

Autoreferat (załącznik nr 3)

1. Dane wnioskodawcy

Kamila Kusz-Zamelczyk
nazwisko rodowe: Kusz
urodzona

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

1996 - **magister biotechnologii**

Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu,
Praca magisterska pt. „Identyfikacja wirusa HPV w stanach nowotworowych i przednowotworowych narządów płciowych kobiet”
Promotor: Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak

2001 - **doktor nauk chemicznych, specjalność biochemia**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu,
Praca doktorska pt. „Wybrane aspekty molekularne patologii determinacji płci: zespołu Swyera, zespołu męczyzny XX oraz hermafrodytyzmu prawdziwego XX”
Promotor: Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska

2003 – uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.1996 - 30.09.1997	doktorantka w Instytucie Genetyki Człowieka PAN
01.10.1997 - 30.09.2002	asystent w Instytucie Genetyki Człowieka PAN
01.10.2002 - 31.07.2011	adiunkt w Instytucie Genetyki Człowieka PAN
01.08.2011 - obecnie	asystent w Instytucie Genetyki Człowieka PAN
01.04.2006 - obecnie	inspektor ochrony radiologicznej w Instytucie Genetyki Człowieka PAN

Na przełomie lat 2008-2009 miałam 10-miesięczną przerwę w pracy z powodu urodzenia dziecka.

4. Dorobek Naukowy

Jestem autorką 11 artykułów naukowych (nie licząc cyklu publikacji zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe), w tym:

- 8 artykułów oryginalnych
- 1 artykułu przeglądowego
- 2 rozdziałów w książkach

Dane bibliometryczne (z dnia 21.09.2015)

Łączny *Impact Factor* cyklu publikacji zgłoszonego jako osiągnięcie naukowe, zgodnie z rokiem opublikowania: **15,875**

Łączny *Impact Factor* pozostałych publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania: **23,089**

Liczba cytowań bez autocytowań według bazy Web of Science: **460**

Index Hirscha według bazy Web of Science: **6**

Prace, których jestem współautorem są cytowane w 7 jednostkach tematycznych bazy Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

Jestem również autorką **33** doniesień zjazdowych prezentowanych na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych, w tym 19 doniesień ustnych i 14 doniesień plakatowych.

Projekty badawcze

W trakcie dotychczasowej pracy naukowej uczestniczyłam lub nadal uczestniczę w realizacji **14** projektów badawczych, w tym w **4** jako kierownik.

Wykaz opublikowanych prac naukowych, komunikatów zjazdowych oraz projektów badawczych przedstawiony jest w załączniku nr 5.

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

Tytuł cyklu tematycznego publikacji:

**„Badanie roli białek NANOS i PUMILIO w rozwoju komórek rozrodczych
mężczyzn”**

- 1) **Kusz-Zamelczyk K**, Sajek M, Spik A, Glazar R, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, Kotecki M, Pawelczyk L, Jaruzelska J. Mutations of NANOS1, a human homologue of the Drosophila morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *Journal of Medical Genetics* 2013; 50:187-193 (IF₂₀₁₃ **5,703**)
- 2) Ginter-Matuszewska B, **Kusz K**, Spik A, Grzeszkowiak D, Rembiszewska A, Kupryjańczyk J, Jaruzelska J. NANOS1 and PUMILIO2 bind microRNA biogenesis factor GEMIN3, within chromatoid body in human germ cells. *Histochemistry and Cell Biology* 2011; 136:279-287 (IF₂₀₁₁ **2,588**)
- 3) **Kusz K**, Tomczyk L, Sajek M, Spik A, Latos-Bieleńska A, Jędrzejczak P, Pawelczyk L, Jaruzelska J. The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and significance for the human male reproduction. *Molecular Human Reproduction* 2009; 15:165-171 (IF₂₀₀₉ **3,005**)
- 4) **Kusz K**, Tomczyk L, Spik A, Latos-Bieleńska A, Jędrzejczak P, Pawelczyk L, Jaruzelska J. NANOS3 gene mutations in men with isolated sterility phenotype. *Molecular Reproduction and Development* 2009; 76:804 (IF₂₀₀₉ **2,041**)
- 5) **Kusz K**, Ginter-Matuszewska B, Ziółkowska K, Spik A, Bierła J, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, Pawelczyk L, Jaruzelska J. Polymorphisms of the human PUMILIO2 gene and male sterility. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74:795-799 (IF₂₀₀₇ **2,538**)
- 6) **Kusz-Zamelczyk K**, Ginter-Matuszewska B, Sajek M, Jaruzelska J. Gene mutations associated with male infertility. Rozdział w książce *Male Infertility*, Wydawnictwo InTech, Rijeka, Chorwacja, 2012, 21-50

Łączny Impact Factor cyklu publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 15,875

Omówienie w/w cyklu publikacji

Moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół mechanizmów kierujących procesem determinacji i rozwoju płci, w tym rozwoju komórek płciowych. Prace zgłoszone przeze mnie jako osiągnięcie naukowe dotyczą genetyki rozwoju komórek płciowych mężczyzn na tle niepłodności. Niepłodność męska stanowi duży problem medyczny i społeczny bowiem szacuje się, że aż 15% małżeństw na świecie nie może doczekać się potomstwa a w około połowie tych przypadków przyczyna leży po stronie mężczyzny. Coraz częściej zwraca się uwagę na czynniki genetyczne niepłodności, jednak pomimo rozwoju metod sekwencjonowania nowej generacji jest to obszar wciąż słabo poznany. W pracy przeglądowej pt. *Gene mutations associated with male infertility* stanowiącej rozdział w książce *Male Infertility* wraz ze współautorami podsumowałam stan wiedzy o genetycznym podłożu niepłodności mężczyzn.

Kusz-Zamełczyk K, Ginter-Matuszewska B. Sajek M, Jaruzelska J. Gene mutations associated with male infertility. Rozdział w książce *Male Infertility*, Wydawnictwo InTech, Rijeka, Chorwacja, 2012, 21-50

Poza aberracjami chromosomowymi niepłodność męską warunkują również mutacje punktowe specyficznych genów autosomalnych lub mikrodelecje w obrębie regionu AZF (ang. *Azoospermia Factor*) chromosomu Y. Te ostatnie są najczęstszą genetyczną przyczyną braku (azoospermii) lub obniżonej liczby plemników w nasieniu (oligozoospermii). Region AZF zawiera m.in. zachowany w ewolucji i ważny dla płodności gen *DAZ* (ang. *Deleted in Azoospermia*). Obecność domeny RRM (ang. *RNA-Recognition Motif*) w białku *DAZ* sugeruje zaangażowanie w interakcje z RNA [Saxena i wsp. 1996]. Moja opiekunka naukowa Pani Prof. Jaruzelska wraz ze współpracownikami w badaniach nad mechanizmem działania białka *DAZ* pokazała, iż oddziałuje ono m. in. z białkiem *PUMILIO2* w komórkach rozrodczych mężczyzn [Moore, Jaruzelska i wsp. 2003] a to z kolei oddziałuje z białkiem *NANOS1* [Jaruzelska, Kotecki, Kusz i wsp. 2003]. Te dwa ostatnie białka przykuły moją uwagę ponieważ 1/ podobnie jak *DAZ* posiadają domeny wiązania z RNA (białko *PUMILIO2* domenę *PUF* a *NANOS1* domenę palców cynkowych typu *(CCHC)₂*, 2/ są silnie zachowane w ewolucji (białka *pumilio* zwane również *PUF* są szeroko rozpowszechnione wśród grzybów, roślin oraz zwierząt, natomiast białka *nanos* występują w królestwie zwierząt począwszy od jamochłonów aż po człowieka), 3/ homologi tych białek – *pumilio* oraz *nanos* pełnią kluczowe role w rozwoju komórek płciowych *Drosophila melanogaster* [Kobayashi i wsp. 1996, Fores i Lehmann 1998, Hayashi i wsp. 2004, Wang i Lin 2004, Sato i wsp. 2007] oraz *Caenorhabditis elegans* [Kraemer i wsp. 1999] jako regulatory translacji specyficznych mRNA, 4/ *NANOS1* ulega specyficznej ekspresji w komórkach męskiej linii germinalnej, w

których występuje również PUMILIO2 [Jaruzelska, Kotecki, Kusz i wsp. 2003]. Biorąc pod uwagę powyższe dane wysunęliśmy hipotezę, że w komórkach męskiej linii płciowej białka DAZ, PUMILIO2 i NANOS1 funkcjonują w kompleksach rybnukleoproteinowych, w których dochodzi do regulacji translacji specyficznych mRNA, kluczowych dla prawidłowego rozwoju tychże komórek. Można było oczekiwać, że nieprawidłowe funkcjonowanie owej regulacji skutkowałoby zaburzeniem rozwoju komórek płciowych mężczyzn a w konsekwencji niepłodnością. Funkcja białek rodziny DAZ oraz ich znaczenie dla płodności były szeroko badane od momentu identyfikacji genów *DAZ* w regionie AZF chromosomu Y w 1995 roku [Reijo i wsp. 1995]. Dlatego **celem mojego projektu podoktorskiego było poznanie roli białek PUMILIO2 i NANOS1 w rozwoju komórek płciowych mężczyzn oraz rozpoznanie mechanizmu molekularnego w którym funkcjonują. Po zidentyfikowaniu paralogów NANOS1 – NANOS2 i NANOS3 rozszerzyłam swe badania na całą rodzinę białek NANOS człowieka.** Cel ten realizowałam poprzez dwa równoległe podejścia badawcze: 1/ identyfikację białek oddziałujących z PUMILIO2 i NANOS1 oraz 2/ poszukiwanie mutacji genów *PUMILIO2* i *NANOS1-3* związanych z azoospermią lub oligozoospermią oraz badania funkcjonalne zidentyfikowanych mutacji. Było to przedsięwzięcie nowatorskie, bowiem w 2001 roku, w czasie rozpoczynania mojego projektu podoktorskiego, Prof. Jaruzelska właśnie sklonowała *NANOS1* i zasugerowała rolę tego genu oraz *PUMILIO2* w płodności człowieka (jej wyniki nie były jeszcze opublikowane). Paralogi *NANOS2* i *NANOS3* zostały zidentyfikowane przez inne grupy dopiero w trakcie trwania mojego projektu [Strausberg i wsp. 2002, Grimwood i wsp. 2004].

Identyfikacja białek oddziałujących z PUMILIO2 i NANOS1

Rozpoznawanie molekularnego mechanizmu działania kompleksu NANOS1-PUMILIO2 rozpoczęłam od identyfikacji oddziałujących z nim czynników białkowych. Badania te prowadziłam w ramach własnego grantu młodego badacza KBN nr 6 PO5E 001 21. W oparciu o drożdżowy system dwuhybrydowy oraz bibliotekę cDNA gonad męskich, z nieocenioną pomocą Pani mgr Anny Spik, pokazałam, że oba białka, NANOS1 i PUMILIO2 oddziałują z heliazą RNA, białkiem GEMIN3. W tym czasie Mourelatos i wsp. pokazali obecność białka GEMIN3 w kompleksie rybnukleoproteinowym 15S zawierającym liczne mikroRNA oraz eIF2C2 należące do rodziny białek ARGONAUTE pełniących zasadniczą rolę w funkcjonowaniu mikroRNA [Mourelatos i wsp. 2002]. Dane te stanowiły dla nas bardzo interesującą sugestię, że funkcjonowanie kompleksu NANOS1-PUMILIO2 w regulacji translacji może być powiązane ze ścieżką mikroRNA. Uzyskany przeze mnie wynik

wstępny wskazujący na interakcję NANOS1 i PUMILIO2 z GEMIN3 dał podwaliny pod projekt doktorski mojej byłej magistrantki, Pani Barbary Ginter-Matuszewskiej. W ramach tego projektu potwierdzone zostało oddziaływanie NANOS1-GEMIN3 oraz PUMILIO2-GEMIN3 poprzez koimmunoprecypitację z transfekowanych komórek ssaków. Biorąc pod uwagę, że ekspresja GEMIN3 w komórkach linii germinalnej nie była wcześniej opisana, chcieliśmy upewnić się czy białko to obecne jest w męskich komórkach płciowych na tym samym etapie rozwoju co NANOS1 i PUMILIO2. Pani mgr Alina Rembiszewska z Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie w ramach współpracy wykonała analizę immunohistochemiczną skrawków gonady męskiej człowieka oraz myszy. Dzięki temu pokazaliśmy, że białko GEMIN3, podobnie jak NANOS1 i PUMILIO2, zlokalizowane jest w okołojądrowym regionie cytoplazmy spermatogonii, spermatocytów oraz okrągłych spermatyd. Ekspresja GEMIN3 w tych stadiach rozwojowych męskiej linii płciowej sugeruje, że białko to mogłoby pełnić rolę w samoodnawianiu spermatogonii oraz w mejozie. Za pomocą podwójnego bawienia fluoroimmunohistochemicznego Pani Ginter-Matuszewska pokazała, że GEMIN3, NANOS1 i PUMILIO2 ko-lokalizują w okołojądrowym regionie cytoplazmy komórek męskiej linii germinalnej człowieka oraz myszy, a w stadium okrągłych spermatyd białka te obserwowane są w formie pojedynczego agregatu kontaktującego się z jądrem komórkowym. Morfologicznie agregat ten przypominał nam ciało chromatoidowe (CB), około jądrową strukturę zidentyfikowaną w okrągłych spermatydach gryzoni [Parvinen 2005], jednak występowanie tej struktury w komórkach spermatogenicznych człowieka nie było wcześniej zademonstrowane. Zastosowanie przeciwciała dla białka VASA stanowiącego marker ciała chromatoidowego oraz podwójne barwienie fluoroimmunohistochemiczne pozwoliło Pani Ginter-Matuszewskiej dowieść, że obserwowana przez nas w okrągłych spermatydach człowieka struktura, zawierająca białka NANOS1, PUMILIO2 i GEMIN3 jest tożsama z ciałem chromatoidowym [Ginter-Matuszewska, Kusz i wsp. 2011]. Po raz pierwszy zatem pokazaliśmy, że kompleks Nanos-Pumilio ssaków funkcjonuje w ciele chromatoidowym, uznawanym obecnie za specyficzne dla komórek męskiej linii germinalnej ssaków miejsce obróbki i przechowywania licznych mRNA oraz niekodujących RNA. Bliskość miejsc wiązania PUMILIO z miejscami wiązania mikroRNA [Galgano i wsp. 2008] sugeruje kooperację pomiędzy kompleksem NANOS1-PUMILIO2, białkiem GEMIN3 oraz mikroRNA w regulacji translacji wybranych mRNA. Kwestia ta stanowi przedmiot dalszych badań Pani Barbary Ginter-Matuszewskiej.

Ginter-Matuszewska B, **Kusz K**, Spik A, Grzeszkowiak D, Rembiszewska A, Kupryjańczyk J, Jaruzelska J. NANOS1 and PUMILIO2 bind microRNA biogenesis factor GEMIN3, within chromatoid body in human germ cells. *Histochemistry and Cell Biology* 2011; 136:279-287 (IF₂₀₁₁ **2,588**)

Poszukiwanie mutacji genów *PUMILIO2* i *NANOS1-3* związanych z azoospermią lub oligozoospermią oraz badania funkcjonalne wybranych mutacji

Jedną z metod poszukiwania roli genu jest analiza fenotypu na tle jego dysfunkcji. Znaczenie *pumilio* i *nanos* dla płodności *Drosophila* zostało ukazane właśnie za pomocą mutantów. Zmutowanie obu bądź jednego z tych białek skutkuje brakiem komórek płciowych w gonadach much [Forbes i Lehmann 1998]. Zastanawiałam się, czy znaczenie autosomowych genów *pumilio* oraz *nanos* dla płodności zostało zachowane od muchy do człowieka oraz czy każdy z trzech paralogów *NANOS* człowieka zyskał na drodze ewolucji odmienną rolę w rozwoju komórek linii płciowej. Na te pytania próbowałam odpowiedzieć poprzez poszukiwanie mutacji tych genów w grupie mężczyzn o fenotypie „czystej niepłodności”, czyli bez towarzyszących innych wad. Nowatorskość tego podejścia polegała na tym, że w momencie rozpoczęcia badań mysie homologii tych genów nie były jeszcze opisane. Niepłodni pacjenci charakteryzowali się azoospermią lub oligozoospermią. Niezwykle cenny dla tych badań był zdefiniowany fenotyp histologiczny kanalików plemnikotwórczych większości pacjentów. Założyliśmy bowiem, że wykrycie mutacji sprawczej *PUMILIO2* lub jednego z trzech genów *NANOS* na tle sprecyzowanego fenotypu kanalików plemnikotwórczych (np. Zespołu Samych Komórek Sertolego, zahamowania mejozy lub hipospermatogenezy) pozwoli wyciągnąć wnioski na temat roli danego genu w różnicowaniu męskich komórek płciowych. Grupa badana była rekrutowana dzięki współpracy z Profesorem Leszkiem Pawelczykiem i Profesorem Piotrem Jędrzejczakiem z Kliniki Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu oraz z Panią Profesor Anną Latos-Bieleńską z Katedry Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania nad poszukiwaniem mutacji *PUMILIO2* i *NANOS1-3* realizowaliśmy w ramach dwóch uzyskanych przeze mnie grantów: KBN nr 3 PO5E 013 25, pt. „Badanie funkcji białek *NANOS1* i *PUMILIO2* w rozwoju komórek germinalnych oraz ich znaczenia w niepłodności męskiej” (17.09.2003-16.01.2007) oraz MNiSW NN407 0683 33, pt. „Badanie roli białek *NANOS2* i *NANOS3* w rozwoju komórek germinalnych oraz ich znaczenie w płodności mężczyzn” (10.09.2007- 09.04.2011).

W pierwszej kolejności przeprowadziliśmy analizę genu *PUMILIO2*, który wprawdzie ulega ekspresji w różnych tkankach ale zdecydowanie najsilniejszej w komórkach linii płciowej jąder i jajników [Moore, Jaruzelska i wsp. 2003]. Z tego powodu wydawał się być dobrym kandydatem na gen, którego mutacje powodują fenotyp „czystej niepłodności”. Należy wspomnieć, że paralog *PUMILIO1* nie jest specyficzny dla komórek linii płciowej a poziom jego ekspresji jest podobny we wszystkich badanych tkankach [Moore, Jaruzelska i

wsp. 2003]. Dwie magistrantki, Pani Barbara Ginter-Matuszewska oraz Pani Katarzyna Ziółkowska poszukiwały, pod moją opieką, mutacji w eksonach oraz przylegających do nich fragmentach intronów genu *PUMILIO2* u 137 pacjentów z azoospermią lub oligozoospermią. Badania te doprowadziły do identyfikacji heterozygotycznej substytucji zlokalizowanej blisko pozycji donorowej splicingu w intronie 15 (IVS15+6G>A), występującej pomiędzy eksonami kodującymi domenę wiązania RNA – PUF. Substytucję tę wykryliśmy u trzech pacjentów z azoospermią. Pokazaliśmy jednak, że występowała również w grupie kontrolnej płodnych mężczyzn z taką samą częstością jak wśród badanych pacjentów. Zatem jej sprawcza rola w powstawaniu fenotypu niepłodności była wątpliwa. Na neutralny charakter tej mutacji wskazywała również wykonana przeze mnie analiza cDNA nosiciela tego wariantu sekwencji. Pokazała, że pomimo bliskości kanonicznego miejsca donorowego splicingu GT wariant ten nie był składany w sposób nieprawidłowy. Poza (IVS15+6G>A) wykryliśmy tylko jeszcze jedną zmianę u pacjenta z azoospermią. Była to mutacja synonimiczna p.Tyr258Tyr w eksonie 6, która teoretycznie nie ma żadnego wpływu na produkt białkowy genu *PUMILIO2*. Mogłaby powodować uruchomienie kryptycznego miejsca splicingu, jednak analiza bioinformatyczna nie potwierdziła takiego scenariusza. W sumie nie udało się nam pokazać znaczenia tego genu dla płodności mężczyzn, ani funkcji tego genu w procesie spermatogenezy [Kusz i wsp. 2007]. Brak jakichkolwiek innych zmian w sekwencji *PUMILIO2* w badanej przez nas dużej grupie mężczyzn pokazuje niezwykle niską zmienność tego genu.

Równoległe do poszukiwań mutacji w *PUMILIO2* rozpoczęłam poszukiwania mutacji w otwartej ramie odczytu pozbawionego intronów genu *NANOS1*, wyrażającego się u dorosłych specyficznie w linii męskich komórek płciowych [Jaruzelska, Kotecki, Kusz i wsp. 2003]. Wykryłam kilka zmian w sekwencji tego genu u niepłodnych mężczyzn. Wstępne wyniki z tego podprojektu przedstawiłam w wystąpieniu ustnym na konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka w Toronto, w 2004 roku. W trakcie prowadzonych przeze mnie poszukiwań mutacji *NANOS1* opublikowano dane pokazujące, że *knock out* ortologa tego genu u myszy nie ma żadnego negatywnego wpływu ani na rozwój komórek linii płciowej, ani na rozwój somatyczny [Haraguchi i wsp. 2003], podczas gdy ten sam zabieg na genie *Nanos2* lub *Nanos3* powodował fenotyp niepłodności odpowiednio samców lub obu płci [Tsuda i wsp. 2003]. W obliczu tych danych i przy założeniu zachowania funkcji genów *Nanos* wśród ssaków, postanowiłam przerwać analizę genu *NANOS1* a skoncentrować się na właśnie zidentyfikowanym bezintronowym genie *NANOS2* oraz zawierającym jeden intron genie *NANOS3*. Poprzez określenie profilu ich ekspresji

upewniłam się najpierw, że są one dobrymi kandydatami na geny, których mutacje powodują fenotyp „czystej niepłodności”. Pokazałam mianowicie, że oba geny *NANOS2* i *NANOS3* wyrażane są specyficznie w tkance gonad dorosłych mężczyzn [Kusz i wsp. 2009 a, Kusz i wsp. 2009 b]. Dla *NANOS2* przeprowadziłam bardziej szczegółową analizę ekspresji i pokazałam, że kodowane przez ten gen białko obecne jest głównie w cytoplazmie gonocytów płodowych jąder podczas gdy u dorosłych, podobnie do wcześniej opisanej ekspresji *NANOS1*, w regionie okołojądrowym komórek linii płciowej, począwszy od spermatogonii po okrągłe spermatydy [Kusz i wsp. 2009 a]. Tym samym pokazałam, że wzory ekspresji *NANOS2* w gonadzie dorosłego mężczyzny oraz mysich samców różnią się znacząco. Bowiem u dorosłych samców białko Nanos2 obecne jest jedynie w nielicznych spermatogoniach [Tsuda i wsp. 2006], gdzie odgrywa kluczową rolę w samoodnawianiu tychże komórek [Sada i wsp. 2009]. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że w spermatogenezie człowieka *NANOS2* może odgrywać rolę na kilku etapach rozwoju komórek płciowych. Interesowała mnie odpowiedź na pytania, czy geny *NANOS2* i *NANOS3* mają znaczenie dla płodności mężczyzn a jeśli tak, jaki fenotyp pociąga za sobą ich dysfunkcja? Starłam się odpowiedzieć na nie poprzez analizę genów *NANOS2* i *NANOS3* u 214 mężczyzn z azoospermią lub oligozoospermią. W badaniach tych uczestniczyła Pani Lidia Tomczyk, która pod moją opieką wykonywała pracę magisterską z tego zagadnienia. W *NANOS2* znalazłyśmy dwie heterozygotyczne mutacje u dwóch pacjentów z oligozoospermią. Jedna z nich powodowała zmianę sensu p.His68Gln i była zlokalizowana w najbardziej zakonserwowanej części genu kodującej funkcjonalną domenę palców cynkowych typu (CCHC)₂. Chociaż histydyna, która została zastąpiona glutaminą nie jest żadną z dwóch histydyn zaangażowanych w tworzenie struktury palców cynkowych białka *NANOS2*, to jednak według programów SIFT i PolyPhen przewidujących stopień szkodliwości substytucji aminokwasowych, mutacja p.His68Gln z dużym prawdopodobieństwem jest mutacją szkodliwą dla funkcji białka *NANOS2*. Mutacja ta była odziedziczona po matce, co było zgodne z naszym oczekiwaniem, biorąc pod uwagę, że *NANOS2* nie ulega ekspresji w linii żeńskiej. Zatem mutacja w tym genie nie powinna mieć wpływu na płodność kobiet. Niestety nie udało się nam pozyskać do badań członków rodziny matki, by prześledzić czy mutacja segreguje z fenotypem niepłodności męskiej. Zbadaliśmy jednak liczną grupę kontrolną, którą stanowiło aż 400 płodnych polskich mężczyzn posiadających co najmniej dwoje dzieci i zgodnie z oczekiwaniem nie wykryliśmy u nich mutacji p.His68Gln. Nasze rozważania nad wpływem mutacji p.His68Gln na fenotyp niepłodności zaburzyła informacja uzyskana z równoległe wykonywanej analizy regionu AZF, która wykazała mikrodelecję u probanda

obejmującą gen *DAZ*. Wyjaśnienie funkcjonalnego znaczenia mutacji p.His68Gln *NANOS2*, mogą przynieść badania prowadzone w laboratorium Prof. Jaruzelskiej przez jej doktoranta Pana Marcina Sajka oraz Panią mgr Annę Spik polegające na analizie wpływu tej substytucji na wiązanie białka *NANOS2* z RNA w kontekście regulacji translacji wybranego mRNA. Druga zmiana sekwencji *NANOS2* wykryta u innego pacjenta z oligozoospermią dotyczyła wprowadzie histydyny zaangażowanej w tworzenie struktury palców cynkowych, była to jednak zmiana synonimiczna p.His109His, zatem jej wpływ na niepłodność jest wątpliwy [Kusz i wsp. 2009a]. Analiza mutacji kolejnego paraloga, *NANOS3* wśród niepłodnych mężczyzn oraz w grupie kontrolnej doprowadziła do identyfikacji sześciu heterozygotycznych zmian, jednak tylko jedna z nich występowała wyłącznie wśród niepłodnych. Była to delecja pojedynczego nukleotydu w intronie 1, blisko granicy ekson-intron (IVS1 +25delG) obecna u pacjenta charakteryzującego się azoospermią oraz mieszanym fenotypem histologicznym jąder (hypospermatogeneza/atrofia jąder). Wpływ tej mutacji na niepłodność pozostaje niejasny ze względu na trudności z pozyskaniem do badań członków rodziny probanda, by prześledzić czy mutacja segreguje z fenotypem niepłodności męskiej [Kusz i wsp. 2009 b]. Biorąc pod uwagę, że analiza *NANOS2* i *NANOS3* nie została uwieńczona zidentyfikowaniem mutacji, która z całą pewnością powodowałaby niepłodność męską, znaczenia tych genów dla spermatogenezy nie mogliśmy określić. Tym nie mniej uzyskane przez nas pionierskie dane dotyczące ekspresji *NANOS3* oraz analizy mutacji tego genu zostały zamieszczone w bazie OMIM [OMIM: 608229]. Na podstawie wyników badań nad znaczeniem *NANOS2* i *NANOS3* dla płodności uzyskałam dwukrotnie stypendium konferencyjne Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Po zakończeniu badań mutacji *NANOS2* i *NANOS3*, powróciłam do przerwanej uprzednio analizy *NANOS1*, pomimo wyżej wspomnianych danych, iż *Nanos1* zdaje się być zbyt ważny dla płodności myszy. Zidentyfikowałam trzy typy mutacji genu *NANOS1* u pięciu spośród 195 badanych niepłodnych mężczyzn. Mutacje wystąpiły w formie heterozygotycznej u wszystkich pięciu pacjentów. Były to 1/ delecja trzech nukleotydów skutkująca delecją seryny w pozycji 78 współwystępująca na jednym allelu z wariantem sekwencji powodującym substytucję aminokwasową p.Pro34Thr [(p.Pro34Thr; Pro77_Ser78delinsPro)] u dwóch pacjentów z azoospermią, 2/ delecja kodonu alaniny p.Ala173del również u dwóch pacjentów z azoospermią oraz 3/ dwie substytucje współwystępujące na jednym allelu [(p.Arg246His; p.Arg276Tyr)] u pacjenta z ciężką postacią oligo-astheno-teratozoospermii (obniżona liczba plemników w nasieniu, przy czym plemniki cechują się nieprawidłową ruchliwością oraz morfologią). Żadna z mutacji zidentyfikowanych u niepłodnych nie była obecna w 400-osobowej grupie kontrolnej. Stąd wywnioskowałam, że są one zasocjowane z

odpowiednim fenotypem niepłodności, mianowicie mutacje zlokalizowane w N-końcowej części białka z azoospermią oraz całkowitym brakiem komórek linii płciowej w kanalikach plemnikotwórczych, podczas gdy mutacje w C-końcowej części z oligo-asthenoteratozoospermią. Analiza dziedziczenia ww. mutacji *NANOS1* wskazała na dominujący wzór dziedziczenia przy penetracji mutacji ograniczonej do płci męskiej, co jest spójne ze wzorem ekspresji *NANOS1* specyficznym dla komórek męskiej linii płciowej. W dalszych badaniach interesowało mnie szczególnie poszukiwanie wpływu wykrytych przeze mnie mutacji *NANOS1* na funkcjonowanie kodowanego przez ten gen białka. Udało mi się pokazać, że zmutowane białko *NANOS1* [(p.Pro34Thr; Pro77_Ser78delinsPro)] powoduje osłabienie oddziaływania *NANOS1*-*GEMIN3*. Powiązanie mutacji [(p.Pro34Thr; Pro77_Ser78delinsPro)] z brakiem komórek linii płciowej w jądrach oraz jej wpływ na osłabienie interakcji *NANOS1*-*GEMIN3* sugerują, że oddziaływanie *NANOS1*-*GEMIN3* może mieć istotne znaczenie dla zachowania linii męskich komórek rozrodczych. Zastanawiałam się dlaczego zmutowane białko miałyby warunkować niepłodność mężczyzn, skoro dysfunkcja białka mysiego nie miała wpływu na płodność. Moją uwagę zwróciło położenie seryny 78, bowiem znajduje się w regionie, który obecny jest jedynie w białku *NANOS1* człowieka a nie występuje u myszy. Nasuwa się przypuszczenie, że być może gen *NANOS1* zyskał funkcję w płodności podczas ewolucji ssaków, np. poprzez nabycie możliwości wiązania *GEMIN3* bowiem delecja seryny 78 wystąpiła w regionie białka *NANOS1* potrzebnym do interakcji z białkiem *GEMIN3*. Kolejna wykryta przez nas mutacja *NANOS1*, [(p.Arg246His; p.Arg276Tyr)] wystąpiła w silnie zachowanym C-końcu białka, zawierającym domenę palców cynkowych. Dzięki analizie modelowania homologicznego pokazaliśmy, że substytucja p.Arg246His może powodować obniżenie pozytywnego ładunku na powierzchni domeny palców cynkowych odpowiedzialnej za oddziaływanie z RNA. W sumie analiza mutacji genu *NANOS1* dostarczyła porcji oryginalnych wyników. Bowiem 1/ jako pierwsi pokazaliśmy związek pomiędzy mutacjami *NANOS1* a niepłodnością męską oraz 2/ jako pierwsi opisaliśmy mutacje specyficznego genu związane z Zespołem Samych Komórek Sertoligo [Kusz-Zamelczyk i wsp. 2013]. Dane uzyskane z analizy mutacji *NANOS1* zostały zamieszczone w bazie OMIM [OMIM: 608226, 615413, 258150]. Publikacja, w której opisaliśmy mutacje *NANOS1* została nagrodzona przez Polskie Towarzystwo Genetyczne jako najlepsza praca z zakresu genetyki człowieka wykonana przez polski zespół badawczy i opublikowana w 2013 roku. Przedstawiony projekt zaowocował uzyskaniem zmutowanych białek *NANOS* powiązanych z niepłodnością człowieka, które stanowią bardzo cenne narzędzia w prowadzonych przez nas badaniach podstawowych nad

potranskrypcyjną regulacją rozwoju komórek płciowych człowieka. Znaczenie tych narzędzi trudno przecenić.

Kusz K, Ginter-Matuszewska B, Ziółkowska K, Spik A, Bierła J, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, Pawelczyk L, Jaruzelska J. Polymorphisms of the human PUMILIO2 gene and male sterility. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74:795-799 (IF₂₀₀₇ **2,538**)

Kusz K, Tomczyk L, Sajek M, Spik A, Latos-Bieleńska A, Jędrzejczak P, Pawelczyk L, Jaruzelska J. The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and significance for the human male reproduction. *Molecular Human Reproduction* 2009; 15:165-171 (IF₂₀₀₉ **3,005**)

Kusz K, Tomczyk L, Spik A, Latos-Bieleńska A, Jędrzejczak P, Pawelczyk L, Jaruzelska J. NANOS3 gene mutations in men with isolated sterility phenotype. *Molecular Reproduction and Development* 2009; 76:804 (IF₂₀₀₉ **2,041**)

Kusz-Zamelczyk K, Sajek M, Spik A, Głazar R, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, Kotecki M, Pawelczyk L, Jaruzelska J. Mutations of NANOS1, a human homologue of the Drosophila morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *Journal of Medical Genetics* 2013; 50:187-193 (IF₂₀₁₃ **5,703**)

Kontynuacją a jednocześnie rozszerzeniem badań nad znaczeniem białek NANOS i PUMILIO w płodności jest obecnie mój projekt pt. „Badania potencjalnej roli białek NANOS w kontroli translacji funkcjonalnie powiązanych ze sobą mRNA, w ludzkich komórkach linii płciowej: poszukiwanie mechanizmu potranskrypcyjnych regulonów u ssaków”. Projekt ten ma na celu wyjaśnienie mechanizmu leżącego u podstaw odrębnych ról białek Nanos w rozwoju linii germinacyjnej ssaków w kontekście potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Uzyskał on niedawno finansowanie z Narodowego Centrum Nauki 2014/15/B/NZ1/03384 (2015-2018).

Literatura

1. Forbes A, Lehmann R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. *Development*. 1998 Feb;125(4):679-90
2. Galgano A, Forrer M, Jaskiewicz L, Kanitz A, Zavolan M, Gerber AP. Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS One*. 2008 Sep 8;3(9):e3164
3. Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan YM, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Georgescu AM, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Ho I, Huang W, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Larionov V, Leem SH, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Malfatti S, Martinez D, McCready P, Medina C, Morgan J, Nelson K, Nolan M, Ovcharenko I, Pitluck S, Pollard M, Popkie AP, Predki P, Quan G, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, She X, Smith D, Slezak T, Solovyev V, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wagner M, Wheeler J, Wu K, Xie G, Yang J, Dubchak I, Furey TS, DeJong P, Dickson M, Gordon D, Eichler EE, Pennacchio LA, Richardson P,

- Stubbs L, Rokhsar DS, Myers RM, Rubin EM, Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):529-35.
4. Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashid A, Kurokawa K, Saga Y. nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev*. 2003 Jun;120(6):721-31
 5. Hayashi Y, Hayashi M, Kobayashi S. Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10338-42
 6. Jaruzelska J, Kotecki M, Kusz K, Spik A, Firpo M, Reijo Pera RA. Conservation of a *Pumilio*-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Dev Genes Evol*. 2003 Apr;213(3):120-6
 7. Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamura T. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature*. 1996 Apr 25;380(6576):708-11
 8. Kraemer B, Crittenden S, Gallegos M, Moulder G, Barstead R, Kimble J, Wickens M. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 1999 Sep 23;9(18):1009-18
 9. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*. 2002 Mar 15;16(6):720-8
 10. Parvinen M. The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl*. 2005 Aug;28(4):189-201
 11. Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science*. 2009 Sep 11;325(5946):1394-8
 12. Sato K, Hayashi Y, Ninomiya Y, Shigenobu S, Arita K, Mukai M, Kobayashi S. Maternal Nanos represses hid/skl-dependent apoptosis to maintain the germ line in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7455-60
 13. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):292-9
 14. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA; Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16899-903.
 15. Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*. 2003 Aug 29;301(5637):1239-41
 16. Tsuda M, Kiso M, Saga Y. Implication of nanos2-3'UTR in the expression and function of nanos2. *Mech Dev*. 2006 Jun;123(6):440-9

17. Wang Z, Lin H. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2016-9

6. Inny kierunek prowadzonych badań niewchodzący w skład „osiągnięcia”

W ramach rozprawy doktorskiej wykonanej w Instytucie Genetyki Człowieka PAN pod kierunkiem prof. Jadwigi Jaruzelskiej próbowałam zbliżyć się do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za determinację płci człowieka, czyli kierowanie rozwojem zarodka w kierunku męskim lub żeńskim. Mechanizm determinacji płci jest skomplikowaną siecią oddziaływań różnych czynników kodowanych przez specyficzne geny, wśród których kluczowy jest gen *SRY* zlokalizowany na chromosomie Y. Uruchamia on kaskadę zdarzeń prowadzących do rozwoju jąder, co pociąga za sobą fenotyp męski. W przypadku braku genu *SRY* rozwijają się jajniki i fenotyp żeński. Nieprawidłowości determinacji i rozwoju płci zdarzają się dość często a w jednym przypadku na 4500 żywych urodzeń nadanie płci metrykalnej dziecku jest trudne ze względu na cechy obojnacze. Molekularne przyczyny większości przypadków wad determinacji płci pozostają niewyjaśnione. W mojej pracy próbowałam zrozumieć genetyczne podłoże niektórych przypadków tzw. odwrócenia płci czyli niezgodności płci fenotypowej z płcią kariotypową.

Jednym z wątków mojej rozprawy doktorskiej była próba odpowiedzi na pytanie: dlaczego niektórzy pacjenci o kariotypie żeńskim z fragmentem Yp zawierającym gen *SRY* (*SRY+*) translokowanym na chromosom X – t(X;Y) charakteryzowali się typowym fenotypem męskim, natomiast inni wykazywali cechy obojnacze a w skrajnych przypadkach nawet fenotyp odpowiadający hermafrodytyzmowi prawdziwemu (współwystępowanie tkanki jądra i jajnika u jednej osoby). Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* pod kierunkiem dr Aliny Wojdy pokazało, że cechy obojnacze u mężczyzn 46,XX (*SRY+*) występują wtedy, gdy gen *SRY* translokowany jest na nieaktywny chromosom X. Ponadto zaobserwowaliśmy, że dla fenotypu istotna jest również długość fragmentu chromosomu Y, wewnątrz którego *SRY* translokowany jest na nieaktywny chromosom X. Im fragment ten jest dłuższy, tym większe jest prawdopodobieństwo „zbuforowania” inaktywacji X i tym mniejsze ryzyko obniżenia ekspresji *SRY*, a w rezultacie wystąpienia cech obojnacznych [Kusz i wsp. 1999]. Po zakończeniu rozprawy doktorskiej kontynuowałam badania nad tym zagadnieniem w laboratorium Profesor Jaruzelskiej we współpracy z dr Andrew Sharpem z Salisbury Health Care HNS Trust Salisbury District Hospital w Wielkiej Brytanii. Wykazałam, że u pacjenta z hermafrodytyzmem prawdziwym chromosom X typu t(X;Y) odziedziczony był po matce. Z kolei dwaj inni pacjenci z hermafrodytyzmem prawdziwym odziedziczyli t(X;Y) po swoich

ojcach, lecz u obu ojców chromosom t(X;Y) współwystępował z prawidłowym chromosomem Y, co dowodzi, że każdy z ojców odziedziczył translokację po swojej matce. Pokazałam zatem, że w kontekście kariotypu 46,XX, chromosom X typu t(X;Y) zawierający gen *SRY* może w pewnych przypadkach powodować odwrócenie płci, w tym hermafrodytyzm prawdziwy, podczas gdy w innych związany jest z prawidłowym fenotypem żeńskim. Takich przypadków płodnych kobiet, będących nosicielkami chromosomu t(X;Y) zawierającego gen *SRY* wcześniej nie opisano. Sądzymy, że czynnikiem decydującym o rozwoju fenotypu płci może być status inaktywacji chromosomu t(X;Y).

Innym wątkiem badań determinacji płci było poszukiwanie genetycznego podłoża przypadków dysgenезji gonad 46,XY charakteryzujących się żeńskim fenotypem w kontekście kariotypu męskiego. Już wcześniej wiadomo było, że mutacje punktowe zlokalizowane w otwartej ramie odczytu genu *SRY* są przyczyną tylko 10% przypadków dysgenезji gonad 46,XY. Wyjaśnienie genetycznych przyczyn pozostałych 90% przypadków rzuciłoby światło na mechanizm determinacji płci. Poza analizą mutacji otwartej ramy odczytu *SRY* poszukiwałam mutacji w regionie flankującym 5' tego genu, biorąc pod uwagę obecność w tym regionie kilku potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych specyficznych dla gonady męskiej. W ramach współpracy z dr Davidem Zarkowerem z University of Minnesota badania nad podłożem dysgenезji gonad 46,XY rozszerzyliśmy o kolejne geny. Okazało się, że jedną z przyczyn tego zaburzenia rozwoju płciowego może być dysfunkcja genów *DMRT1* i *DMRT2* na krótkim ramieniu chromosomu 9, bowiem delecja tych genów została wykryta u dwóch pacjentek dr Zarkowera [Raymond i wsp. 1999]. Mój udział w tej pracy polegał na poszukiwaniu mutacji punktowych genów *DMRT1* i *DMRT2* u polskich pacjentek z dysgenезją gonad 46,XY, u których wcześniej wykluczyłam mutację *SRY*.

Pomimo ogromnego postępu w zrozumieniu mechanizmu kierującego determinacją płci, który nastąpił w ostatnich latach dzięki zidentyfikowaniu wielu genów kluczowych dla rozwoju jąder lub jajników, podłoże molekularne zaburzeń determinacji płci jest znane tylko u 20% pacjentów. To sugeruje zaangażowanie innych genów, których udział w determinacji płci nie był dotąd jeszcze badany. Obecnie uczestniczę w projekcie Szwajcarsko-Polsko-Ukraińsko-Armeńskim SCOPES finansowanym przez Swiss National Science Foundation, który ma na celu identyfikację nowych mutacji zasocjowanych z nieprawidłowościami determinacji płci poprzez sekwencjonowanie całych eksomów oraz zastosowanie mikromacierzy.

Kusz K, Kotecki M, Wojda A, Szarras-Czapnik M, Latos-Bieleńska A, Warenik-Szymankiewicz A, Rusczyńska-Wolska A, Jaruzelska J. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. *Journal of Medical Genetics* 1999; 36:452-456 (IF₁₉₉₉ 2,986)

Sharp A, **Kusz K**, Jaruzelska J, Tapper W, Szarras-Czapnik M, Wolski J, Jacobs P. Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: the influence of spreading X inactivation versus position effects. *Journal of Medical Genetics* 2005; 42:420-427 (IF₂₀₀₅ 4,330)

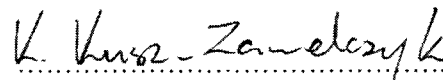
Sharp A, **Kusz K**, Jaruzelska J, Szarras-Czapnik M, Wolski J, Jacobs P. Familial X/Y translocations associated with variable sexual phenotype. *Journal of Medical Genetics* 2004; 41:440-444 (IF₂₀₀₄ 4,112)

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, **Kusz K**, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics* 1999; 8:989-996 (IF₁₉₉₉ 9,395)

Kusz K, Kotecki M, Jaruzelska J. Molekularne badania zaburzeń rozwoju płciowego: klucz do zrozumienia genetycznego mechanizmu determinacji płci. *Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 119-128

Kusz K, Chłystun M, Jaruzelska J. Kobieta czy mężczyzna? Molekularny mechanizm determinacji płci Rozdział w książce *Na pograniczu chemii i biologii* Wydawnictwo UAM Poznań, 1999, 81-89

Poznań, 21 września 2015


.....
dr Kamila Kusz-Zamelczyk