykorzystania metod ciliogenezy *in vitro* w badaniach pierwotnej dyskinezy rzęsek” (NCN 2013/09/D/NZ4/01692, zał. IV, pkt II.9). W ramach tego projektu, wprowadzono do laboratorium m.in. metody mikroskopii elektronowej (SEM, TEM), które pozwoliły ocenić stan różnicowania nabłonka różnicowanego w hodowli metodą sekwencyjną oraz metodą ALI.

Nasze badania wykazały, że metoda hodowli sekwencyjnej, mimo że użyteczna w celu diagnostyki np. PCD, nie jest odpowiednia do badań ekspresji genów, ze względu na mało homogeny proces inicjacji różnicowania nabłonka. Wyniki wstępne grantu SONATA zostały zaprezentowane w postaci plakatu na Kongresie Genetyki/ Zjeździe PTGC w Bydgoszczy (zał. 4, pkt II.7, pkt 3). Ponadto, wprowadzone do laboratorium metody podsumowałam w pracy przeglądowej dotyczącej prac badawczych realizowanych w ZGMiK, opublikowanej w raporcie Polskiej Akademii PAN w 2017 r (*Publikacja 2*).

Ze względu na ograniczenia hodowli sekwencyjnej oraz tradycyjnej metody ALI, zainteresowałam się alternatywnymi metodami uzyskania orzęsionego AE (np. z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, iPSC) oraz metodami hodowli komórek nabłonka zwiększającymi możliwości podziału niezróżnicowanych komórek AE za pomocą chemicznego reprogramowania (tzw. metoda CRC, *conditionally reprogrammed cells*). W ramach tej tematyki, w 2021 roku opublikowałam pracę przeglądową dotyczącą długoterminowych hodowli warunkowo reprogramowanego nabłonka oddechowego człowieka (CRC-HAEs). Praca ukazała się w *Cell Communication and Signalling* (*Publikacja nr 3*). Metodę CRC wprowadzono do repertuaru technik Zakładu, jest ona obecnie stosowana do realizacji projektu doktorskiego doktorantki mgr Joanny Jurczak.

1. **Bukowy Z**, Ziętkiewicz E, Witt M: *In vitro* culturing of ciliary respiratory cells – a model for studies of genetic diseases. *J Appl Genet.* 2011, 52 (1): 39-51
2. **Bukowy-Bieryłło Z**, Voelkel K, Dąbrowski M, Rutkiewicz E, Dąca-Roszak P, Wojda A, Witt M, Ziętkiewicz E. Primary ciliary dyskinesia in the Polish population – from understanding the genetics basis to introduction of personalized therapy. *Polish Academy of Sciences, Annual Report*, 2017, 66-68
3. **Bukowy-Bieryłło Z**. Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we? *Cell Commun Signal.* 2021 May 27;19(1):63. doi: 10.1186/s12964-021-00740-z.

Metodyka diagnostyki PCD

Oprócz bezpośredniego udziału w diagnozowaniu PCD za pomocą różnych metod (np. HSVM czy IF), aktywnie zaangażowałam się także w prace międzynarodowego projektu COST BEAT-PCD (*BM1407 - Translational research in primary ciliary dyskinesia - bench, bedside, and population perspectives, BEAT-PCD*), którego celem było m.in. doskonalenie standardów diagnostyki i leczenia tej choroby oraz wymiana informacji na ten temat (więcej w części VII Autoreferatu pt. *Inne informacje dotyczące kariery zawodowej kandydata*).

W ramach tej tematyki, brałam udział m.in. w przygotowaniu publikacji opisujących przebieg corocznych Konferencji projektu BEAT-PCD, które odbywały się odpowiednio w 2017 r. w Walencji (2. Konferencja BEAT-PCD) oraz w 2018 roku w Lizbonie (3. Konferencja BEAT-PCD). Publikacje te podsumowywały postępy każdej z 4 tematycznych grup roboczych projektu BEAT-PCD oraz efekty prowadzonego w projekcie programu krótkich wyjazdów badawczych (*Short*

Term Scientific Mission, STSM). W publikacjach przedstawiono także kilkadziesiąt szkoleń i warsztatów zorganizowanych podczas obydwu konferencji projektu. Efektem wspólnej pracy zespołu autorów są publikacje w *BMC Proceedings* (*Publikacje 1-2*).

Ponadto zaangażowałam się także w opracowanie wspólnego stanowiska ekspertów na temat sposobu raportowania wyników diagnostyki PCD za pomocą TEM. Współpraca między 18 ośrodkami w 14 krajach prowadzącymi diagnostykę PCD za pomocą TEM umożliwiła uzgodnienie terminologii i definicji dla defektów strukturalnych rzęsek klasy 1, które są diagnostyczne dla PCD, oraz definicji defektów rzęsek klasy 2, które mogą wskazywać na rozpoznanie PCD, ale tylko w połączeniu z wynikami innych badań. W badaniach zdefiniowano także, jakie cechy powinna mieć próbka nabłonka o jakości wystarczającej do analizy TEM oraz jakie informacje powinny być zawarte w raporcie TEM, aby były pomocne w diagnozie PCD za pomocą innych metod diagnostycznych. Plakat podsumowujący wyniki tych badań został zaprezentowany na prestiżowym Kongresie Europejskiego Towarzystwa Pulmonologicznego (ERS) w 2019 roku, a jego streszczenie opublikowano w suplemencie do *European Respiratory Journal* (załącznik 4, II.7, pkt 1). Pełna wersja publikacji została opublikowana w regularnym wydaniu *European Respiratory Journal* (*Publikacja 3*). Praca do tej pory uzyskała 21 cytowań.

Ponadto, w 2021 roku razem z prof. Michałem Wittem oraz prof. Ewą Ziętkiewicz współredagowałam wydanie specjalne czasopisma *International Journal of Molecular Sciences* (Wydawnictwo MDPI) zatytułowane *Primary Ciliary Dyskinesia: Genetics, Molecular Mechanisms, Diagnostic and Therapeutic Perspectives*. W ramach wydania specjalnego opublikowano 8 prac ekspertów PCD z całego świata na temat genetyki, diagnostyki lub terapii PCD. Razem ze współredaktorami przygotowaliśmy także artykuł wstępujący (*Publikacja 4*).

1. Halbeisen F, Hogg C, Alanin MC, **Bukowy-Bieryłło Z**, Dasi F, Duncan J, Friend A, Goutaki M, Jackson C, Keenan V, Harris A, Hirst RA, Latzin P, Marsh G, Nielsen K, Norris D, Pellicer D, Reula A, Rubbo B, Rumman N, Shoemark A, Walker WT, et al.. Proceedings of the 2nd BEAT-PCD conference and 3rd PCD training school: part 1. BMC Proc. 2018). BMC Proceedings, 2018, 12 (Suppl 2):e1\ doi: 10.1186/s12919-018-0098-9
2. Farley H, Rubbo B, **Bukowy-Bieryłło Z**, Fassad M, Goutaki M, Harman K, Hogg C, Kuehni CE, Lopes S, Nielsen KG, Norris DP, Reula A, Rumman N, Shoemark A, Wilkins H, Wisse A, Lucas JS and Marthin JK., Proceedings of the 3rd BEAT-PCD Conference and 4th PCD Training School. BMC Proceedings 2018, 12, (Suppl 16):64. <https://doi.org/10.1186/s12919-018-0161-6>
3. Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, **Bukowy-Bieryłło Z**, De Santi M, Goggin P, Griffin P, Hegele RG, Hirst RA, Leigh MW, Lupton A, MacKenney K, Omran H, Pache JC, Pinto A, Reinholt FP, Schroeder J, Yiallourous P, Escudier E. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). Eur Respir J. 2020 Feb 14. doi: 10.1183/13993003.00725-2019
4. **Bukowy-Bieryłło Z**, Witt M, Zietkiewicz E. Perspectives for Primary Ciliary Dyskinesia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(8):4122. doi.org/10.3390/ijms23084122

Molekularne podstawy translacyjnego odczytu PTC

Zapoczątkowane przeze mnie w ZGMiK badania możliwości wykorzystania związków stymulujących TC-RT do terapii pacjentów PCD (cykl prac, *Publikacja nr 5*), zaowocowały także przygotowaniem dwóch prac przeglądowych na temat molekularnych podstaw tego procesu.

W pierwszej (*Publikacja 1*), podsumowano badania opisujące zależności między poziomem translacyjnego odczytu PTC a sekwencją mRNA, takie jak typ PTC, wpływ sekwencji okalającej PTC, tkankowo-specyficzny poziom transkrypcji danego genu czy poziom czynnika terminacji

transkrypcji w tkance oraz możliwe mechanizmy wyjaśniające te zależności. Druga praca przeglądowa (*Publikacja 2*) opisywała szerzej proces stymulacji translacyjnego odczytu PTC przez związki chemiczne, skupiając się na możliwości ich zastosowania w terapii chorób genetycznych. W ramach tej pracy, opisano możliwości stymulacji TC-RT przez szereg znanych antybiotyków, takich jak antybiotyki aminoglikozydowe, dipeptydowe (negamycyna) czy makrolidy (np. tylozyna). Podsumowano także możliwości stymulacji TC-RT przez związki, które nie posiadają właściwości antybiotyków, np. PTC124 (ataluren) czy pochodne AAG. Szczegółowo opisano także problemy związane z zastosowaniem terapii tymi związkami oraz problemy związane z biologią procesu TC-RT.

Prace te, których pierwszym autorem był prowadzony przeze mnie i prof. Ewę Ziętkiewicz doktorant, mgr Maciej Dąbrowski, zostały opublikowane w *RNA Biology* oraz *Molecular Medicine*. Do tej pory pozostają jednymi z lepiej cytowanych prac w moim dorobku (odpowiednio 83 i 59 cytowań wg bazy Web of Science z dnia 12.04.2022).

Kontynuacją zapoczątkowanych przeze mnie badań była także praca oryginalna na temat wykorzystania związków nieaminoglikozydowych (NAAG) do stymulacji przedwczesnych kodonów STOP występujących u polskich pacjentów PCD opublikowana w 2021 w *International Journal of Molecular Sciences (Publikacja nr 3)*. Praca ta była efektem projektów Preludium i Etiuda, których kierownikiem był doktorant mgr Maciej Dąbrowski. W pracy zbadano szczegółowo wpływ szeregu NAAG na żywotność i częstotliwość bicia rzęsek w AE zdrowych dawców, porównano także skuteczność PTC-RT stymulowanego NAAG z uprzednio stosowanymi AAG. Pomimo zmniejszonego toksycznego wpływu na nabłonek, wykazano niższy poziom stymulacji translacyjnego odczytu PTC przez NAAG, w porównaniu do uprzednio stosowanych AAG.

1. Dąbrowski M., **Bukowy-Bieryłło Z.**, Ziętkiewicz E. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes - The impact of RNA sequence. *RNA Biology*, 2015, 12 (9): 950-958
2. Dąbrowski M, **Bukowy-Bieryłło Z.**, Ziętkiewicz E. Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Mol Medicine*, 2018, 24:e25, doi.org/10.1186/s10020-0180024-7
3. Dąbrowski M, **Bukowy-Bieryłło Z.**, Jackson CL, Ziętkiewicz E. Properties of Non- Aminoglycoside Compounds Used to Stimulate Translational Readthrough of PTC Mutations in Primary Ciliary Dyskinesia. *Int J Mol Sci*. 2021 May 7;22(9):4923. doi: 10.3390/ijms22094923.

Naukowe zastosowania algorytmów komputerowych (analiza obrazu i analiza danych)

Większość moich badań prowadzona jest z wykorzystaniem barwień IF. Ręczna analiza licznych barwień IF przeprowadzanych w ZGMiK wzbudziła moje zainteresowanie tematem komputerowego przetwarzania obrazów w różnych preparatach (np. sferoidy hodowane w zawiesinie lub komórki z wymazu z nosa). W związku z tym nawiązałam współpracę z Politechniką Poznańską i Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN, w celu opracowania metody automatycznego liczenia jąder komórek w preparatach 3D (sferoidy z hodowli adherentno-zawiesinowej). Metoda ta została opracowana w oparciu o znane funkcje przetwarzania obrazu, następnie metoda została porównana ze znanymi wtyczkami w niekomercyjnym programie ImageJ (np. 3D Object Count, 3DOC). Opracowana przez nas metoda była bardziej precyzyjna w zliczaniu jąder komórek niż wtyczka 3DOC w programie ImageJ. Niestety, ograniczeniem metody było to, że jądra położone zbyt blisko siebie nie były rozpoznawane jako oddzielne obiekty. Ze względu na to, opracowana przez nas metoda nie została wykorzystana w dalszych badaniach. Plakaty

prezentujące nasze wyniki zostały jednak zaprezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Załącznik 4, II.7 pkt. 5 i 8).

Zdobyte dzięki tej współpracy doświadczenie w zakresie metod analizy obrazu pozwoliło mi na uzyskanie grantu podróznego na udział w projekcie EU NEUBIAS School of Image Analysis (6. Szkoła Analizy Obrazu NEUBIAS Training School in Image Analysis, Szeged, Węgry). Szkoła poszerzyła moje umiejętności w zakresie analizy obrazu za pomocą ImageJ i języka ImageJ Macro oraz innych dostępnych programów do analizy obrazu, np. Icy, Imaris itp. (Załącznik 4, II.14 pkt. 4).

Moje zainteresowania komputerową analizą obrazów poszerzyły się także o analizę danych. W związku z tym dołączyłam do konsorcjum RELISH (*Relevant Literature Search*) i jako jeden z ekspertów konsorcjum uczestniczyłam w opracowaniu efektywnych algorytmów wyszukiwania w bazach danych publikacji podobnych tematycznie. W ramach tej współpracy, dla szeregu publikacji związanych z PCD, zweryfikowałam skuteczność opracowanych algorytmów. Praca ta zaowocowała publikacją w jednym z najbardziej znanych czasopism informatycznych, Database (*Publikacja 1*).

1. Peter Brown, **RELISH Consortium***, Yaoqi Zhou. "Large expert-curated database for benchmarking document similarity detection in biomedical literature search." Database 2019

*- Z. Bukowy-Bierytło była członkiem konsorcjum

Nowe kierunki:

Obecnie kontynuuję badania nad białkiem OFD1 rozpoczęte po ukończeniu publikacji poświęconej jego genowi (cykl prac, **Publikacja nr 3**), oczekując na wyniki wniosku o przyznanie grantu OPUS na temat proteomicznego badania partnerów białkowych OFD1, w którym wykorzystalam wyniki przygotowane w ramach grantu wewnętrznego IGC PAN otrzymanego w 2019 roku (zał. IV, II.15). Wniosek ten złożyłam powtórnie do Narodowego Centrum Nauki w grudniu 2021 roku.

Kontynuuję także wątek sekwencjonowania wysokoprzepustowego zapoczątkowany w publikacji *In vitro differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – The framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies* (cykl prac, **Publikacja nr 4**). Wspólnie z prof. Ewą Ziętkiewicz oraz doktorantką, mgr Joanną Jurczak, prowadzimy badania alternatywnych izoform białek rzęskowych obecnych w trakcie różnicowania komórek AE (projekt OPUS, kierownik: prof. E. Ziętkiewicz, Załącznik 4, II.9). Jako przygotowanie do dalszych projektów wykorzystujących metody sekwencjonowania nowej generacji do regulacji ekspresji genów w AE, razem z mgr J. Jurczak odwiedziłyśmy w lutym 2022 laboratorium prof. Anke van den Berg w Uniwersyteckim Centrum Medycznym w Groningen (Niderlandy), w celu poszerzenia naszej wiedzy o projektowaniu i analizie badań miRNA. Wyjazd został sfinansowany z projektu europejskiego NEXT LEVEL (Horyzont2020) realizowanego w naszym Instytucie.

Ponieważ barwienia IF nabłonka oddechowego pacjentów pozostają ważnym elementem badań prowadzonych w naszym Zakładzie, w przyszłości planuję wdrożyć projekt dotyczący wpływu warunków przechowywania preparatów nabłonkowych na specyficzność barwień IF. Realizacja tego projektu będzie wymagała dalszego pogłębienia mojej wiedzy na temat technik analizy obrazu i metod ich automatyzacji. Dlatego w maju 2022 planuję krótkoterminowy wyjazd szkoleniowy w Uniwersytecie w Southampton, Wielka Brytania. Podczas tego wyjazdu będę miała okazję wziąć udział w praktycznym szkoleniu z obsługi mikroskopu konfokalnego oraz metod zautomatyzowanego zbierania i analizy obrazów. Uzyskałam już środki na ten wyjazd w ramach programu Erasmus + naszego Instytutu.

Podsumowanie dorobku naukowego:

Jestem autorką **26** prac naukowych, w których skład wchodzi **17** prac oryginalnych (wszystkie z Impact Factor), **5** prac przeglądowych (w tym jedna bez Impact Factor), **jeden** rozdział w książce, **dwa** sprawozdania z przebiegu konferencji oraz **jeden** artykuł wstępny. W **8** z moich prac jestem pierwszą autorką, a drugą - w kolejnych **5**. Byłam promotorem jednej pracy magisterskiej i licencjackiej, a także promotorem pomocniczym jednej pracy doktorskiej. W trakcie stażu podoktorskiego byłam zaangażowana w realizację **2** grantów instytucjonalnych, **4** grantów krajowych oraz **3** grantów europejskich (szczegółowy opis znajduje się w Załączniku 4).

VI. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.**OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE**

Oprócz udziału w konferencjach naukowych, regularnie prezentuję swoje wyniki na seminariach Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, prowadziłam także wykłady szkoleniowe dla uczestników studium doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (2018, 2019). Od 2016 r. wspólnie z pracownikami Uniwersytetu SWPS oraz innymi naukowcami z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, prowadzę zajęcia dydaktyczne na Uniwersytecie SWPS w Poznaniu w ramach interdyscyplinarnego przedmiotu „**Biologiczne źródła zachowania**” dla studentów dziennych i zaocznych na kierunku psychologia.

Moje osiągnięcia dydaktyczne obejmują także opiekę nad studentami. W trakcie stażu podoktorskiego byłam opiekunem pięciorga praktykantów, magistrantki i licencjuszki. W latach 2013-2018 byłam także opiekunem i promotorem pomocniczym doktoranta, mgr. Macieja Dąbrowskiego, prowadząc razem z nim badania dotyczące zastosowania translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w PCD. Praca doktorska mgr. Dąbrowskiego *Stymulowany aminoglikozydami translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w wybranych genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)* została obroniona w czerwcu 2018 i otrzymała wyróżnienie Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Od marca 2020 jestem promotorem pomocniczym doktorantki, mgr Joanny Jurczak.

OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

W trakcie mojego stażu podoktorskiego byłam organizatorem trzech konferencji naukowych poświęconych PCD, a także pierwszej w Polsce konferencji dla pacjentów z PCD.

W ramach projektu europejskiego HEALT-PROT współorganizowałam sympozjum naukowe *Genetyczne zaburzenia funkcji rzęsek oddechowych*, które odbyło się w dniach 25-26.11.2011 w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Pierwszy dzień z tego dwudniowego spotkania był skierowany do naukowców i personelu medycznego różnego szczebla (lekarze, fizjoterapeuci, pielęgniarki, w sumie 48 osób). Tematy poruszane w ciągu tego dnia obejmowały typowe i nietypowe objawy PCD, metody używane w diagnostyce i leczeniu pacjentów, a także nowoczesne metody wykorzystywane w badaniach naukowych rzęsek. Drugi dzień sympozjum był skierowany przede wszystkim do polskich pacjentów PCD i ich rodzin: przekazano podstawowe informacje na temat przyczyn i objawów PCD, poza tym odbyły się także praktyczne szkolenia na temat życia z PCD. Na spotkaniu dla pacjentów stawiło się 67 osób z całej Polski, co było pierwszym i od razu tak dużym, spotkaniem pacjentów PCD w kraju. W trakcie tego

spotkania zostało założone stowarzyszenie pacjentów z PCD, Polskie Towarzystwo Dyskinezy Rzęsek (<http://ptdr.org.pl/>).

W trakcie kolejnego projektu europejskiego, BESTCILIA, zdalnie zorganizowałam międzynarodową konferencję naukowo-szkoleniową *Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) – modern diagnostic approaches* w dniach 20-21.10.2014 w Krakowie. W trakcie konferencji odbyły się wykłady międzynarodowych specjalistów z dziedziny PCD oraz unikalne praktyczne warsztaty szkoleniowe dla lekarzy dotyczące najważniejszych i najbardziej aktualnych metod diagnostyki PCD. W konferencji i warsztatach uczestniczyło 65 osób z Europy i USA, w tym 35 lekarzy z Polski.

Ostatnią konferencją, którą współorganizowałam jako tzw. „local host”, była międzynarodowa konferencja naukowo-szkoleniowa *„4th BEAT-PCD Conference and 5th PCD Training School”*, która odbyła się w Poznaniu w dniach 22-26.03.2019. Konferencja ta podsumowywała 4 lata działalności projektu BEAT-PCD; równolegle do konferencji, została także zorganizowana szkoła treningowa na temat PCD (*5th PCD Training School*) skierowana do naukowców i lekarzy na wczesnych szczeblach kariery naukowej. W konferencji uczestniczyli światowej sławy eksperci w zakresie diagnostyki i leczenia PCD, była to także pierwsza na taką skalę okazja do zaprezentowania wyników badań polskich naukowców w tej dziedzinie. W konferencji uczestniczyło 146 osób z 27 krajów świata, w tym 123 gości z zagranicy, także spoza Europy (Australia, Arabia Saudyjska, Japonia, Palestyna, Stany Zjednoczone, Turcja, Południowa Afryka). Było to pierwsze, tak duże, odbywające się w Polsce, wydarzenie dotyczące PCD. O randze tego wydarzenia mogą świadczyć uzyskane honorowe patronaty Prezesa Polskiej Akademii Nauk, Marszałka Województwa Wielkopolskiego oraz Prezydenta Miasta Poznania.

OSIĄGNIĘCIA W ZAKRESIE POPULARYZACJI NAUKI

W trakcie stażu podoktorskiego, przede wszystkim w ramach projektu BESTCILIA, miałam możliwość popularyzowania wiedzy o PCD - zarówno wśród specjalistów, pacjentów PCD jak i szerokiej publiczności.

Moje działania szerzące wiedzę o PCD wśród specjalistów polegały m.in. na organizacji międzynarodowej konferencji naukowo-szkoleniowej w Krakowie (szczegóły powyżej, w podpunkcie *Osiągnięcia organizacyjne*), a także na szerzeniu wśród lekarzy z Poznania informacji na temat możliwości zastosowania efektów programu BESTCILIA w diagnostyce PCD. W ramach tych obowiązków, w czerwcu 2014 roku przeprowadziłam m.in. wykład szkoleniowy *Efekty programu BESTCILIA: standardowe procedury operacyjne w diagnostyce PCD* dla lekarzy różnych specjalności (pneumolodzy, alergolodzy, laryngolodzy) z poznańskich szpitali.

Ponadto, w ramach pakietu roboczego 7 (WP7) projektu BESTCILIA, koordynowałam także przygotowanie (tłumaczenie i dostosowanie do wymagań kulturowych) materiałów informacyjnych dla pacjentów na temat PCD. Broszura została przetłumaczona na 6 języków i zaadaptowana do realiów 9 różnych krajów europejskich (Niemcy, Austria, Szwajcaria, Wielka Brytania, Holandia, Belgia, Grecja, Cypr, Dania, Polska) (<http://bestcilia.eu/what-is-pcd/>). Miałam również okazję być współautorem polskiej wersji tej broszury, pierwszej tego typu publikacji w kraju; broszura ta została umieszczona na stronie stowarzyszenia polskich pacjentów z PCD (Polskie Towarzystwo Dyskinezy Rzęsek, <http://ptdr.org.pl/wp-content/uploads/Broszura-PCD.pdf>).

Ponadto, w ramach projektu BESTCILIA, miałam również okazję promować tematykę PCD i projektu BESTCILIA wśród szerokiej publiczności, uczestnicząc w przygotowaniu w sumie 75 doniesień na temat osiągnięć projektu, organizowanych warsztatów i konferencji czy publikacji projektu dotyczących PCD. Doniesienia te były następnie publikowane na stronie projektu

(<http://bestcilia.eu/news/index.html>) lub przez krajowe i światowe portale prasowe (*AlphaGalileo, EurekAlert, Medical News Today* itp.).

Moje doświadczenia w popularyzacji nauki wykorzystuję obecnie w trakcie zajęć dla szerokiej publiczności organizowanych przez Stowarzyszenie Popularyzacji Nauki *Gen-i-już* przy Instytucie Genetyki Człowieka PAN, którego jestem członkiem od 2017 roku. W ramach Stowarzyszenia współorganizowałam m.in. zajęcia w ramach Nocy Biologów, Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki czy Nocy Naukowców. Prowadziłam także warsztaty dla seniorów z wnuczkami finansowane ze środków Urzędu Miasta Poznania.

VII. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ KANDYDATA

W trakcie studiów doktorskich uzyskałam stypendium Studium Medycyny Molekularnej w Warszawie i uczestniczyłam w organizowanych przez SMM szkoleniach. Jestem laureatem czterech grantów podróży z projektów unijnych typu COST, a także zostałam wybrana przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej na uczestnika trzech szkoleń z umiejętności miękkich, finansowanych z projektu europejskiego SKILLS. W trakcie swojej kariery zawodowej, uczestniczyłam także w kilku europejskich projektach dotyczących PCD.

W ramach europejskiego projektu HEALTH-PROT finansowanego z 5 Funduszu Ramowego EU dwukrotnie przebywałam na dwóch stażach zagranicznych w laboratorium prof. Heymута Omrana w Klinik für Kinder- und Jugendmedizin - Allgemeine Pädiatrie, Universität Münster, Münster, Niemcy (odpowiednio 6 i 3 miesiące). Wyjazdy te zaowocowały wprowadzeniem do Zakładu nowych technik diagnostyki PCD, miałam także okazję wykazać się organizacyjnie oraz szerzyć wiedzę na temat PCD wśród personelu medycznego i pacjentów z PCD (więcej w podpunkcie VI autoreferatu, część *Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki*).

Kolejnym projektem europejskim, w który byłam zaangażowana w trakcie stażu podoktorskiego, był projekt BESTCILIA (*Better Experimental Screening and Treatment for Primary Ciliary Dyskinesia*, nr 305404), finansowany z 7. Programu Ramowego UE. Głównym celem tego międzynarodowego projektu było podniesienie jakości diagnostyki i leczenia pacjentów PCD w Europie. Realizacja tego celu odbywała się m.in. poprzez ustanowienie międzynarodowego rejestru pacjentów PCD czy porównanie informacji epidemiologicznych na temat fenotypu klinicznego PCD i przebiegu choroby w różnych krajach Europy. Z punktu widzenia Polski, najważniejszym elementem tego projektu było wprowadzenie znormalizowanych metod diagnostyki PCD w trzech krajach europejskich, w których nie były one w tamtym czasie dostępne (w Grecji, Polsce i na Cyprze). W związku z tym, niezbędnym elementem była także popularyzacja wiedzy na temat PCD, dostępnych badań diagnostycznych tej choroby oraz właściwego sposobu ich przeprowadzania. Te elementy popularyzacyjne należały do pakietu roboczego 7, którego byłam głównym wykonawcą (szczegóły w podpunkcie VI. *Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę*).

Ostatnim projektem europejskim, w którego realizacji uczestniczyłam, był projekt BEAT-PCD (*Translational research in primary ciliary dyskinesia - bench, bedside, and population perspectives*, BEAT-PCD, projekt COST BM1407, finansowany z funduszy Horyzont 2020). Ten europejski projekt typu COST zrzeszał specjalistów z różnych dziedzin (naukowców, lekarzy, pracowników służby zdrowia) oraz przedstawicieli pacjentów, celem opracowania nowych metod diagnostyki oraz leczenia PCD, a także podniesienia wiedzy na temat tej choroby. Uczestnicy projektu pochodzili z 22 państw europejskich (w tym m.in. Wielka Brytania, Szwecja, Niemcy, Holandia,

Polska, Francja, Portugalia, Hiszpania, Czechy), a także z kilku krajów spoza Europy (USA, Palestyna, Izrael), a spotkania uczestników odbywały się w Paryżu, Lizbonie, Walencji, Southampton i Poznaniu. Dzięki wspólnemu działaniu ośrodków PCD z różnych krajów świata, możliwe było porównywanie obserwacji na temat przebiegu klinicznego PCD, czy też opracowywanie wspólnych opinii eksperckich (*consensus statements*) na temat diagnostyki i leczenia tej choroby.

Oprócz aktywnego udziału w konferencjach projektu (plakaty, prezentacje) oraz w szkołach treningowych, uczestniczyłam także w grupie ekspertów tworzących *consensus statement* w zakresie raportowania wyników TEM rzęsek (publikacja Shoemark et al., 2020 z załącznika IV, cz.II, ppkt. 4). Dwa lata z rzędu byłam także członkiem zespołu tworzącego recenzowane sprawozdania z konferencji (*proceedings*, publikacje Halbeisen et al., 2018 oraz Farley et al., 2018 z załącznika IV, cz.II, ppkt. 4). Byłam także organizatorem lokalnym (*local host*) końcowej konferencji projektu odbywającej się w 2019 roku w Poznaniu (szczegóły w podpunkcie VI). Otrzymałam także stypendium BEAT-PCD *Short Term Scientific Mission*, w ramach którego w lutym 2019 wyjechałam na krótki wyjazd szkoleniowy w zakresie proteomiki rzęsek do laboratorium prof. Mariusa Ueffinga w Tybindze (Niemcy). Nawiązana przeze mnie współpraca do tej pory jest kontynuowana, a prof. Marius Ueffing i jego zespół są współpracownikami wniosków grantowych OPUS dotyczących OFD1 składanych przeze mnie do NCN.

Poza współpracami związanymi z udziałem w projektach europejskich, w trakcie stażu podoktorskiego nawiązałam także zagraniczne współprace naukowe w ramach realizowanych krajowych projektów badawczych. Współpraca z prof. J. Atkinsem z University of Utah (USA) umożliwiła realizację grantu OPUS pt. *Analiza wpływu wybranych związków chemicznych na translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek* (NCN, 2011/01/B/NZ4/04840, 2011-2014, PI prof. E. Ziętkiewicz), którego byłam głównym wykonawcą. Ponadto, nawiązałam także współpracę z dr. Tomem Changiem z Utah State University w USA, dzięki czemu było możliwe skorzystanie z możliwości przetestowania stworzonego przez niego nowatorskiego związku TC007 stymulującego TC-RT, w odniesieniu do mutacji genów związanych z patogenezą PCD. Badania tego związku były elementem realizowanego w naszym Zakładzie grantu Preludium, którego kierownikiem był dr Maciej Dąbrowski; zaowocowały one publikacją oryginalną w *International Journal of Molecular Sciences*.

Oprócz współprac zagranicznych, w ramach diagnostyki PCD polskich pacjentów, współpracuję także z lekarzami z krajowych ośrodków pediatrycznych, np. Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Oddział Terenowy w Rabce-Zdrój, Katedrą Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego czy Szpitalem Klinicznym im. Karola Jonschera w Poznaniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Mitchison HM and Valente EM (2017) Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol* 241:294–309
2. Budny B, Chen W, Omran H, et al (2006) A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral–facial–digital type I syndrome. *Hum Genet* 120:171–178
3. Fliegauf M, Benzing T, and Omran H (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8

4. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, et al (2017) European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 49
5. Zietkiewicz E, **Bukowy-Bieryłło Z**, Rabiasz A, et al (2019) CFAP300: Mutations in Slavic Patients with Primary Ciliary Dyskinesia and a Role in Ciliary Dynein Arms Trafficking. *Am J Respir Cell Mol Biol* 61:440–449
6. Kartagener A and Horlacher A (1936) Situs viscerum inversus und Polyposis nasi in einem Falle familiaerer Bronchiektasien. *Beitr Klin Tuberk* 87:331–333
7. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al (2009) Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol* 34:1264–1276
8. Schwabe GC, Hoffmann K, Loges NT, et al (2008) Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum Mutat* 29:289–298
9. Olbrich H, Schmidts M, Werner C, et al (2012) Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet* 91:672–684
10. Jorissen M and Willems T (2004) The secondary nature of ciliary (dis)orientation in secondary and primary ciliary dyskinesia. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 124:527–531
11. Jackson CL, Behan L, Collins SA, et al (2016) Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 47:837–848
12. Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, et al (2014) Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child* 99:850–856
13. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, et al (1975) Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 66:225–232
14. Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, et al (1999) Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 65:1508–1519
15. Hornef N, Olbrich H, Horvath J, et al (2006) DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med* 174:120–126
16. Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, et al (2008) Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456:611–616
17. Duriez B, Duquesnoy P, Escudier E, et al (2007) A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci* 104:3336–3341
18. Moore A, Escudier E, Roger G, et al (2006) RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 43:326–333
19. Castleman VH, Romio L, Chodhari R, et al (2009) Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am J Hum Genet* 84:197–209
20. Zariwala MA, Knowles MR, and Leigh MW (1993) Primary Ciliary Dyskinesia, In: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., et al (eds.) *GeneReviews®*, University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
21. Tu C, Nie H, Meng L, et al (2020) Novel mutations in SPEF2 causing different defects between flagella and cilia bridge: the phenotypic link between MMAF and PCD. *Hum Genet* 139:257–271
22. Chivukula RR, Montoro DT, Leung HM, et al (2020) A human ciliopathy reveals essential functions for NEK10 in airway mucociliary clearance. *Nat Med* 26:244–251
23. Thomas L, Bouhouche K, Whitfield M, et al (2020) TTC12 Loss-of-Function Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Unveil Distinct Dynein Assembly Mechanisms in Motile Cilia Versus Flagella. *Am J Hum Genet* 106:153–169
24. Cho EH, Huh HJ, Jeong I, et al (2020) A nonsense variant in NME5 causes human primary ciliary dyskinesia with radial spoke defects. *Clin Genet*
25. Kurkowiak M, Zietkiewicz E, and Witt M (2015) Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *J Med Genet* 52:1–9

26. Horani A, Ferkol TW, Dutcher SK, et al (2016) Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr Respir Rev* 18:18–24
27. Dabrowski M, **Bukowy-Bieryłło Z**, and Zietkiewicz E (2015) Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes - The impact of RNA sequence. *RNA Biol* 12:950–958
28. Nilsson M and Rydén-Aulin M (2003) Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free Escherichia coli strain. *Biochim Biophys Acta* 1627:1–6
29. Feng YX, Copeland TD, Oroszlan S, et al (1990) Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8860–8863
30. Kwong A, Cogan J, Hou Y, et al (2020) Gentamicin Induces Laminin 332 and Improves Wound Healing in Junctional Epidermolysis Bullosa Patients with Nonsense Mutations. *Mol Ther* 28:1327–1338
31. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, et al (2002) Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:619–627
32. Koenekoop RK, Loyer M, Hand CK, et al (2003) Novel RPGR mutations with distinct retinitis pigmentosa phenotypes in French-Canadian families. *Am J Ophthalmol* 136:678–687
33. Dorp DB van, Wright AF, Carothers AD, et al (1992) A family with RP3 type of X-linked retinitis pigmentosa: an association with ciliary abnormalities. *Hum Genet* 88:331–334
34. Zhang Q, Giacalone JC, Searby C, et al (2019) Disruption of RPGR protein interaction network is the common feature of RPGR missense variations that cause XLRP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:1353–1360
35. Coene KLM, Roepman R, Doherty D, et al (2009) OFD1 is mutated in X-linked Joubert syndrome and interacts with LCA5-encoded lebercilin. *Am J Hum Genet* 85:465–481
36. Bengueddach H, Lemullois M, Aubusson-Fleury A, et al (2017) Basal body positioning and anchoring in the multiciliated cell Paramecium tetraurelia: roles of OFD1 and VFL3. *Cilia* 6:6
37. Franco B and Thauvin-Robinet C (2016) Update on oral-facial-digital syndromes (OFDS). *Cilia* 5:12
38. Parisi MA (2009) Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:326–340
39. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, et al (2016) PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 47:1103–1112
40. Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, et al (2010) Odf1, a Human Disease Gene, Regulates the Length and Distal Structure of Centrioles. *Dev Cell* 18:410–424
41. Pezzulo AA, Starnes TD, Scheetz TE, et al (2011) The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 300:L25–L31
42. Walentek P, Quigley IK, Sun DI, et al (2016) Ciliary transcription factors and miRNAs precisely regulate Cp110 levels required for ciliary adhesions and ciliogenesis. *eLife* 5:e17557
43. Jackson ND, Everman JL, Chioccioli M, et al (2020) Single-Cell and Population Transcriptomics Reveal Pan-epithelial Remodeling in Type 2-High Asthma. *Cell Rep* 32:107872
44. Chen Q, Tan KS, Liu J, et al (2020) Host Antiviral Response Suppresses Ciliogenesis and Motile Ciliary Functions in the Nasal Epithelium. *Front Cell Dev Biol* 8:581340
45. Lee, DDH, Cardinale D, Nigro E, et al High-content screening for rare respiratory diseases: readthrough therapy in primary ciliary dyskinesia.
46. Fassad MR, Shoemark A, Borgne P le, et al (2018) C11orf70 Mutations Disrupting the Intraflagellar Transport-Dependent Assembly of Multiple Axonemal Dyneins Cause Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Hum Genet* 102:956–972
47. Hiemstra PS, Grootaers G, Does AM van der, et al (2018) Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol In Vitro* 47:137–146
48. Butler CR, Hynds RE, Gowers KHC, et al (2016) Rapid Expansion of Human Epithelial Stem Cells Suitable for Airway Tissue Engineering. *Am J Respir Crit Care Med* 194:156–168

ZBukowy-Bieryłło