

AUTOREFERAT

dr Maciej Giefing

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Poznań 2013

SPIS TREŚCI

1. Dane wnioskodawcy.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4-5
4. Dorobek naukowy	5
5. Cykl prac stanowiący szczególne osiągnięcie naukowe	6-7
6. Omówienie cyklu prac stanowiącego szczególne osiągnięcie naukowe	7-16
7. Piśmiennictwo	17-19

1) Dane wnioskodawcy

Maciej Giefing

ur. 17.04.1979 w Poznaniu

zam. ul. Żuromińska 11; 60-461 Poznań

tel.: 600 420 390

e-mail: giefingm@man.poznan.pl

2) Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem rozprawy doktorskiej

- Tytuł **licencjata biotechnologii**
(Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, rok 2002)
- Tytuł **magistra biotechnologii**
(Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, rok 2004)
- Tytuł **doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna**
(Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, rok 2008)

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Molekularna charakterystyka uszkodzeń chromosomów w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina oraz płaskonabłonkowego raka krtani.”

Promotorzy:

- **Prof. Dr. med. Reiner Siebert** (Instytut Genetyki Człowieka, Klinika Uniwersytecka, Uniwersytet Chrystiana-Albrechta w Kilonii / Niemcy)
- **Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter** (Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu)

3) Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w latach 2004 – 2008 na stanowisku biologa.

W Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu zostałem zatrudniony krótko przed obroną pracy magisterskiej na temat podłoża molekularnego płaskonabłonkowego raka krtani. Następnie prowadziłem badania dotyczące genetyki tego nowotworu.

- Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu - od roku 2008, na stanowisku adiunkta.

Moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół genetyki płaskonabłonkowego raka krtani oraz klasycznego chłoniaka Hodgkina.

Podejmowałem także pracę za granicą:

- Instytut Genetyki Człowieka, Klinika Uniwersytecka, Uniwersytet Chrystiana-Albrechta w Kilonii / Niemcy (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) - w roku 2005 (6 miesięcy), na stanowisku doktoranta.

W trakcie pobytu zagranicznego finansowanego poprzez stypendium fundacji FEBS (Federation of European Biochemical Societies) - Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe przeprowadziłem część badań, które weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej.

- Instytut Genetyki Człowieka, Klinika Uniwersytecka, Uniwersytet Chrystiana-Albrechta w Kilonii / Niemcy (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) - w roku 2007 (2 miesiące), na stanowisku doktoranta.

W trakcie pobytu zagranicznego kontynuowałem badania, które weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej.

- Instytut Genetyki Człowieka, Klinika Uniwersytecka, Uniwersytet Chrystiana-Albrechta w Kilonii / Niemcy (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) - w latach 2009 - 2012 (36 miesięcy), na stanowisku „post-doc”.

Pobyt finansowany poprzez stypendium fundacji FEBS (Federation of European Biochemical Societies) - Long-Term Fellowship (pierwszy rok) oraz z programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o nazwie „Wsparcie Międzynarodowej Mobilności Naukowców”(drugi i trzeci rok). Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się głównie wokół genetyki klasycznego chłoniaka Hodgkina. Wybór goszczącego instytutu nie był przypadkowy, gdyż Instytut Genetyki Człowieka w Kilonii jest jedną z najbardziej renomowanych placówek zajmujących się biologią tego chłoniaka na świecie.

4) Dorobek naukowy

Jestem autorem 34 prac naukowych w skład których wchodzi:

- 21 prac oryginalnych (wszystkie posiadają Impact Factor)
- 10 prac przeglądowych (w tym 2 posiadające Impact Factor)
- 2 monografie (nie posiadające Impact Factor)
- 1 praca będąca polskojęzycznym streszczeniem rozprawy doktorskiej (nie posiadająca Impact Factor)

Dane bibliometryczne (z dnia 27.01.2014)

- sumaryczny Impact Factor: 118,772 (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji)
- indeks H: 10
- liczba cytowań według bazy Web of Science: 352
- łączny Impact Factor cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe: 19,194 (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji).

Jestem także autorem 8 doniesień zjazdowych ustnych oraz 10 doniesień zjazdowych plakatowych prezentowanych na kongresach polskich i międzynarodowych.

Szczegółowa charakterystyka wszystkich osiągnięć naukowych zawarta jest w dokumencie „Osiągnięcia dydaktyczne oraz naukowo badawcze”.

5) Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (w/g artykułu 16.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) zebranych pod zbiorczym tytułem: „Identyfikacja genów powiązanych z patogenezą klasycznego chłoniaka Hodgkina”

1. **Giefing M***, Winoto-Morbach S*, Sosna J, Döring C, Klapper W, Küppers R, Böttcher S, Adam D, Siebert R, Schütze S.

Hodgkin-Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma show alterations of genes encoding the NADPH oxidase complex and impaired reactive oxygen species synthesis capacity.

Plos One 2013; 8:e84928. **(IF 3,73)**

* obaj autorzy przyczynili się w równym stopniu do powstania pracy

Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 35%.

2. **Giefing M**, Siebert R.

FISH and FICTION to detect chromosomal aberrations in lymphomas.

Methods in Molecular Biology 2013; 971:227-44.

Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 90%.

3. Overbeck BM, Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Klapper W, Siebert R, **Giefing M***.

ETSI encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and downregulated in classical Hodgkin lymphoma.

Haematologica 2012; 97:1612-4. **(IF 6,532)**

* autor senioralny

Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 60%.

4. Otto C*, **Giefing M***, Massow A, Vater I, Gesk S, Schlesner M, Richter J, Klapper W, Hansmann ML, Siebert R and Küppers R.

Genetic lesions of the *TRAF3* and *MAP3K14* genes in classical Hodgkin lymphoma.

British Journal of Haematology 2012; 157:702-8. **(IF 4,942)**

* obaj autorzy przyczynili się w równym stopniu do powstania pracy

Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 35%.

5. Schmidt A, Schmitz R, **Giefing M**, Martin-Subero JI, Gesk S, Vater I, Massow A, Maggio E, Schneider M, Hansmann ML, Siebert R and Küppers R.

Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2010; 49:803-809. **(IF 3,99)**

Mój wkład w powstanie pracy szacuję na 25%.

6) Omówienie prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe

Choroby nowotworowe są opisywane jako choroby genów. Według teorii dwóch zdarzeń, sformułowanej w latach 70tych XX wieku przez Alfreda Knudsona i uważanej obecnie za klasyczną, u podstaw kancerogenezy leży uszkodzenie obu alleli genu supresji nowotworowej (ang. *Two hit*) [1]. Teoria ta została następnie rozwinięta - do inaktywacji genów supresorowych, których funkcja utożsamiana jest z hamowaniem procesu nowotworzenia - dodano patogenną aktywację onkogenu, skutkującą wzmożoną proliferacją zmutowanej komórki. Przedstawiony model, choć jest sporym uproszczeniem, trafnie oddaje naturę uszkodzeń genetycznych niezbędnych do rozpoczęcia procesu kancerogenezy.

Badania podstawowe dotyczące genetyki nowotworów skupiają się na poszukiwaniu genów, których uszkodzenia powiązane są z procesem nowotworzenia. Badania te mają na celu opis funkcji kodowanych przez dane geny białek w komórce zdrowej oraz neoplastycznej, a także - w szerszym ujęciu - charakterystykę sieci powiązań uszkodzonych genów / białek. W ten sposób próbuje się w pełni opisać deregulowane szlaki sygnałowe istotne dla rozwoju choroby nowotworowej. Nadrzędnym celem tego typu badań, prócz aspektu stricte poznawczego jest wprowadzenie do codziennej praktyki lekarskiej zindywidualizowanej terapii nowotworów, gdzie leczenie byłoby dobierane na podstawie profilu zmian genetycznych nowotworu u danego pacjenta. Podane leki działałyby na wybrane geny lub kodowane przez nie białka, niwelując ich patogenną funkcję (onkogeny) lub wznowiając / zastępując ich działanie (geny supresji nowotworowej) i tym samym przywracając prawidłowe funkcjonowanie zmienionego szlaku sygnałowego.

Dobrze ugruntowanym podejściem badawczym mającym na celu identyfikację genów powiązanych z patogenezą nowotworów jest określanie minimalnych regionów chromosomowych, w których występują powtarzające się delecje lub amplifikacje (ang. *Minimal Altered Region*). Podejście to bazuje na założeniu, że delecje i amplifikacje są mechanizmami prowadzącymi odpowiednio do utraty genów supresorowych oraz aktywacji

onkogenów i stąd rozmieszczenie tego typu zmian w genomie nie będzie przypadkowe. Oczekuje się powtarzalnego występowania tych aberracji w regionach chromosomowych, w których zlokalizowane są geny powiązane z procesem nowotworzenia. W tym celu, historycznie analizowano dziesiątki przypadków danego nowotworu, porównując zakres aberracji na danym chromosomie i maksymalnie go zawężając identyfikowano geny będące kandydatami na geny supresji nowotworowej (delecje) lub onkogeny (amplifikacje). Identyfikacja pojedynczych genów powiązanych z procesem nowotworzenia była jednak utrudniona ze względu na niską rozdzielczość technik stosowanych do analizy genomu. Badania prowadzone techniką cytogenetyki klasycznej czy CGH (ang. *Comparative Genomic Hybridization*) umożliwiały zawężenie regionu z powtarzalnymi aberracjami do wielkości kilku milionów par zasad, w których często zlokalizowanych było nawet kilkadziesiąt genów. Stąd identyfikacja jednego bądź kilku genów docelowych (ang. *Target Genes*) była niemożliwa, a w najlepszym przypadku wymagała dodatkowych, żmudnych i kosztownych badań.

Wraz z wprowadzeniem wysokorozdzielczych technik do badania genomu, takich jak array-CGH czy obecnie coraz bardziej popularnych mikromacierzy typu SNP, po raz pierwszy stało się możliwe wykrywanie mikroaberracji, w obrębie których znajdować może się zaledwie pojedynczy gen. W minionych latach obserwuje się bezprecedensowy wzrost rozdzielczości dostępnych mikromacierzy do badania genomu człowieka. W pierwszej dekadzie XXI wieku w większości publikacji z genetyki nowotworów donoszono o wykorzystaniu mikromacierzy, zbudowanych z 20-250 tysięcy sond (ang. *Tag*), natomiast w chwili obecnej powszechnie wykorzystuje się mikromacierze zbudowane z ponad 2 milionów sond. Daje to w uproszczeniu możliwość wykrycia aberracji, których rozmiar przekracza już 2 tysiące par zasad, a więc zdecydowanie poniżej rozmiaru większości genów.

W przypadku genów supresji nowotworowej wyjątkowo pomocna okazała się analiza delecji homozygotycznych, w przypadku których utracie ulegają zarówno allel pochodzenia matczynego, jak i ojcowskiego. Tego typu aberracja całkowicie pozbawia komórkę kodowanego przez dany gen białka. Ponadto, obserwowane zazwyczaj względnie małe rozmiary delecji homozygotycznych zdecydowanie ułatwiają identyfikację genów docelowych. Również w oparciu o zasadę prawdopodobieństwa, obecność delecji homozygotycznej, a więc powtarzającej się delecji obu alleli danego genu w danym typie nowotworu, jest dodatkową przesłanką świadczącą, że zmiany te nie powstały przypadkowo, a są sprawczo powiązane z rozwojem danego raka.

Tym samym, wprowadzenie do badań wysokorozdzielczych mikromacierzy do określania zmian liczby kopii DNA, a także innych, np. do pomiaru ekspresji genów czy ich metylacji, stanowiło znaczny przełom i umożliwiło szybką identyfikację potencjalnych genów supresji nowotworowej i onkogenów.

Badania prowadzone przeze mnie, a w szczególności prace przedstawione pod zbiorczym tytułem **„Identyfikacja genów powiązanych z patogenezą klasycznego chłoniaka Hodgkina”**, stanowiące szczególne osiągnięcie naukowe wpisują się w nurt badań opisanych powyżej. **Celem tych prac była identyfikacja genów, których aktywacja lub inaktywacja przyczynia się do powstawania klasycznego chłoniaka Hodgkina oraz określenie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za ich dysfunkcję.**

Prowadzone przez mnie badania mają charakter międzynarodowy i są umiejscowione zarówno w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, gdzie obecnie pracuję, jak również w Instytucie Genetyki Człowieka Uniwersytetu Chrystiana Albrechta w Kilonii w Niemczech. W instytucie niemieckim (w trakcie kilku krótszych pobytów w latach 2005-2008) wykonałem część badań do przygotowywanej wówczas rozprawy doktorskiej. Stąd też, ze względu na chęć kontynuowania podjętych uprzednio badań po uzyskaniu stopnia doktora spędziłem tu trzy kolejne lata (2009-2012) jako stypendysta fundacji FEBS - Long-Term Fellowship oraz programu MNiSW „Wsparcie Międzynarodowej Mobilności Naukowców”. Chciałbym podkreślić, że instytut kiloński jest jedną z najbardziej renomowanych placówek na świecie zajmujących się biologią chłoniaków, w tym klasycznego chłoniaka Hodgkina i zasłynął między innymi stosowaną przez szereg lat Kilońską Klasyfikacją Chłoniaków. W Kilonii miałem możliwość współpracy z najwybitniejszymi specjalistami zajmującymi się genetyką klasycznego chłoniaka Hodgkina, takimi jak prof. Ralf Küppers, prof. Reiner Siebert czy dr Stephan Mathas współpracujący w ramach *German Hodgkin Study Group*.

Równocześnie, pomimo kilkuletniego pobytu zagranicznego, kontynuowałem współpracę naukową z macierzystą jednostką w Poznaniu, z zakładem kierowanym przez prof. Krzysztofa Szyftera, wykorzystując wiedzę zdobytą za granicą. Efektem tych prac są liczne publikacje dotyczące podłoża molekularnego patogenezы płaskonabłonkowego raka krtani, których jednak - dla utrzymania maksymalnej spójności tematycznej cyklu - nie zdecydowałem się włączyć do wykazu publikacji stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe.

W przedstawionym cyklu prac stanowiącym szczególne osiągnięcie naukowe punktem wyjścia była analiza genomu linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina przy użyciu wysokorozdzielczych mikromacierzy. Były to mikromacierze typu array-CGH oraz

SNP umożliwiające analizę zmian liczby kopii DNA, jak również mikromacierze do badania globalnej ekspresji genów w analizowanym genomie. Ponadto wykorzystano nowatorską mikromacierz do badania poziomu metylacji regionów promotorowych genów potencjalnie związanych z patogenezą klasycznego chłoniaka Hodgkina.

W pracy z 2010 roku zatytułowanej **“Rare occurrence of biallelic *CYLD* gene mutations in classical Hodgkin lymphoma”** oraz pracy z 2012 roku zatytułowanej **„Genetic lesions of the *TRAF3* and *MAP3K14* genes in classical Hodgkin lymphoma”** podjęto problem alternatywnych mechanizmów prowadzących do hiperaktywacji szlaku sygnałowego NFκB w klasycznym chłoniaku Hodgkina. Hiperaktywacja szlaku sygnałowego NFκB jest cechą charakterystyczną tego chłoniaka [2,3]. Jest to zarazem kluczowy mechanizm niezbędny dla przeżycia komórek neoplastycznych klasycznego chłoniaka Hodgkina, zwanych komórkami Hodgkina i Reed-Sternberga (HRS). Hiperaktywacja NFκB może być spowodowana wieloma czynnikami. Do najczęstszych zaliczyć można amplifikację regionu chromosomowego 2p16.1, gdzie znajduje się gen kodujący podjednostkę NFκB – *REL*, infekcję wirusem EBV a także mutacje inaktywujące inhibitory szlaku NFκB, takie jak *NFκBIA*, *NFκBIE* czy *TNFAIP3* [4]. Znane są jednak przypadki klasycznego chłoniaka Hodgkina, w których pomimo braku wyżej wymienionych zmian dochodzi do nadmiernej aktywności NFκB, stąd przypuszcza się, że rolę odgrywają tu także inne, rzadsze i dotychczas niepoznane mechanizmy patologii molekularnej.

W omawianych pracach przeprowadzono analizę przy użyciu mikromacierzy Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 genomu siedmiu linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina (L428, HDLM2, KMH2, L1236, SUPHD1, UHO1, L540), dzięki której zwrócono uwagę na aberracje chromosomowe w obrębie trzech genów powiązanych ze szlakiem sygnałowym NFκB. Były to delecje genów *CYLD* i *TRAF3* oraz przyrost materiału genetycznego w obrębie genu *MAP3K14*. W celu zbadania czy obserwowane zmiany nie są jedynie artefaktem analizowanych linii komórkowych badania uzupełniono o analizę zmian liczby kopii DNA w przypadkach pierwotnych klasycznego chłoniaka Hodgkina techniką FICTION (połączenie immunofluorescencji z hybrydyzacją *in situ*). Ponadto geny były sekwencjonowane z wykorzystaniem DNA z komórek HRS (geny *CYLD* oraz *TRAF3*) po mikrodysekcji laserowej.

Badanie wykazało całkowitą inaktywację genu *CYLD* w jednej z badanych linii komórkowych (KMH2) oraz delecję heterozygotyczną *CYLD* w kolejnej (HDLM2). Ponadto delecje w obrębie locus *CYLD* obserwowano także w 10/29 (35%) badanych przypadków pierwotnych, w tym w jednym z nich zaobserwowano delecję homozygotyczną w części

badanych komórek HRS. Gen *CYLD* koduje proteazę o aktywności endodeubikwitynazy pełniącą funkcję inhibitora dla czynnika transkrypcyjnego NFκB poprzez blokowanie jego przemieszczenia się do jądra komórkowego [5]. W tym kontekście, zidentyfikowane delecje mogą świadczyć o funkcjonowaniu *CYLD* jako genu supresji nowotworowej w klasycznym chłoniaku Hodgkina.

Z kolei białko kodowane przez gen *TRAF3* jest również regulatorem NFκB. Pełni ono funkcję w przekazywaniu sygnałów z receptorów z rodziny TNFR (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor*) do wnętrza komórki. Uważa się, że białko kodowane przez *TRAF3* może mieć wpływ zarówno na podstawowy szlak aktywacji NFκB poprzez TNFR a także może hamować alternatywny szlak aktywacji poprzez inhibicję kinazy MAP3K14 i w ten sposób pełnić funkcję supresorową [6]. Kinaza MAP3K14 działa natomiast poprzez fosforylację podjednostki NFκB p100 i jest uważana za główny aktywator szlaku alternatywnego o działaniu onkogennym [7].

Zgodnie z postawioną hipotezą, badanie wykazało delecję homozygotyczną genu *TRAF3* w jednej oraz przyrost liczby kopii DNA dla genu *MAP3K14* w trzech badanych liniach komórkowych. Sekwencjonowanie genu *TRAF3* nie zaowocowało wykryciem dodatkowych zmian mogących odpowiadać za jego inaktywację, jednak analiza zmian liczby kopii DNA wykazała utratę jednego allelu genu *TRAF3* w 3/20 analizowanych przypadków pierwotnych klasycznego chłoniaka Hodgkina oraz przyrost kopii genu *MAP3K14* w 5/16 przypadkach. Ponadto, wykorzystując wstępne wyniki sekwencjonowania następnej generacji jednej z linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina, zidentyfikowano oraz dokładnie scharakteryzowano duplikację jako mechanizm skutkujący przyrostem liczby kopii genu *MAP3K14*.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację trzech kolejnych genów, których uszkodzenia potencjalnie przyczyniają się do hiperaktywacji szlaku sygnałowego NFκB. Wyniki te tym samym znacznie wzbogacają wiedzę na temat patologii molekularnej leżącej u podstaw klasycznego chłoniaka Hodgkina.

W pracy zatytułowanej **“ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and downregulated in classical Hodgkin lymphoma”** posłużyliśmy się danymi opublikowanymi wcześniej z moim współautorstwem na łamach *Leukemia* [8]. Dane te zawierają profile metylacji ponad czterdzieści tysięcy genów w genomach linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina, otrzymane przy użyciu mikromacierzy Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina). W cytowanej pracy zawarta jest między innymi lista 209 genów, których hipermetylacja została zidentyfikowana

wyłącznie w klasycznym chłoniaku Hodgkina, natomiast nie w liniach komórkowych innych chłoniaków ani w kontrolach nienowotworowych.

Tak duża liczba genów inaktywowanych poprzez procesy epigenetyczne w klasycznym chłoniaku Hodgkina jest zastanawiająca szczególnie w kontekście zjawiska zwanego w literaturze anglojęzycznej „Loss of B-cell identity”. Neoplastyczne komórki chłoniaka Hodgkina choć wywodzą się z limfocytów typu B (bardzo rzadko także z limfocytów typu T) tracą cechy typowe dla tych komórek [9]. Dotyczy to zarówno cech morfologicznych – komórki HRS znacznie przewyższają rozmiarem limfocyty oraz posiadają dwa lub kilka jąder komórkowych, jak i utraty szeregu markerów powierzchniowych. Są to typowe dla limfocytów typu B markery BCR, CD19, CD20, CD21, CD45. Zamiast nich, w komórkach HRS ekspresji ulegają markery powierzchniowe, takie jak CD15, CD30 czy CD40 a także geny, których ekspresja jest typowa dla innych typów komórek z tym *CSFR1* czy *NOTCH1* [10,11]. Charakterystyczny jest również fakt utraty szeregu czynników transkrypcyjnych w tym EBF1, E12, E2A warunkujących prawidłowy rozwój limfocytów typu B [12,13]. Obecnie podejrzewa się, że „Loss of B-cell identity” nie jest jedynie skutkiem ubocznym licznych aberracji chromosomowych obserwowanych w genomie tego chłoniaka lecz swoistą strategią przeżycia. Komórki HRS tracąc cechy limfocytów, z których się wywodzą, miałyby zwodzić układ immunologiczny gospodarza i unikać apoptozy jeszcze w obrębie centr rozrodczych grudek limfatycznych.

Słabo poznane pozostają ciągle przyczyny obserwowanego przeprogramowania komórek HRS. Jednak globalny zakres obserwowanych zmian sugeruje, że znaczną rolę mogą odgrywać w nim zmiany epigenetyczne. Wykazano bowiem, że metylacja genów, a co za tym idzie ich wyciszenie, może następować także wtórnie na skutek utraty regulującego dane geny czynnika transkrypcyjnego położonego up-stream [14]. Stąd w ramach omawianej pracy zdecydowano się przeprowadzić analizę bioinformatyczną 209 genów hipermetylowanych wyłącznie w klasycznym chłoniaku Hodgkina, w celu sprawdzenia czy geny te są istotnie statystycznie wzbogacone w miejsca wiązania znanych czynników transkrypcyjnych. W wyniku analizy zidentyfikowano grupę czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój limfocytów typu B, między innymi EBF1, E12 a także ETS1. Postawiliśmy więc hipotezę, że hipermetylacja owych 209 genów i w konsekwencji ich wyciszenie jest wtórna i została spowodowana wcześniejszą utratą wymienionych czynników transkrypcyjnych up-stream. W konsekwencji utrata czynników transkrypcyjnych powinna przyczyniać się do zjawiska „Loss of B-cell identity”, a tym samym do patogenezy klasycznego chłoniaka Hodgkina.

Istotnym argumentem za przedstawioną hipotezą jest opisana już w literaturze utrata / uszkodzenie szeregu czynników transkrypcyjnych takich jak EBF1, E12, E2A w przebiegu klasycznego chłoniaka Hodgkina [12,13]. Jak dotąd nie łączono jednak czynnika transkrypcyjnego ETS1 z tym chłoniakiem. Stąd w ramach omawianej pracy przeprowadziliśmy szereg eksperymentów mających na celu identyfikację potencjalnych uszkodzeń genu *ETS1* w przypadkach tego chłoniaka. Przeprowadzone badania były zaplanowane w taki sposób, aby zidentyfikować ewentualne uszkodzenia *ETS1* na poziomie genu poprzez analizę mutacyjną, na poziomie chromosomu poprzez analizę zmian liczby kopii DNA oraz na poziomie ekspresji zarówno mRNA jak i białka poprzez analizę mikromacierzową i immunohistochemię.

Dzięki przeprowadzonym analizom wykazano nie tylko utratę ekspresji ETS1 w klasycznym chłoniaku Hodgkina lecz określono także najczęstszy mechanizm patologii molekularnej. Zidentyfikowaliśmy bowiem częste delecje heterozygotyczne i homozygotyczne wskazujące właśnie na delecje jako mechanizm odpowiedzialny za zanik ekspresji. Nasza praca jest pierwszym doniesieniem wskazującym na ETS1 jako czynnik transkrypcyjny, którego utrata przyczynia się do zaniku cech typowych dla limfocytów typu B w klasycznym chłoniaku Hodgkina, a tym samym do przeżycia komórek HRS i patogenezы tego chłoniaka.

Jestem również autorem pracy metodologicznej zatytułowanej „**FISH and FICTION to detect chromosomal aberrations in lymphomas**” dotyczącej zastosowania technik opartych na hybrydyzacji *in situ* w badaniach chłoniaków. Praca zawiera szczegółowe protokoły wraz z informacjami dotyczącymi poszczególnych sond fluorescencyjnych stosowanych w badaniach chłoniaków. Ponadto, zawarliśmy w niej protokół techniki Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation Of Neoplasia (FICTION) pierwotnie rozwiniętej w Instytucie Genetyki Człowieka w Kilonii w Niemczech [15]. Łączy ona w sobie immunofenotypowanie z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych na marker powierzchniowy obecny specyficznie na powierzchni komórek nowotworowych z techniką FISH, dzięki której możliwa jest ocena zmian liczby kopii danego locus genomowego. FICTION umożliwia zatem precyzyjną analizę wybranego locus praktycznie w pojedynczych komórkach nowotworowych.

Jest to szczególnie istotne w przypadku badań prowadzonych nad klasycznym chłoniakiem Hodgkina, gdyż udział procentowy komórek HRS w zajęтым węzle chłonnym w przypadku tej choroby nie przekracza zazwyczaj 1% [2]. Nie jest więc możliwe podejście praktykowane w przypadku guzów litych, gdzie z tkanki nowotworowej po wstępnej ocenie patologicznej

izolowany jest DNA, a w otrzymanej próbie udział DNA z komórek nowotworowych przekracza nierzadko 90%. Stąd też, analiza materiału pierwotnego klasycznego chłoniaka Hodgkina jest możliwa jedynie poprzez czasochłonną i kosztowną mikrodysekcję laserową. Przedstawiony protokół techniki FICTION jest alternatywą zarazem tańszą, a także nie wymagającą kosztownego sprzętu. Praca ta zawiera ponadto szereg praktycznych wskazówek mających na celu ułatwienie wdrożenia tej techniki w laboratorium.

Ostatnia praca z omawianego cyklu, zatytułowana **“Hodgkin-Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma show alterations of genes encoding the NADPH oxidase complex and impaired reactive oxygen species synthesis capacity”** dotyczy zagadnienia zaburzeń w homeostazie reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species – ROS*) w komórkach HRS. Pierwotnie reaktywnym formom tlenu w oparciu o ich powszechnie znany potencjał do generowania uszkodzeń DNA przypisywano jedynie funkcje negatywne. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórce poza mitochondrium są enzymy zlokalizowane w błonie komórkowej, takie jak oksydaza NADPH [16]. Enzym ten został zidentyfikowany pierwotnie u fagocytów, gdzie pełni istotną rolę w obronie organizmu gospodarza przed mikroorganizmami. Podczas procesu zwanego wybuchem tlenowym (ang. *oxidative burst*) oksydaza NADPH wytwarza duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego przekształcanego w nadtlenek wodoru o właściwościach bakteriobójczych [16]. Stąd pogląd o wyłącznie toksycznym działaniu reaktywnych form tlenu na komórkę był w świetle ówczesnej wiedzy uzasadniony.

Obecnie wiadomo jednak, że aktywna oksydaza NADPH jest obecna również w błonach komórkowych innych typów komórek, w tym również limfocytów typu B [17,18]. Przyjmuje się, że syntezowane w tym przypadku reaktywne formy tlenu w przeciwieństwie do ich funkcji w fagocytach działają jako cząsteczki sygnałowe i pełnią istotną rolę w szeregu szlaków sygnałowych, takich jak apoptoza czy różnicowanie. Stąd też, zakłada się że zakłócenie homeostazy reaktywnych form tlenu w komórce może przyczynić się do nieprawidłowego funkcjonowania powyższych szlaków sygnałowych i tym samym przyczyniać się do patogenezy nowotworów.

Bezpośrednią przesłanką do podjęcia badań nad oksydazą NADPH w klasycznym chłoniaku Hodgkina była identyfikacja delecji homozygotycznej genu *CYBB* w jednej z linii komórkowych tego nowotworu. Delecję homozygotyczną zidentyfikowaliśmy dzięki zastosowaniu mikromacierzy array-CGH w badaniach prowadzonych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej [19]. Oksydaza NADPH jest kompleksem, w skład którego wchodzi pięć podstawowych białek kodowanych przez następujące geny: *CYBA* (p22-phox), *CYBB* (gp91-

phox), *NCF1* (p47-phox), *NCF2* (p67-phox), *NCF4* (p40-phox) [20]. Co istotne, analizując biologię przewlekłej choroby ziarniniakowej (ang. *Chronic Granulomatous Disease*) charakteryzującej się obecnością uszkodzonej oksydazy NADPH na skutek mutacji jednego z wyżej wymienionych genów widać, że niezależnie od tego, który z genów uległ mutacji, obraz kliniczny choroby pozostaje taki sam [21,22]. Stąd zakłada się, że wszystkie z owych pięciu genów (białek przez nie kodowanych) są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania oksydazy NADPH. Tym samym, zidentyfikowana delecja homozygotyczna genu *CYBB* w linii komórkowej klasycznego chłoniaka Hodgkina będzie skutkować dysfunkcją omawianej oksydazy.

W celu analizy ekspresji pozostałych genów kodujących oksydazę NADPH wykorzystano opublikowane profile ekspresji linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina, otrzymane dzięki wykorzystaniu mikromacierzy U95 (Affymetrix) [23]. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały całkowity brak ekspresji genów *CYBA*, *CYBB* oraz *NCF1* w badanych liniach komórkowych w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, którą stanowiły limfocyty typu B na różnych etapach rozwoju. W ramach omawianej pracy przeprowadzono następnie szereg analiz linii komórkowych klasycznego chłoniaka Hodgkina mających na celu identyfikację mechanizmów odpowiadających za obserwowany zanik ekspresji badanych genów. Wykorzystano wyniki otrzymane dzięki badaniu przy użyciu mikromacierzy SNP 6.0, dotyczące zmian liczby kopii DNA oraz mikromacierzy do badań poziomu metylacji genów (Infinium 27K Bead array) [8]. Ponadto przeprowadzono celowaną analizę FICTION genu *CYBB* w materiale pierwotnym z węzłów chłonnych pacjentów, u których zdiagnozowano klasyczny chłoniak Hodgkina. Analizy te pozwoliły na identyfikację częstych delecji a także obecność hipermetylacji badanych genów w klasycznym chłoniaku Hodgkina odpowiednio w materiale pierwotnym jak i liniach komórkowych. Ponadto wykazano, że różne mechanizmy inaktywujące geny współwystępują w analizowanych liniach komórkowych, co podkreśla znaczenie inaktywacji oksydazy NADPH dla patogenezy tego chłoniaka. Również badanie ekspresji białek, odpowiednio *CYBB* poprzez analizę immunohistochemiczną oraz *NCF1* poprzez badanie Western blot, wykazało ich obniżony poziom lub wręcz całkowitą utratę w komórkach HRS, potwierdzając hipotezę o uszkodzeniu oksydazy NADPH w klasycznym chłoniaku Hodgkina.

W ramach omawianej pracy przeprowadzono także analizy funkcjonalne oksydazy NADPH. W tym celu linie komórkowe klasycznego chłoniaka Hodgkina oraz wykorzystane jako kontrole linie komórkowe chłoniaków nieziarnicznych podzielono na trzy grupy, w zależności od obecności markera CD30 na powierzchni komórek danej linii. Grupę badaną stanowiły

silnie CD30 pozytywne linie komórkowe klasycznego chłoniaka Hodgkina, kontrolę pozytywną stanowiły CD30 pozytywne linie komórkowe chłoniaków nieziarniczych a kontrolę negatywną stanowiły CD30 ujemne linie komórkowe chłoniaków nieziarniczych. Produkcję reaktywnych form tlenu indukowano poprzez stymulację linii komórkowych przeciwciałem anti-CD30 w obecności fluorescencyjnego barwnika DHE (dihydroethidium), który reaguje specyficznym z anionorodnikiem ponadtlenkowym [24,25]. Reakcja DHE z anionorodnikiem skutkuje zmianą koloru barwnika, co jest wykorzystywane do detekcji przy użyciu cytometru przepływowego. Intensywność fluorescencji jest więc proporcjonalna do stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w komórce.

Warto podkreślić, że tak skonstruowany eksperyment zapewnia z jednej strony wysoką specyficzność analizy (identyfikacja wyłącznie anionorodnika ponadtlenkowego) a także umożliwia porównanie funkcjonowania oksydazy NADPH w trzech badanych grupach linii komórkowych. W obecności funkcjonującej oksydazy NADPH zarówno silnie CD30 pozytywna grupa linii komórkowych chłoniaka Hodgkina jak i grupa CD30 pozytywna grupa kontrolna powinna zareagować wzmożoną produkcją anionorodnika ponadtlenkowego po stymulacji przeciwciałem anti-CD30 w przeciwieństwie do kontroli negatywnej. Zgodnie z postawioną hipotezą, kontrolne linie komórkowe CD30 pozytywne zareagowały wzmożoną syntezą anionorodnika ponadtlenkowego w przeciwieństwie do grupy kontrolnej CD30 ujemnej. Podkreślić należy, że żadna z badanych linii klasycznego chłoniaka Hodgkina, pomimo silnej ekspresji CD30, nie wykazała wzrostu produkcji anionorodnika ponadtlenkowego powyżej poziomu tła.

Przedstawione analizy funkcjonalne potwierdzają, że zaobserwowane uszkodzenia genów kodujących kompleks oksydazy NADPH w klasycznym chłoniaku Hodgkina powodują uszkodzenie enzymu i w konsekwencji pozbawiają komórki HRS tego źródła anionorodnika ponadtlenkowego. Wyniki te pozwalają na spekulację, że opisane w naszej pracy zjawisko będzie skutkowało zaburzeniem szeregu szlaków sygnałowych, takich jak np. apoptoza, przyczyniając się tym samym do przeżycia komórek nowotworowych. Ponadto, w oparciu o szereg doniesień literaturowych wskazujących na istotną rolę reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju limfocytów typu B [26-28], zaburzenie homeostazy reaktywnych form tlenu może być dotychczas nieznanym mechanizmem prowadzącym do loss of B-cell identity w komórkach HRS.

Podsumowując, prowadzone przeze mnie prace badawcze w znaczny sposób wzbogaciły dostępną wiedzę dotyczącą genetyki klasycznego chłoniaka Hodgkina. Są to odkrycia poszerzające nasze rozumienie istotnych procesów w patogenezie tego chłoniaka, takich jak

hiperaktywacja szlaku sygnałowego NFκB czy utrata czynników transkrypcyjnych co przyczynia się do loss-of-B-cell-identity komórek HRS. Podkreślić należy jednak, że omawiane prace nie ograniczają się jedynie do odkryć w obrębie procesów znanych w patogenezie tego chłoniaka, ale również prezentują zupełnie nowy obszar badań dotyczący roli reaktywnych form tlenu w rozwoju klasycznego chłoniaka Hodgkina. Dalsze poznanie tego obszaru przyniesie zapewne w najbliższych latach szereg odkryć zbliżających nas o kolejny krok do całkowitego zrozumienia biologii tej choroby.

7) Piśmiennictwo

1. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971; 68: 820-3.
2. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 15-27.
3. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010; 221: 248-63.
4. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 151-74.
5. Harhaj EW, Dixit VM. Regulation of NF-κB by deubiquitinases. *Immunol Rev.* 2012; 246: 107-24.
6. Häcker H, Tseng PH, Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 457-68.
7. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 693 – 733.
8. Ammerpohl O, Haake A, Pellissery S, Giefing M, Richter J, Balint B, Kulis M, Le J, Bibikova M, Drexler HG, Seifert M, Shaknovic R, Korn B, Küppers R, Martín-Subero JI, Siebert R. Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia.* 2012; 26: 185-8.
9. Schwering I, Bräuninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Küppers R. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2003; 101: 1505-12.
10. Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, Lenze D, Köchert K, Bouhlef MA, Richter J, Soler E, Stadhouders R, Jöhrens K, Wurster KD, Callen DF, Harte MF,

- Giefing M, Barlow R, Stein H, Anagnostopoulos I, Janz M, Cockerill PN, Siebert R, Dörken B, Bonifer C, Mathas S. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med.* 2010; 16: 571-9.
11. Schwarzer R, Dörken B, Jundt F. Notch is an essential upstream regulator of NF- κ B and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia.* 2012; 26: 806-13.
 12. Hertel CB, Zhou XG, Hamilton-Dutoit SJ, Junker S. Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene.* 2002; 21: 4908-20.
 13. Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, Anagnostopoulos I, Lietz A, Sigvardsson M, Jundt F, Jöhrens K, Bommert K, Stein H, Dörken B. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol.* 2006; 7: 207-15.
 14. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16: 6-21.
 15. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Rapid immunophenotypic characterization of chromosomally aberrant cells by the new FICTION method. *Cytogenet Cell Genet.* 1993; 63: 123-5.
 16. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338: 677-86.
 17. Kobayashi S, Imajoh-Ohmi S, Nakamura M, Kanegasaki S. Occurrence of cytochrome b558 in B-cell lineage of human lymphocytes. *Blood* 1990; 75: 458-61.
 18. Kobayashi S, Imajoh-Ohmi S, Kuribayashi F, Nuno H, Nakamura M, Kanegasaki S. Characterization of the superoxide-generating system in human peripheral lymphocytes and lymphoid cell lines. *J Biochem.* 1995; 117: 758-65.
 19. Giefing M, Arnemann J, Martin-Subero JI, Nieländer I, Bug S, Hartmann S, Arnold N, Tiacci E, Frank M, Hansmann ML, Küppers R, Siebert R. Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol.* 2008; 142: 916-24.
 20. Richards S, Watanabe C, Santos L, Craxton A, Clark EA. Regulation of B-cell entry into the cell cycle. *Immunol Rev.* 2008; 224: 183-200.
 21. Johnston RB. Jr Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol.* 2001; 8: 17-22.

22. Jurkowska M, Bernatowska E, Bal J. Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp.* 2004; 52: 113-20.
23. Küppers R, Klein U, Schwering I, Distler V, Bräuninger A, et al. (2003) Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 111: 529-37.
24. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine.* 2003; 34: 1359-68.
25. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 840–60.
26. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 2009; 461: 537-41.
27. Crotzer VL, Matute JD, Arias AA, Zhao H, Quilliam LA, Dinauer MC, Blum JS. Cutting edge: NADPH oxidase modulates MHC class II antigen presentation by B-cells. *J Immunol* 2012; 189: 3800-4.
28. Hoffmann M, Schirmer MA, Tzvetkov MV, Kreuz M, Ziepert M, Wojnowski L, Kube D, Pfreundschuh M, Trümper L, Loeffler M, Brockmöller J; German Study Group for High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma. A functional polymorphism in the NAD(P)H oxidase subunit CYBA is related to gene expression, enzyme activity, and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2010; 70: 2328-38.

Poznań, 27.01.2014

