

# **AUTOREFERAT**

Załącznik nr 2

dr n. med. Magdalena Żurawek

Instytut Genetyki Człowieka  
Polskiej Akademii Nauk

Poznań 2018

## **I. Dane wnioskodawcy**

Magdalena Żurawek

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

## **II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

Tytuł **magistra biotechnologii**

Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, w roku 2001

Tytuł pracy magisterskiej:

„Charakterystyka molekularna podjednostki trzeciej oksydazy cytochromowej u wątrobowców z rodzaju *Pellia*”

Promotor: prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska

Stopień **doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna**

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, w roku 2007

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Mutacje i polimorfizmy w genie *GCK* i *HNF1α* u kobiet z cukrzycą ciężarnych”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Danuta Januszkiewicz-Lewandowska

Rozprawa doktorska wyróżniona przez Radę Naukową IGC PAN

## **III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

2000-2001    Onkologiczna Poradnia Genetyczna, Ośrodek Profilaktyki i Epidemiologii

Nowotworów, Poznań

stanowisko: asystent

2002-2007    Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

stanowisko: biolog

2008-2017    Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

stanowisko: adiunkt

2017-obecnie Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

stanowisko: asystent

W latach 2013-2014 przebywałam na stażu podoktorskim w La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, USA

#### **IV. Dorobek naukowy**

Jestem autorką 32 prac naukowych w skład których wchodzi:

- **29** prac oryginalnych, z czego 27 artykułów posiada Impact Factor
- **2** prace poglądowe (nie posiadające Impact Factor)
- **1** rozdział w podręczniku

Dane bibliometryczne (z dnia 19.09.2018):

- sumaryczny Impact Factor (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji): **68,472**
- indeks Hirscha (wg Web of Science): **8**
- liczba cytowań (wg Web of Science): **230 (214 bez autocytowań)**

W swoim dorobku naukowym posiadam 9 prac, których jestem pierwszą autorką, a drugą - w kolejnych 11. Ponadto jestem autorką 13 komunikatów naukowych z konferencji krajowych i zagranicznych. W trakcie swojej pracy naukowej uczestniczyłam lub jestem zaangażowana w realizację 11 projektów badawczych (w tym 3 jako kierownik). Szczegółowy opis wszystkich osiągnięć naukowych znajduje się w załączniku nr 4 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

**V. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**„Czynniki genetyczne i epigenetyczne związane z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w cukrzycy typu 1 i autoimmunologicznej chorobie Addisona (pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy)”.**

Osiągnięcie naukowe, które przedkładałam ubiegając się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna składa się z sześciu oryginalnych artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach w latach 2010-2018. Łączna wartość ich współczynnika Impact Factor (IF) wynosi **17,590** (157 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW).

**1. Żurawek M**, Fichna M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczyńska M, Fichna P, Nowak J. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. Hum Immunol. 2010;71(5):530-4.

**IF 2,872 MNiSW 27**

**2. Żurawek M**, Fichna M, Fichna P, Januszkiewicz D, Nowak J. No evidence for association of the polymorphisms in NLRP1 gene with type 1 diabetes in Poland. Diabetes Res Clin Pract. 2011;92(3):e49-51.

**IF 2,754 MNiSW 20**

**3. Żurawek M**, Fichna M, Januszkiewicz D, Fichna P, Nowak J. Polymorphisms in the interferon-induced helicase (IFIH1) locus and susceptibility to Addison's disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2013;78(2):191-6.

**IF 3,353 MNiSW 30**

**4. Żurawek M**, Fichna M, Fichna P, Skowronska B, Dzikiewicz-Krawczyk A, Januszkiewicz D, Nowak J. Cumulative effect of IFIH1 variants and increased gene expression associated with type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2015;107(2):259-66.

**IF 3,045 MNiSW 25**

**5. Żurawek M**, Fichna M, Kazimierska M, Fichna P, Dzikiewicz-Krawczyk A, Przybylski G, Ruchala M, Nowak J. MAVS is not a Likely Susceptibility Locus for Addison's Disease and Type 1 Diabetes. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2017;65(3):271-274.

**IF 3,018 MNiSW 25**

**6. Żurawek M,** Dzikiewicz-Krawczyk A, Iżykowska K, Ziółkowska-Suchanek I, Skowronska B, Czaińska M, Podralska M, Fichna P, Przybylski G, Fichna M, Nowak J. miR-487a-3p upregulated in type 1 diabetes targets *CTLA4* and *FOXO3*. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 142:146-153.

**IF 2,548 MNiSW 30**

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

Przedmiotem moich zainteresowań są czynniki genetyczne i epigenetyczne związane z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną, analizowane w kontekście patogenezy cukrzycy typu 1 oraz pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy (choroba Addisona, AD).

Cukrzyca typu 1 (ang. *Type 1 Diabetes*, T1D) i pierwotna niedoczynność kory nadnerczy, zwana również chorobą Addisona (ang. *Addison's disease*, AD), to schorzenia endokrynologiczne, charakteryzujące się trwałym uzależnieniem chorego od egzogennej substytucji hormonalnej. Jej niedobór lub niewystarczające dawki, w sytuacji stresu, wysiłku fizycznego, urazu mogą prowadzić do ostrych zaburzeń metabolicznych oraz bezpośredniego zagrożenia życia.

T1D rozwija się w wyniku autoagresji, nacieku limfocytów na wyspy trzustkowe, czego konsekwencją jest całkowite zniszczenie komórek beta trzustki i postępujący niedobór insuliny [1]. Wdrożenie insulinoterapii nie zawsze skutecznie chroni pacjenta przed pojawieniem się powikłań makro- i mikroangiopatycznych, które mogą prowadzić do stanów klinicznych takich, jak: udar mózgu, zawał serca, niewydolność nerek, czy utrata wzorku. Odległe w czasie powikłania T1D są jedną z głównych przyczyn zgonów, stanowią problem cywilizacyjny oraz obciążają budżet [2]. Choroba Addisona w ponad 90% przypadków rozwija się w wyniku autoimmunologicznego zniszczenia kory nadnerczy przez autoreaktywne komórki jednojądrzaste [3]. Pacjenci wymagają regularnej substytucji glikokortykosteroidami i mineralokortykosteroidami, co nie zawsze doskonale odpowiada aktualnemu zapotrzebowaniu ustroju i w dalszej perspektywie wiąże się z krótszą przewidywalną długością życia i obniżeniem jego

jakości [4]. Notowany w różnych populacjach, systematyczny wzrost zapadalności na T1D i AD, wymaga lepszego poznania patogenezы tych chorób autoimmunizacyjnych dla wskazania czynników ryzyka i typowania grup zagrożonych rozwojem autoagresji [5].

O rozwoju cukrzycы typu 1 decyduje interakcja czynników środowiskowych i genetycznych, kontrolujących immunotolerancję [6]. Najsilniejszą znaną asocjacją z T1D pozostają haplotypy głównego układu zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) DR3-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DR3), DR4-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DR4) i DQB1\*0302 (DQ8) [7]. Obecność układu DR3/DR4-DQ8 związana jest 30-50% ryzykiem rozwoju T1D [8]. Badania asocjacyjne wskazały również silny związek genów, takich jak *INS*, *PTPN22*, *CTLA4*, z rozwojem cukrzycы typu 1, z których większość zaangażowana jest w odpowiedź immunologiczną [9-12]. Wśród czynników środowiskowych, związanych z wystąpieniem choroby, wskazuje się infekcje wirusowe (głównie enetrowirusowe), o czym może świadczyć m. in. fakt sezonowości zachorowań w krajach o klimacie umiarkowanym oraz wysoki stopień zachorowalności na T1D u bliźnięt jednojajowych posiadających przeciwciała przeciwko wirusom oraz wykrywalne wirusowe RNA w surowicy [13]. Stąd zainteresowanie badaczy rolą nieswoistej odpowiedzi immunologicznej w rozwoju T1D.

Mechanizmy związane z patogenezą autoimmunizacyjnej choroby Addisona pozostają w dużej mierze nieznane. Uważa się, iż interakcja czynników genetycznych i niezdefiniowanych czynników środowiskowych prowadzi do rozwoju AD. Ze względu na niską częstość występowania AD (60-140/milion) prowadzenie badań asocjacyjnych typu GWAS (ang. *Genome-Wide Association Study*), opartych o analizy dużych grup chorych jest trudne [14]. Dotychczas jako istotny genetyczny czynnik ryzyka wskazano haplotypy głównego układu MHC DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (DR3/DQ2) oraz DRB1\*0404-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (DR4.4/DQ8) [15]. Wykazano również silną asocjację wariantów genów odpowiedzi immunologicznej *CTLA4*, *PTPN22* oraz genu metabolizmu witaminy D3- *CYP27B1* z rozwojem AD [16-20]. W przeciwieństwie do cukrzycы typu 1, niewiele jest badań dotyczących roli wirusów jako czynników spustowych rozwoju choroby Addisona. Wykazano, iż terapia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby interferonem alfa, może prowadzić do pojawienia się specyficznych dla AD przeciwciał przeciw 21-hydroksylazie (21-OH), enzymowi biorącemu udział w sterydogenezie nadnerczowej [21]. Dodatkowo zaobserwowano, iż interferon I i III,

uwalniane podczas infekcji wirusowych, działają cytotoksycznie na komórki kory nadnerczy, nasilają wydzielanie prozapalnych cytokin i ekspresję cząsteczek MHC klasy I oraz 21-OH [22].

Podsumowując, w odniesieniu do cukrzycy typu 1 i autoimmunologicznej choroby Addisona, istotne znaczenie ma wskazanie czynników ryzyka, co w przyszłości mogłoby się przyczynić do monitorowania osób zagrożonych rozwojem autoimmunizacji, wykrycia schorzenia w fazie bezobjawowej i wprowadzenia środków zapobiegawczych. Ponadto, ocena funkcjonalna czynników ryzyka przyczyni się do lepszego zrozumienia etiopatogenezy chorób autoimmunologicznych oraz opracowania celowanych terapii.

Główne cele podjętych badań:

- Analiza asocjacyjna wariantów polimorficznych genów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej dla oceny ryzyka rozwoju T1D i AD
- Ocena korelacji ekspresji genu *IFIH1* szlaku sygnałowego interferonu typu I z rozwojem autoimmunizacji
- Globalna analiza ekspresji krótkich niekodujących RNA (miRNA) dla identyfikacji biomarkerów T1D oraz ocena funkcjonalna dysregulowanych miRNA w aspekcie nieswoistej odpowiedzi immunologicznej.

Powyższe problemy badawcze zostały podjęte przeze mnie w serii sześciu oryginalnych prac, które zgłaszam łącznie jako osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Jednym z istotnych genów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest *NLRP1* (ang. *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1*), który koduje cytoplazmatyczny receptor odpowiedzialny za rozpoznawanie liposacharydów ścian komórkowych bakterii. Białko NLRP1 poprzez interakcję z kaspazą 1 i 5, tworzy prozapalny kompleks białkowy (ang. *inflammasome*) i aktywuje wydzielanie cytokin: IL1 $\beta$ , IL18 oraz IL33 [23]. Wysoka ekspresję genu *NLRP1* w limfocytach T oraz komórkach Langerhansa, dodatkowo sugeruje jego udział w reakcji immunologicznej [24]. Badania asocjacyjne przeprowadzone w grupie pacjentów z bielactwem, wykazały silny związek wariantów polimorficznych genu *NLRP1* z rozwojem autoimmunizacji [25].

Ze względu na ówczesny brak innych doniesień wskazujących *NLRP1* jako czynnik ryzyka chorób autoimmunologicznych, zainteresowaliśmy się tą tematyką. Celem projektu była ocena związku wariantów polimorficznych genu *NLRP1* z rozwojem pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy. Obserwacje z tego badania zawarliśmy w artykule zatytułowanym „**A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease.**”, który został opublikowany w **Human Immunology 2010;71(5):530-4**. Przeprowadziliśmy genotypowanie sześciu SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) rs6502867, rs12150220, rs2670660, rs878329, rs8182352 i rs4790797, zlokalizowanych w sekwencji promotorowej, eksonie 3 oraz regionie 3' genu *NLRP1*. Badaniem objęto grupę 101 chorych z AD oraz 254 zdrowych dawców. Przeprowadzona analiza wykazała istotną asocjację niesynonimicznej substytucji L155H (rs12150220 T/A) z występowaniem choroby Addisona. Następnie zweryfikowaliśmy, czy polimorfizm L155H jest związany z rozwojem izolowanej postaci AD lub reprezentującej autoimmunologiczny zespół wieloguczołowy (ang. *Autoimmune Polyglandular Syndrome*, APS), który rozwinęło 79% badanych pacjentów (APS typu 2 i 4). Allel ryzyka (A) wariantu rs12150220 obserwowany był znamienne statystycznie częściej u chorych z APS w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast nie obserwowaliśmy istotnych różnic w częstości alleli rs12150220 u chorych z izolowaną postacią choroby Addisona. Zatem, wyniki naszych badań wskazują gen *NLRP1* jako czynnik ryzyka autoagresji wielonarządowej, co pozostaje w zgodzie z obserwacją w populacji chorych z bielactwem [25]. W przypadku pozostałych analizowanych SNP nie obserwowaliśmy różnic znamienych statystycznie w częstości alleli i genotypów pomiędzy grupą chorych i zdrowych dawców. Dodatkowo przeprowadziliśmy analizę tła haplotypowego polimorfizmów *NLRP1*. Haplotyp posiadający allel ryzyka rs12150220 obserwowany był częściej w grupie pacjentów z AD w porównaniu ze zdrowymi dawcami (11% vs. 1,7%).

Krótko przed zakończeniem realizacji projektu ukazała się praca, wskazująca L155H jako czynnik ryzyka rozwoju choroby Addisona i cukrzycy typu 1 w populacji norweskiej [26]. Interesujące, Magitta i wsp. zaobserwowali asocjację allelu T z występowaniem autoimmunizacji. Natomiast wyniki naszych badań oraz Jin i wsp. wskazały allel A rs12150220 jako czynnik ryzyka. Dodatkowo, porównanie populacji polskich i norweskich pacjentów z AD wykazało różnice znamienne statystycznie w rozkładzie



genotypów wariantu rs12150220. Nie obserwowaliśmy różnic pomiędzy grupami kontrolnymi. To opisywane w literaturze zjawisko odwróconej asocjacji obserwowane w jednorodnych etnicznie populacjach, można wytłumaczyć tzw. fenomenem „flip-flop” [27]. Uważa się, iż różne zmiany molekularne mogą wiązać się z tym samym fenotypem, co jest konsekwencją interakcji genów i sieci wzajemnych oddziaływań. Podsumowując, wyniki naszych badań wykazały silny związek wariantu L155H z rozwojem AD i jednocześnie miały istotny wkład dla wskazania polimorfizmu genu *NLRP1* jako czynnika ryzyka autoimmunizacji, o czym może świadczyć liczba cytowań naszej pracy (ponad 50, wg Web of Science) w publikacjach dotyczących etiopatogenezy innych schorzeń autoimmunologicznych.

Badania asocjacyjne w grupie norweskich pacjentów z cukrzycą typu 1 skłoniły nas do przeprowadzenia podobnej analizy u polskich chorych z T1D. Określiliśmy częstość występowania sześciu wariantów polimorficznych genu *NLRP1* (rs6502867, rs12150220, rs2670660, rs878329, rs8182352, rs4790797) w grupie 221 pediatrycznych pacjentów z cukrzycą typu 1 i 254 zdrowych dawców. Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy pt. **„No evidence for association of the polymorphisms in NLRP1 gene with type 1 diabetes in Poland”** opublikowanej w **Diabetes Research and Clinical Practice 2011;92(3):e49-51**. Nie zaobserwowaliśmy różnic znamienych statystycznie w rozkładzie alleli i genotypów badanych polimorfizmów pomiędzy grupą chorych i zdrowych dawców. Również analiza tła haplotypowego wariantów polimorficznych nie wykazała asocjacji haplotypów wariantów genu *NLRP1* z występowaniem T1D. Jedynie haplotyp zawierający rzadsze allele (ang. *minor allele*) SNP rs12150220, rs878329 i rs8182352 obserwowany był u 2,5% chorych z T1D, a nie występował w grupie kontrolnej. Wyniki naszych badań wskazują, iż *NLRP1* nie jest genem ryzyka rozwoju T1D. Skłaniamy się w stronę hipotezy, iż warianty *NLRP1* związane są z autoimmunologiczną wielonarządową endokrynopatią.

Wiadomo, iż rozwój chorób autoimmunologicznych jest wynikiem złożonych interakcji czynników genetycznych i środowiskowych. Niepodważalna jest rola enterowirusów (wirusy Coxsackie A i B, ECHO wirusy) jako elementów spustowych cukrzycy typu 1, co może być związane ze zjawiskiem mimikry molekularnej, zakażeniami utajonymi lub odpowiedzią immunologiczną poprzez tzw. „efekt widza” (ang. *bystander effect*)[28]. Przypuszcza się, iż aktywacja autoagresji z udziałem wirusów następuje bezpośrednio

poprzez tropizm do komórek beta wysp trzustkowych, które uszkodzone, uwalniają kolejne autoantygeny, lub pośrednio, przez stymulację interferonu typu I (IFN I) [29, 30]. Dwuniciowe RNA, powstające podczas replikacji wirusów z rodziny *Piconaviridae ssRNA(+)* i *Paramyxoviridae ssRNA(-)*, jest rozpoznawane przez cytoplazmatyczną helikazę IFIH1 (ang. *Interferon-Induced with Helicase C domain 1 gene*)[31]. Helikaza IFIH1, określana również jako MDA5 (ang. *Melanoma Differentiation-Associated gene 5*), wchodzi w interakcję z białkiem MAVS i aktywuje czynniki regulatorowe: IRF-3 (czynnik regulatorowy interferonu) i NFκB (jądrowy czynnik kappa B), czego konsekwencją jest indukcja szlaku sygnałowego interferonu typu I. IFN I stymuluje komórki dendrytyczne i limfocyty NK (ang. *Natural Killer*), a te pobudzają funkcje efektorowe komórek T i B [32]. Uważa się, iż niewłaściwa aktywacja IFIH1 sprzyja rozwojowi środowiska zapalnego i prowadzi pośrednio do autoagresji. Badania asocjacyjne w skali genomu GWAS, wskazały locus IFIH1, jako związany z ryzykiem rozwoju chorób autoimmunologicznych [33-35] Polimorfizm rs1990760 (A946T) okazał się być najsilniej zasocjowany z cukrzycą typu 1 [36, 37]. Natomiast jego związek z rozwojem reumatoidalnego zapalenia stawów, autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, stwardnienia rozsianego i choroby Addisona, nie jest jednoznaczny [38-41]. Zatem ocena wariantów polimorficznych genu *IFIH1* w kontekście rozwoju choroby Addisona wydała się być interesującym problemem badawczym. W tym celu przeprowadziliśmy genotypowanie czterech SNP (rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767), w grupie 120 pacjentów z AD oraz u 689 zdrowych dawców. Uzyskane wyniki zostały zebrane w pracy pt. **“Polymorphisms in the interferon-induced helicase (IFIH1) locus and susceptibility to Addison's disease.”**, opublikowanej w **Clinical Endocrinology (Oxf).** **2013;78(2):191-6**. Genotypowanie SNP zostało przeprowadzone z wykorzystaniem sond molekularnych typu TaqMan. Polimorfizmy rs3747517 (His843Arg) i rs1990760 (Ala946Thr) zlokalizowane są, odpowiednio, w eksonie 13 i 15 genu *IFIH1*. Natomiast rs2111485 i rs13422767 znajdują się regionie pomiędzy genem *IFIH1* a *FAP* (ang. *Fibroblast Activation Protein alpha*). Wykazaliśmy asocjację wariantów polimorficznych rs1990760 i rs13422767 z występowaniem choroby AD. Częstszy genotyp (ang. *major genotype*) wariantu rs1990760 obserwowany był u 50% chorych z AD, a dla porównania u 41% zdrowych dawców ( $P=0,03$ ). W przypadku SNP rs13422767 allel G występował znamienne statystycznie częściej w grupie chorych z AD ( $P=0,04$ ). Dodatkowo

oceniliśmy częstość występowania alleli i genotypów w grupie pacjentów z pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy, reprezentującą autoimmunologiczny zespół wielogruzołowy. Pacjenci z APS (typ 2 i 4) stanowili 82% badanej grupy. Wykazaliśmy asocjację wariantu rs1990760, rs13422767 oraz rs3747517 z rozwojem autoimmunologicznego zespołu wielogruzołowego ( $P < 0,05$ ). Ze względu na graniczne wartości poziomu istotności statystycznej oraz moc statystyczną przeprowadzonych testów, wynoszącą 60%, postanowiliśmy zestawić wyniki obecnego badania z dotychczas opublikowanymi [40, 41]. Przeprowadziliśmy meta-analizę rozkładu genotypów i częstości alleli polimorfizmu rs1990760, w grupie polskiej, brytyjskiej i niemieckiej, zawierającej łącznie 519 chorych z AD oraz 1362 zdrowych dawców, pochodzenia kaukaskiego. Ocena heterogenności genetycznej analizowanych grup nie wykazała różnic znamiennych statystycznie ( $P > 0,05$ ), co pozwoliło na dalsze zestawienie danych. Analiza ilorazu szans (ang. *odds ratio*, *OR*), przeprowadzona metodą Mantela-Haenszela, pokazała wartość 1,05 dla allelu A i 1,08 dla genotypu AA ( $P > 0,05$ ). Przeprowadzona meta-analiza nie potwierdziła asocjacji polimorfizmu rs1990760 z chorobą Addisona. Zatem wyniki naszych badań nie wskazują jednoznacznie genu *IFIH1* jako czynnika ryzyka rozwoju pierwotnej niewydolności kory nadnerczy.

Polimorfizmy genu *IFIH1* są interesującym obiektem analiz, również w kontekście genetyki ewolucyjnej. Część alleli ryzyka podlega pozytywnej selekcji, ze względu na charakter „protekcyny” w infekcjach. Uważa się, iż gen *IFIH1* był poddany takiej selekcyjnej presji [42], co zostało opisane na przykładzie SNP rs10930046 (His460Arg). Pierwotnym allelem, obserwowanym najczęściej w populacji afrykańskiej, jest 460Arg. Natomiast w populacji europejskiej i azjatyckiej dominuje allel His460, któremu przypisuje się funkcję ochronną w infekcjach wirusowych klimatu umiarkowanego i zimnego [42].

Zainteresowaliśmy się także wariantami polimorficznymi helikazy MDA5 (*IFIH1*) w cukrzycy typu 1, której patogenezą jest silnie związana z czynnikami wirusowymi. Przeprowadziliśmy genotypowanie rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767, z wykorzystaniem sond typu TaqMan, w grupie 514 pacjentów z T1D i 713 zdrowych dawców. W wyniku naszego badania powstał manuskrypt zatytułowany „**Cumulative effect of IFIH1 variants and increased gene expression associated with type 1 diabetes**”, który opublikowano w czasopiśmie **Diabetes Research and Clinical**

**Practice 2015;107(2):259-66.** Analiza częstości alleli i genotypów wszystkich badanych SNP wykazała różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupą chorych z T1D a zdrowych dawców. Poziom istotności statystycznej został utrzymany po zastosowaniu restrykcyjnej poprawki Bonferroniego, która wykorzystywana jest w analizach wieloczynnikowych ( $P \leq 0,01$ ). Częstsze allele i genotypy (ang. *major alleles/genotypes*) badanych wariantów, okazały się być zasocjowane z T1D. Przeprowadziliśmy również analizę tła haplotypowego, która wykazała różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupą chorych z T1D a kontrolną. Haplotyp zawierający allele ryzyka wariantów rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767 był obserwowany częściej w grupie T1D niż u zdrowych dawców (69% vs. 61%,  $P=0,0029$ ). Jako pierwsi dokonaliśmy oceny ryzyka rozwoju choroby związanego z liczbą alleli ryzyka (ang. *Cumulative Genetic Risk Score*). Iloraz szans (OR) wystąpienia T1D u nosicieli sześciu i więcej alleli ryzyka, wzrastał do 2,39 (formuła nieważona CGRS) i 3,13 (formuła ważona CGRS). Dla porównania w grupie referencyjnej (obecność trzech alleli ryzyka), wartość OR wynosiła  $< 2,00$ . Wyniki naszych badań wskazały efekt addytywny wariantów polimorficznych *IFIH1*, co nie zostało wcześniej opisane.

Badacze sugerują istotną rolę helikazy *IFIH1* w rozwoju autoimmunizacji indukowanej infekcją wirusową. W modelu mysim wyłączenie genu *MDA5* i *TLR3* (ang. *Toll-like receptor*) aktywuje szlak sygnałowy interferonu typu I oraz prowadzi do uszkodzenia komórek  $\beta$  w reakcji immunologicznej na wirus EMCV (ang. *Encephalomyocarditis Virus, EMCV*) [43]. Dodatkowo, Funabiki i wsp. wykazali, iż myszy z mutacją G821S genu *MDA5*, posiadają podwyższony poziom interferonu typu I i spontanicznie rozwijają toczkę, bez udziału czynnika wirusowego [44]. Dlatego postawiliśmy pytanie badawcze, czy pacjenci z cukrzycą typu 1 wykazują zaburzoną ekspresję genu *IFIH1*. W tym celu dokonaliśmy oceny ekspresji genu *IFIH1* w niestymulowanych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) pacjentów z T1D ( $n=90$ ) i zdrowych dawców ( $n=90$ ). Dla zminimalizowania wpływu infekcji na ekspresję genu *IFIH1*, materiał do badań był pobierany od pacjentów nie prezentujących objawów infekcji, co zostało potwierdzone badaniami laboratoryjnymi (morfologia krwi obwodowej, stężenie białka C-reaktywnego). Przeprowadzona analiza wykazała istotnie statystycznie wyższy poziom mRNA (ang. *messenger RNA*) *IFIH1* ( $P=0.04$ ) w grupie chorych z T1D. Dodatkowo porównaliśmy ekspresję *IFIH1* u pacjentów z nowo

zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 i trwająca przynajmniej 6 miesięcy. Nie zaobserwowaliśmy różnic znamiennych statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej. Podobnie, analiza ekspresji *IFIH1* u pacjentów stratyfikowanych pod względem genotypów, nie wykazała korelacji genotypów z poziomem mRNA *IFIH1*. Zaobserwowaliśmy jedynie tendencję wzrostu ekspresji genu *IFIH1* u nosicieli genotypów ryzyka w porównaniu do genotypów „dzikich”, jednak nie były to różnice znamienne statystycznie.

Wyniki naszych badań wskazują warianty genu *IFIH1* jako czynnik ryzyka rozwoju T1D. Dodatkowo, zaburzona ekspresja genu *IFIH1* może upośledzać szlak sygnałowy interferonu typu I w odpowiedzi na czynnik wirusowy i przyczyniać się do autoagresji.

Wirusowe RNA jest rozpoznawane w komórce przez cytoplazmatyczne helikazy: IFIH1 i RIG I (ang. *Retinoic acid-Inducible Gene I*). Następuje aktywacja przezbłonowego białka mitochondrialnego MAVS (ang. *Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*), co prowadzi do syntezy prozapalnych cytokin oraz IFN I. MAVS jest ważnym regulatorem typu postreceptorowym (ang. *downstream*) cytoplazmatycznych ligandów wirusowych IFIH1/RIG-I. Zaburzenia ekspresji lub struktury białka MAVS mogą upośledzać nieswoistą odpowiedź immunologiczną i prowadzić do autoagresji [45]. Analiza niesynonimicznych polimorfizmów genu *MAVS* wykazała asocjację wariantu C79F z występowaniem toczenia układowego rumieniowatego w grupie afro-amerykańskich chorych. Ponadto, badania *ex vivo* i *in vitro* pokazały funkcjonalny charakter zmiany. Wariant C79F będący mutacją typu utraty funkcji (ang. *loss-of-function*), powodował obniżenie ekspresji interferonu typu I oraz innych prozapalnych mediatorów, jak również związany był z brakiem przeciwciał przeciwko białkom wiążącym RNA [46]. Ze względu na brak doniesień dotyczących analizy wariantów genu *MAVS* w kontekście czynników ryzyka rozwoju T1D i choroby AD, zainteresowaliśmy się tą tematyką. Przeprowadziliśmy analizę częstości alleli i genotypów wariantów polimorficznych rs17857295, rs7262903, rs45437096, rs7269320 genu *MAVS*, w oparciu o genotypowanie sondami TaqMan. Badaniem objęto 140 pacjentów z AD, 532 pacjentów z T1D oraz 600 zdrowych dawców. Uzyskane wyniki zostały opisane w artykule pt. **„MAVS is not a Likely Susceptibility Locus for Addison's Disease and Type 1 Diabetes.”**, który opublikowano w czasopiśmie **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**. 2017;65(3):271-274. Wszystkie analizowane

warianty polimorficzne zlokalizowane są w sekwencji kodującej genu *MAVS* i powodują zmianę aminokwasu. Przeprowadziliśmy analizę *in silico* z wykorzystaniem programu bioinformatycznego PROVEAN, dla oceny funkcjonalnego charakteru badanych substytucji niesynonimicznych. Wykazaliśmy, iż warianty rs7262903 (Gln57Lys), rs45437096 (Arg77Cys) i rs7269320 (Ser268Phe) izoformy drugiej białka MAVS mogą mieć charakter patogenny. Analiza częstości alleli i rozkładu genotypów badanych polimorfizmów nie wykazała różnic znamiennych statystycznie pomiędzy grupą chorych z AD i zdrowych dawców. Analogicznie, nie zaobserwowaliśmy różnic znamiennych statystycznie w występowaniu wariantów genu *MAVS* w grupie chorych z T1D. Analiza mocy testu (>65% dla AD i >80% dla T1D), potwierdziła, iż liczebność badanych grup była odpowiednia dla zaobserwowania asocjacji. Zatem wyniki naszych badań jednoznacznie pokazują, iż warianty genu *MAVS* nie są czynnikiem ryzyka rozwoju choroby AD i T1D, co zostało opisane przez nas po raz pierwszy.

Obserwuje się systematyczny wzrost liczby zachorowań na cukrzycę typu 1, przy jednoczesnym niższym udziale genów HLA (ang. *Human Leukocyte Antigen*) [47, 48]. Dlatego sugeruje się udział dodatkowych, epigenetycznych czynników w rozwoju T1D, takich jak : metylacja DNA, modyfikacje histonów i regulacja ekspresji przez niekodujące RNA, w tym microRNA (miRNA) [49, 50]. miRNA to krótkie RNA, które modyfikują ekspresję genów poprzez przyłączanie się do sekwencji 3'UTR matrycowego RNA (mRNA) tych genów. Wynikiem oddziaływania jest degradacja mRNA lub blokowanie procesu translacji. Uważa się, iż miRNA jako „epigenetyczny pomost” łączący czynniki środowiskowe z genetycznymi, może odgrywać rolę w procesie autoimmunizacji. Dlatego zainteresowaliśmy się tematyką krótkich, niekodujących RNA w kontekście rozwoju chorób autoimmunologicznych. Celem badania była analiza miRNA dla oceny ryzyka rozwoju i identyfikacji molekularnych biomarkerów cukrzycy typu 1 oraz wskazania potencjalnych miejsc wiązania dysregulowanych miRNA. Uzyskane wyniki zostały zebrane w artykule pt. „**miR-487a-3p upregulated in type 1 diabetes targets *CTLA4* and *FOXO3***”, który opublikowano w **Diabetes Research and Clinical Practice 2018; 142:146-153**. W pierwszym etapie dokonaliśmy globalnej analizy ekspresji miRNA na platformie mikromacierzowej *Affymetrix 4.1*. Ekspresja miRNA została oceniona w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pediatrycznych pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 (n=15) i porównana z grupą zdrowych dzieci (n=3).

W grupie chorych z T1D znaleźli się zarówno pacjenci z ciężkim początkiem klinicznym cukrzycy jak i jej łagodnym ujawnieniem. W celu zminimalizowania wpływu parametrów biochemicznych na ekspresję miRNA, materiał do badań był pobierany od pacjentów wyrównanych glikemicznie, z wywiadem nieobciążonym przewlekłymi ani ostrymi schorzeniami zapalnymi w okresie ostatniego miesiąca oraz bez wykładników laboratoryjnych stanu zapalnego. Analiza mikromacierzowa wykazała znamienne statystycznie podwyższoną ekspresję 24 miRNA i obniżoną ekspresję 67 miRNA ( $P < 0,05$ ). Po zastosowaniu linii odcięcia: krotność zmiany ekspresji (ang. *fold change*, *FC*)  $> 2,00$  i wartość  $P < 0,05$ , wskazaliśmy osiem dysregulowanych miRNA: miR-487a-3p, miR-1247-3p, let-7d-3p, miR-3180, miR-4750-5p, miR-3652, miR-3180-3p i miR-885-3p. Wśród tych miRNA, miR-487a-3p wykazywało nadekspresję, natomiast ekspresja pozostałych była obniżona. Walidacja eksperymentu macierzowego w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1 ( $n=28$ ) i grupie zdrowych dawców ( $n=28$ ), metodą qRT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym) z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych sond typu TaqMan, potwierdziła nadekspresję miR-487a-3p ( $P < 0,01$ ). Ekspresja miR-487a-3p korelowała z przebiegiem klinicznym cukrzycy. Pacjenci z ciężkim początkiem klinicznym, manifestowanym kwasicą ketonową, prezentowali wyższy poziom ekspresji miR-487a-3p ( $FC\ 1,70$ ) w porównaniu z grupą o łagodnym przebiegu początku choroby ( $FC\ 1,20$ ). W kolejnym etapie realizacji projektu dokonaliśmy analizy *in silico* miejsc wiązania miR-487a-3p w oparciu o programy bioinformatyczne: *TargetScan*, *miRWALK2.0* i *PITA*. Geny, będące potencjalnym miejscem wiązania miRNA zostały zweryfikowane w odniesieniu do ich roli w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i patogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Wskazaliśmy *CTLA4*, *FOXO3*, *MARCH5* i *PTPN2* jako miejsca wiązania miR-487a-3p. Następnie oceniliśmy *in vitro* oddziaływanie miR-487a-3p z sekwencjami 3'UTR wybranych genów docelowych. Analizy zostały przeprowadzone w komórkach linii Jurkat, z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy. Zaobserwowaliśmy znamienne statystycznie obniżenie luminescencji ( $P < 0,05$ ) w przypadku transfekcji komórek Jurkat mimikiem miR-487a-3p i wektorem psiCHECK-2\_CLTA4 oraz psiCHECK-2\_FOXO3. Aktywność względna lucyferazy była obniżona o 26% dla genu *CTLA4* i o 11% dla genu *FOXO3*. Wyniki naszych badań wskazały geny *CTLA4* (ang. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated 4*) i *FOXO3* (ang. *Forkhead Box O3A*) jako potencjalne miejsca wiązania miR-487a-3p. Gen *CTLA4*, kodujący cząsteczkę CD152, jest

negatywnym regulatorem aktywności limfocytów T. Mutacje tego genu u człowieka upośledzają wiązanie cząsteczek CD80, CD86 i zaburzają odpowiedź immunologiczną a w modelu mysim związane są z letalnym fenotypem autoimmunizacyjnym [51-53]. Dodatkowo, *CTLA4* warunkuje funkcję regulatorową limfocytów CD4<sup>+</sup> i w związku z tym odpowiedzialny jest za modulowanie obwodowej tolerancji immunologicznej [54]. Rozwój limfocytów regulatorowych (T<sub>reg</sub>) determinowany jest również przez czynniki transkrypcyjne FOXO [55]. Wyłączenie genów *FOXO1* i *FOXO3* hamuje ekspresję *CTLA4* i upośledza rozwój limfocytów T<sub>reg</sub> Foxp3<sup>+</sup>[55]. Sugeruje się również rolę FOXO3 w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, poprzez modulowanie funkcji. Wykazano, iż ekspresja FOXO3 warunkuje prawidłową funkcję neutrofilów w stanach zapalnych [56]. Zatem miR-487a-3p poprzez hamowanie ekspresję genów istotnych dla tolerancji immunologicznej może przyczyniać się do rozwoju autoimmunizacji.

Najważniejsze wyniki osiągnięte na podstawie przeprowadzonych badań oraz ich możliwe zastosowanie:

1. Wariant polimorficzny L155H (rs12150220) genu *NLRP1* był obserwowany częściej w grupie pacjentów z autoimmunologiczną pierwotną niedoczynnością kory nadnerczy. Stratyfikacja pacjentów pod względem obecności dodatkowych chorób autoimmunologicznych wykazała silną asocjację rs12150220 z APS (typ 2 i 4). Dodatkowo, haplotyp posiadający allel ryzyka rs12150220 występował częściej w grupie pacjentów z AD w porównaniu ze zdrowymi dawcami. Zatem gen *NLRP1* jest czynnikiem ryzyka rozwoju choroby Addisona. Określenie występowania wariantu L155H pozwala wskazać grupy zagrożone rozwojem autoimmunizacji wielogruzołowej.
2. Analiza wariantów rs6502867, rs12150220, rs2670660, rs878329, rs8182352 i rs4790797 genu *NLRP1* nie wykazała różnic w rozkładzie alleli i genotypów pomiędzy grupą chorych z cukrzycą typu 1 a zdrowych dawców. Polimorfizmy genu *NLRP1* nie są zasocjowane z rozwojem T1D, zatem nie stanowią użytecznego narzędzia molekularnego dla określenia ryzyka wystąpienia choroby.
3. Warianty polimorficzne rs1990760 i rs13422767 genu *IFIH1* obserwowane były częściej w grupie chorych z AD. Dodatkowo wykazano asocjację rs3747517 z autoimmunologicznym zespołem wielogruzołowym (APS typu 2 i 4). Meta-analiza rozkładu genotypów i częstości alleli przeprowadzona dla trzech populacji kaukaskich,



nie potwierdziła związku wariantu rs1990760 z rozwojem AD. Uzyskane wyniki nie wskazują jednoznacznie genu *IFIH1* jako czynnika ryzyka rozwoju choroby Addisona.

4. Genotypowanie wariantów polimorficznych rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767 genu *IFIH1* wykazało silny związek wszystkich badanych SNP z T1D. Dodatkowo haplotyp zawierający allele ryzyka wariantów rs3747517, rs1990760, rs2111485 i rs13422767 był obserwowany częściej w grupie T1D niż u zdrowych dawców. Przeprowadzona analiza ryzyka wystąpienia choroby związanego z liczbą alleli (ang. *CGRS*) wykazała efekt addytywny wariantów polimorficznych *IFIH1*. Dokonano oceny poziomu ekspresji *IFIH1* w niestymulowanych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej. Pacjenci z T1D wykazywali nadekspresję *IFIH1* w porównaniu grupą kontrolną. Natomiast poziom ekspresji nie korelował z genotypami wariantów *IFIH1*. Podwyższona ekspresja *IFIH1* może zaburzać szlak sygnałowy interferonu typu I, a tym samym przyczyniać się do autoagresji. Wyniki badań sugerują udział genu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej-*IFIH1* w rozwoju cukrzycy typu 1.

5. Analiza częstości alleli i genotypów nie wykazała związku wariantów genu *MAVS* z AD i T1D. Skłaniamy się w stronę hipotezy, iż *MAVS* nie jest czynnikiem ryzyka rozwoju autoimmunizacji.

6. Globalna analiza ekspresji mikroRNA, przeprowadzona na platformie mikromacierzowej wykazała nadekspresję miR-487a-3p u pacjentów z T1D. Ekspresja miR-487a-3p korelowała z przebiegiem klinicznym. Pacjenci z ciężkim początkiem klinicznym, manifestowanym kwasicą ketonową, posiadali wyższy poziom ekspresji miRNA w porównaniu z grupą o łagodnym przebiegu choroby. Wyniki badań sugerują potencjalne wykorzystanie miR-487a-3p jako biomarkera T1D, powikłanej kwasicą ketonową. Dodatkowo, badania *in vitro* wykazały funkcjonalny charakter miR-487a-3p. miR-487a-3p może regulować ekspresję kluczowych genów odpowiedzi immunologicznej: *CTLA4* i *FOXO3*, poprzez wiązanie się do ich sekwencji 3'UTR.

## **VI. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Pozostałe kierunki prowadzonych przez mnie badań, poza osiągnięciem wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.), obejmują cztery główne obszary zainteresowań:

## A. Aspekty kliniczne autoimmunologicznej choroby Addisona

Choroba Addisona pozostaje jednym z moich głównych nurtów zainteresowań, zarówno w aspekcie genetycznym, jaki i klinicznym. Podczas wieloletniej współpracy z dr hab. Martą Fichną z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, zaangażowałam się w badania dotyczące niepożądanych efektów substytucji glikokortykosteroidowej u chorych z AD. Dla oceny wpływu długoterminowego leczenia preparatami hydrokortyzonu (HC) na gęstość mineralną kości, zbadaliśmy ważny element remodelingu kostnego, którym jest układ *Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B* (RANK)- RANK Ligand (RANKL) - Osteoprotegeryna (OPG). Pacjenci z AD otrzymujący standardową substytucję steroidową wykazywali zwiększone stężenie OPG w surowicy, co może być związane z nasiloną resorpcją kostną i zwiększonym ryzykiem osteoporozy (*Journal of Physiology and Pharmacology* 2012; IF 2,804). Natomiast stężenia RANKL w surowicy nie korelowały z gęstością mineralną kości, zatem nie są dogodnym markerem zwiększonej resorpcji kostnej.

W kolejnym badaniu, także dotyczącym możliwych niepożądanych efektów substytucji glikokortykosteroidowej w chorobie Addisona, oceniliśmy stężenia adipokin: leptyny, adiponektyny oraz rezystyny. Adipokiny są peptydami syntetyzowanymi przez tkankę tłuszczową, które regulują metabolizm glukozowo-lipidowy. Zaburzenia stężeń adipokin mogą prowadzić do rozwoju chorób metabolicznych. Przeprowadzone przez nas badanie nie wykazało negatywnego wpływu substytucji HC na profil adipokin (*Endocrine* 2015; IF 3,279). Stężenia leptyny i adiponektyny u leczonych pacjentów z AD, były zbliżone do osób zdrowych, a poziom rezystyny istotnie obniżony. Zatem zwiększona śmiertelność naczyniowo-sercowa, sugerowana w przebiegu AD, nie wydaje się związana z zaburzeniami stężenia adipokin.

Kolejnym ważnym aspektem klinicznym choroby Addisona jest współwystępowanie innych schorzeń autoimmunologicznych, co poważnie utrudnia leczenie. We współpracy z dr hab. Martą Fichną, Kolegami z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Diabetologii oraz Kliniki Diabetologii i Otyłości Wieku Rozwojowego UM w Poznaniu, badaliśmy częstość występowania T1D oraz autoprzeciwciał specyficznych dla komórek beta u osób z AD. Oceniliśmy obecność typowych markerów cukrzycy typu 1, do których należą autoprzeciwciała przeciwko insulinie (IAA), dekarboksylazie kwasu glutaminowego

(GADA), fosfatazie tyrozynowej (IA-2A). Dodatkowo, oznaczyliśmy niedawno zidentyfikowane przeciwciała przeciwko transporterowi cynkowemu 8 (ZnT8A). Wyniki naszych badań wykazały wysoką częstość występowania ZnT8A u pacjentów z niedoczynnością kory nadnerczy (*Endocrine* 2016; IF 3,279). ZnT8A było wykrywane u chorych z AD i T1D, jak również u chorych bez cukrzycy typu 1. Wyniki badań potwierdziły, iż obecność ZnT8A i GADA, wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy typu 1 u osób z AD.

Prowadzone obecnie badania mają na celu poznanie mechanizmów autoagresji w chorobie Addisona. Uważa się, iż jednym z czynników sprzyjających destrukcji kory nadnerczy jest cytokina RANTES, która pełni rolę w polaryzacji limfocytów w kierunku Th1, pobudza proliferację komórek NK, oraz aktywuje limfocyty w miejscach zapalnych. We współpracy z dr hab. M. Fichna, oceniliśmy poziom chemokiny RANTES u chorych z AD i zdrowych dawców. Zaobserwowaliśmy istotnie statystycznie wyższy poziom RANTES w surowicy chorych z AD w porównaniu z grupą kontrolną (*Polish Archives of Internal Medicine*, 2018; 2,658). Wyniki naszych badań sugerują udział cytokiny RANTES w rozwoju autoimmunizacji.

## B. Podłoże genetyczne choroby AD

W swojej pracy badawczej głównie koncentrowałam się na analizie podłoża genetycznego choroby Addisona, związanego z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną. Ponadto zainteresowałam się udziałem innych czynników molekularnych w rozwoju autoimmunizacji. We współpracy z dr hab. Martą Fichna i prof. Simonem Pearce`m z University of Newcastle, przeprowadziliśmy analizę asocjacyjną wariantów genu *PTPN22*. Wyniki naszych badań wykazały związek allelu 1858T z rozwojem autoimmunologicznej choroby AD (*Clinical Endocrinology* 2009, IF 3,201). *PTPN22*, kodujący limfoidalną fosfatazę tyrozyny (LYP), okazuje się być drugim, co do znaczenia, po genach układu MHC, genetycznym czynnikiem ryzyka chorób autoimmunologicznych. Liczne badania potwierdziły asocjację wariantu C1858T (R620W) z cukrzycą typu 1, chorobą Addisona, reumatoidalnym zapaleniem stawów, toczeniem rumieniowatym układowym oraz chorobą Graves-Basedowa. Prof. Nunzio Bottini jako pierwszy wykazał charakter funkcjonalny wariantu R620W i zainicjował badania nad rolą LYP w patogenezie chorób autoimmunologicznych [11]. W ramach

stypendium programu Mobilność Plus MNiSW, odbyłam roczny staż naukowy w zespole prof. Bottiniego w La Jolla Institute for Allergy and Immunology. Brałam udział w projekcie, którego celem było opracowanie uniwersalnego modelu badawczego, dedykowanego do analizy funkcjonalnej wariantów polimorficznych. Odbyty staż znacznie poszerzył mój warsztat badawczy, szczególnie o techniki inżynierii genetycznej oraz przyczynił się do pokonania barier natury metodycznej podczas realizacji pomysłów naukowych.

W latach 2009-2012 włączyłam się w badania projektu EURADRENAL, finansowanego z funduszy Unii Europejskiej, którego jednym z celów było poszukiwanie nowych genetycznych czynników ryzyka choroby Addisona. Pierwotnie planowano przeprowadzenie badania typu GWAS w grupie chorych z AD, pochodzących z Wielkiej Brytanii, Norwegii, Niemiec, Szwecji, Włoch i Polski. Ze względu na heterogeność genetyczną badanych populacji, nie udało się zastosować tego podejścia metodycznego. Ostatecznie, analizę oparto o niezależne genotypowanie wyselekcjonowanych SNP genów-kandydatów, w sześciu grupach chorych z AD. Meta-analiza wskazała kolejne geny- *STAT4* i *GATA3*, związane z rozwojem choroby Addisona (*PLoS ONE* 2014, IF 3,234).

#### C. Czynniki genetyczne otyłości i zespołów metabolicznych

W ostatnich dekadach odnotowywany jest dramatyczny wzrost zapadalności na otyłość, który również dotyczy populacji polskiej. W związku z tym, we współpracy z dr hab. Martą Fichną, zainteresowałyśmy się tematyką genów kontrolujących tkankową dostępność i działanie glikokortykosteroidów dla rozwoju insulinooporności i zagrożenia cukrzycą typu 2 u dzieci i młodzieży z otyłością. W ramach grantu Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego, dokonano oceny związku pomiędzy obecnością wariantów genów *NR3C1*, *FKBP5*, *HSD11B1*, *H6PD* a występowaniem otyłości oraz zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u dzieci i młodzieży. Wariant rs1360780 genu *FKBP5*, okazał się być czynnikiem ryzyka rozwoju insulinooporności i hipertrójglicydemii (*Obesity Research and Clinical Practice* 2018; 2,153). *FKBP5* koduje białko pomocnicze (chaperonowe) z rodziny immunofilin, które poprzez interakcję z receptorem glikokortykosteroidowym, reguluje jego dostępność dla ligandów.

#### D. Genetyka nowotworów

Oprócz opisanej powyżej tematyki, zainteresowałam się również genetyką onkologiczną. Brałam udział w projekcie realizowanym we współpracy z dr Iwoną Ziółkowską-Suchanek, którego celem była analiza wariantów polimorficznych genu *IREB2* i *FAM13A*, w grupie chorych z rakiem płuc oraz przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. Wykazaliśmy asocjację polimorfizmów genu *IREB2* z rakiem płuc, podczas gdy warianty *FAM13A* związane były z podwyższonym ryzykiem wystąpienia obturacyjnej choroby płuc (*Scientific Reports* 2015, IF 5,228). Rola *FAM13A* w procesie nowotworzenia jest słabo poznana, dlatego badania prowadzone w tej materii mają interesujący i nowatorski charakter.

W 2017r. miałam również możliwość uczestniczenia w projekcie dotyczącym podłoża genetycznego nowotworów piersi. Badania, w których brałam udział we współpracy z dr Martą Podralską, obejmowały analizę wariantów polimorficznych genów zaangażowanych w mechanizmy naprawy DNA (*ATM*, *H2AFX* i *MRE11*). Wykazaliśmy, iż polimorfizmy oraz specyficzny haplotyp genu *H2AFX* są czynnikiem ryzyka nowotworów piersi (*BMC Cancer* 2018; 3,258).

Obecnie jestem zaangażowana w realizację trzech projektów finansowanych ze środków NCN (dwa projekty OPUS14 i SONATA12), których celem jest poszerzenie wiedzy z zakresu etiopatogenezy nowotworów. Badania prowadzone we współpracy z prof. dr hab. Grzegorzem Przybylskim dotyczą poznania funkcji genu kodującego białko TMEM244, którego ekspresja jest zaburzona u chorych z zespołem Sezary`ego. W ramach współpracy z dr Agnieszką Dzikiewicz-Krawczyk, uczestniczę w badaniach mających na celu identyfikację funkcjonalnych miejsc wiązania MYC oraz docelowych genów niezbędnych dla wzrostu komórek nowotworowych, w oparciu o metodę CRISPR/Cas9. Ponadto biorę udział w realizacji projektu dotyczącego funkcjonalnej charakterystyki długich niekodujących RNA, zaangażowanych w zależną od ATM odpowiedź na uszkodzenia DNA.

- [1] Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32:457-67.
- [2] Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Witte DR, Stevens LK, Porta M, Fuller JH. Relationship between risk factors and mortality in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study (PCS). *Diabetes care*. 2008;31:1360-6.
- [3] Mitchell AL, Pearce SH. Autoimmune Addison disease: pathophysiology and genetic complexity. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8:306-16.
- [4] Johannsson G, Falorni A, Skrtic S, Lennernas H, Quinkler M, Monson JP, et al. Adrenal insufficiency: review of clinical outcomes with current glucocorticoid replacement therapy. *Clinical endocrinology*. 2015;82:2-11.
- [5] Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*. 2008;371:1777-82.
- [6] Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464:1293-300.
- [7] Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:14074-9.
- [8] Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clinical chemistry*. 2011;57:176-85.
- [9] Barratt BJ, Payne F, Lowe CE, Hermann R, Healy BC, Harold D, et al. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:1884-9.
- [10] Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33:176-83.
- [11] Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics*. 2004;36:337-8.
- [12] Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423:506-11.
- [13] Hyoty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*. 2002;45:1353-61.
- [14] Mitchell AL, Macarthur KD, Gan EH, Baggott LE, Wolff AS, Skinningsrud B, et al. Association of autoimmune Addison's disease with alleles of STAT4 and GATA3 in European cohorts. *PloS one*. 2014;9:e88991.
- [15] Gombos Z, Hermann R, Kiviniemi M, Nejntsev S, Reimand K, Fadeyev V, et al. Analysis of extended human leukocyte antigen haplotype association with Addison's disease in three populations. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2007;157:757-61.
- [16] Brozzetti A, Marzotti S, Tortoioli C, Bini V, Giordano R, Dotta F, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Ala17 polymorphism is a genetic marker of autoimmune adrenal insufficiency: Italian association study and meta-analysis of European studies. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2010;162:361-9.
- [17] Skinningsrud B, Husebye ES, Gervin K, Lovas K, Blomhoff A, Wolff AB, et al. Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *European journal of human genetics : EJHG*. 2008;16:977-82.
- [18] Roycroft M, Fichna M, McDonald D, Owen K, Zurawek M, Gryczynska M, et al. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clinical endocrinology*. 2009;70:358-62.
- [19] Fichna M, Zurawek M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczynska M, Fichna P, Sowinski J, et al. Association of the CYP27B1 C(-1260)A polymorphism with autoimmune Addison's disease. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2010;118:544-9.
- [20] Lopez ER, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, et al. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis,



Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2004;151:193-7.

[21] Wesche B, Jaeckel E, Trautwein C, Wedemeyer H, Falorni A, Frank H, et al. Induction of autoantibodies to the adrenal cortex and pancreatic islet cells by interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. *Gut*. 2001;48:378-83.

[22] Hellesen A, Edvardsen K, Breivik L, Husebye ES, Bratland E. The effect of types I and III interferons on adrenocortical cells and its possible implications for autoimmune Addison's disease. *Clinical and experimental immunology*. 2014;176:351-62.

[23] Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4:95-104.

[24] Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annual review of immunology*. 2005;23:387-414.

[25] Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 2007;356:1216-25.

[26] Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes and immunity*. 2009;10:120-4.

[27] Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *American journal of human genetics*. 2007;80:531-8.

[28] Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19:80-94.

[29] Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krah T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature medicine*. 1998;4:781-5.

[30] Devendra D, Eisenbarth GS. Interferon alpha--a potential link in the pathogenesis of viral-induced type 1 diabetes and autoimmunity. *Clinical immunology*. 2004;111:225-33.

[31] Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441:101-5.

[32] Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25:373-81.

[33] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics*. 2009;41:703-7.

[34] Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*. 2009;41:1228-33.

[35] Genetic Analysis of Psoriasis C, the Wellcome Trust Case Control C, Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature genetics*. 2010;42:985-90.

[36] Liu S, Wang H, Jin Y, Podolsky R, Reddy MV, Pedersen J, et al. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Human molecular genetics*. 2009;18:358-65.

[37] Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nature genetics*. 2006;38:617-9.

[38] Couturier N, Gourraud PA, Cournu-Rebeix I, Gout C, Bucciarelli F, Edan G, et al. IFIH1-GCA-KCNH7 locus is not associated with genetic susceptibility to multiple sclerosis in French patients. *European journal of human genetics : EJHG*. 2009;17:844-7.

[39] Marinou I, Montgomery DS, Dickson MC, Binks MH, Moore DJ, Bax DE, et al. The interferon induced with helicase domain 1 A946T polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2007;9:R40.



- [40] Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Robbers I, Kahles H, Hahner S, Willenberg H, et al. The rs1990760 polymorphism within the IFIH1 locus is not associated with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *BMC medical genetics*. 2009;10:126.
- [41] Sutherland A, Davies J, Owen CJ, Vaikakara S, Walker C, Cheetham TD, et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:3338-41.
- [42] Fumagalli M, Cagliani R, Riva S, Pozzoli U, Biasin M, Piacentini L, et al. Population genetics of IFIH1: ancient population structure, local selection, and implications for susceptibility to type 1 diabetes. *Molecular biology and evolution*. 2010;27:2555-66.
- [43] McCartney SA, Vermi W, Lonardi S, Rossini C, Otero K, Calderon B, et al. RNA sensor-induced type I IFN prevents diabetes caused by a beta cell-tropic virus in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:1497-507.
- [44] Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, et al. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity*. 2014;40:199-212.
- [45] Buskiewicz IA, Koenig A, Huber SA, Budd RC. Caspase-8 and FLIP regulate RIG-I/MDA5-induced innate immune host responses to picornaviruses. *Future virology*. 2012;7:1221-36.
- [46] Pothlichet J, Niewold TB, Vitour D, Solhonne B, Crow MK, Si-Tahar M. A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO molecular medicine*. 2011;3:142-52.
- [47] Furlanos S, Varney MD, Tait BD, Morahan G, Honeyman MC, Colman PG, et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes care*. 2008;31:1546-9.
- [48] Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith GJ, Rewers M, et al. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2008;31:1392-6.
- [49] Brown CC, Wedderburn LR. Genetics: Mapping autoimmune disease epigenetics: what's on the horizon? *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11:131-2.
- [50] Jeffries MA, Sawalha AH. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve? *Expert review of clinical immunology*. 2015;11:45-58.
- [51] Schubert D, Bode C, Kenefack R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature medicine*. 2014;20:1410-6.
- [52] Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3:541-7.
- [53] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995;270:985-8.
- [54] Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews*. 2008;224:166-82.
- [55] Kerdiles YM, Stone EL, Beisner DR, McGargill MA, Ch'en IL, Stockmann C, et al. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity*. 2010;33:890-904.
- [56] Jonsson H, Allen P, Peng SL. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nature medicine*. 2005;11:666-71.

Poznań, 19 września 2018

*Magdalena Żurawek*