

Załącznik nr 3:

AUTOREFERAT

**dr n. med. Marta Anna Olszewska**

## I IMIĘ I NAZWISKO

**Marta Anna Olszewska** (nazwisko panieńskie: Żegała)

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

e-mail: [marta.olszewska@igcz.poznan.pl](mailto:marta.olszewska@igcz.poznan.pl)

<http://igcz.poznan.pl/en/pracownik/marta-olszewska/>

ORCID ID: 0000-0002-2337-4545 Scopus: 23470173800 Web of Science: ABD-3226-2020

## II POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE

### – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA

- 2006      **magister inżynier biotechnologii**  
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań  
tytuł pracy magisterskiej:  
*„Topologia chromosomów w jądrze komórkowym ludzkiego plemnika”*  
Promotor: prof. dr hab. Maciej Kurpisz, Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań
- 2014      **doktor nauk medycznych w dyscyplinie: biologia medyczna**  
Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań  
tytuł rozprawy doktorskiej:  
*„Analiza cytogenetyczna plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW) z niepowodzeniami rozrodu”*  
Promotor: prof. dr hab. Maciej Kurpisz  
Rozprawa wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN
- 2018      poddyplomowe studium przygotowania pedagogicznego w zakresie dydaktyki medycznej  
Uniwersytet Medyczny, Poznań

## III INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

- 2006-2013      słuchacz studium doktoranckiego  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań
- 2010-2014      **biolog**, Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych,  
Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań
- od XI 2014      **adiunkt**, Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych,  
Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań
- od X 2021      **kierownik** Zespołu Badawczego Genetyki Plemnika,  
Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

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

*Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt. 2b Ustawy*

**Tytuł osiągnięcia:** „Cytogenetyczne i epigenetyczne aspekty męskiej niepłodności”

- P1** Olszewska M, Huleyuk N, Fraczek M, Zastavna D, Wiland E, Kurpisz M: *Sperm FISH and chromatin integrity in spermatozoa from a t(6;10;11) carrier.* *Reproduction*, 2014, 147: 659–670  
opublikowano: maj 2014  
IF<sub>2014</sub> 3,174 IF<sub>5-letni</sub> 4,322 MNiSW 35 (obecnie MEiN 100)
- P2** Olszewska M, Wanowska E, Kishore A, Huleyuk N, Georgiadis AP, Yatsenko AN, Mikula M, Zastavna D, Wiland E, Kurpisz M: *Genetic dosage and position effect of small supernumerary marker chromosome (SSMC) in human sperm nuclei in infertile male patient with increased sperm aneuploidy level.* *Sci Reports*, 2015, 5: 17408  
opublikowano: listopad 2015  
IF<sub>2015</sub> 5,228 IF<sub>5-letni</sub> 5,516 MNiSW 40 (obecnie MEiN 140)
- P3** Olszewska M, Stokowy T, Pollock N, Huleyuk N, Georgiadis A, Yatsenko S, Zastavna D, Yatsenko AN, Kurpisz M: *Familial infertility (azoospermia and cryptozoospermia) in two brothers – carriers of t(1;7) complex chromosomal rearrangement (CCR): molecular cytogenetic analysis.* *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4559  
opublikowano: czerwiec 2020  
IF<sub>2020</sub> 5,923 IF<sub>5-letni</sub> 6,628 MEiN 140
- P4** Olszewska M, Barciszewska MZ, Fraczek M, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, Barciszewski J, Kurpisz M: *Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations.* *Asian J Androl*, 2017, 19: 117-124  
opublikowano: styczeń 2017  
IF<sub>2017</sub> 3,259 IF<sub>5-letni</sub> 3,678 MNiSW 40 (obecnie MEiN 70)
- P5** Olszewska M\*, Kordyl O, Kamieniczna M, Fraczek M, Jedrzejczak P, Kurpisz M\*: *Global 5mC and 5hmC DNA levels in human sperm subpopulations with differentially protaminated chromatin in normo- and oligostahenozoospermic males.* *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 4516  
opublikowano: kwiecień 2022  
IF<sub>2022</sub> 6,208 IF<sub>5-letni</sub> 6,628 MEiN 140  
\*autorzy współ-korespondujący
- P6** Odronec A, Olszewska M\*, Kurpisz M: *Epigenetic markers in the embryonal germ cell development and spermatogenesis.* *Basic and Clin Androl*, 2023, 33: 6  
opublikowano: luty 2023  
IF<sub>2022</sub> 2,886 IF<sub>5-letni</sub> 3,262 MEiN 70  
\*autor korespondujący
- łącznie: IF 26,678 IF<sub>5-letni</sub> 30,034 465 (obecnie 660)**

*punktacja IF wg Web of Science*

*punktacja MNiSW wg wykazu czasopism punktowanych z 2017*

*punktacja MEiN wg wykazu czasopism punktowanych z 2021*

**prace te były cytowane 63/62/89 razy (wg Web of Science/Scopus/Google Scholar; stan na dzień 16.05.2023)**

Osiągnięcie naukowe:

**„Cytogenetyczne i epigenetyczne aspekty męskiej niepłodności”**

udokumentowano w formie cyklu sześciu powiązanych tematycznie artykułów (oznaczonych jako P1-P6) opublikowanych w latach 2014-2023 w recenzowanych czasopismach naukowych. Łączna wartość współczynnika Impact Factor (IF) prac stanowiących osiągnięcie naukowe prac wynosi **26,678** oraz **465** punktów ministerialnych (Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW oraz Ministerstwa Edukacji i Nauki, MEiN).

Pięć artykułów (P1-P5) stanowią oryginalne prace doświadczalne obejmujące molekularną charakterystykę chromosomów i chromatyny plemnika u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu będącymi jednocześnie nosicielami aberracji chromosomowych (P1-P4) lub o prawidłowym kariotypie (P5). Jeden artykuł (P6) stanowi pracę poglądową podsumowującą dostępne w piśmiennictwie dane na temat roli markerów epigenetycznych w rozwoju komórek germinalnych oraz w przebiegu spermatogenezy, zwłaszcza w ujęciu znaczenia epigenetyki w powstawaniu zaburzeń płodności u mężczyzn.

W pracach: P1-P5 jestem pierwszym autorem, przy czym w pracy P5 dodatkowo autorem współkorespondującym. W pracy poglądowej P6 jestem drugim autorem i jednocześnie autorem korespondującym.

Szczegółowy opis mojego wkładu w powstanie każdej z prac został zawarty w Załączniku nr 6. Załącznik nr 6 zawiera także oświadczenia współautorów o wiodącym wkładzie mojej osoby w powstanie prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Kopie prac P1-P6 (w postaci elektronicznej) stanowiących osiągnięcie naukowe zebrano w Załączniku nr 5.

## Wprowadzenie

Niepłodność określana jest przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) jako choroba społeczna, która dotyczy ok. 10–18% par w okresie rozrodczym. Szacuje się, że udział niepowodzeń rozrodu u mężczyzn w niepłodności małżeńskiej dochodzi do 40-60% wszystkich przypadków. Przyjmuje się również, że męski czynnik genetyczny stanowi ok. 7-15% przyczyn obniżonej płodności ogółem. Dostępne dane wskazują na obniżanie się parametrów nasienia z roku na rok, a także prognozuje się dalszy trend spadkowy w kolejnych latach. Występowanie niepowodzeń rozrodu u mężczyzn warunkowane jest przez szereg czynników molekularnych i środowiskowych, takich jak: mutacje genetyczne, aberracje chromosomowe, złe nawyki (w tym: jedzenie niskiej jakości, palenie papierosów, alkohol, itp.), czy praca w warunkach uciążliwych dla zdrowia. Szacuje się, że czynniki genetyczne odpowiadają za niepowodzenia rozrodu u ok. 15% niepłodnych mężczyzn. Obejmują one zarówno aberracje chromosomowe, mikrodelecje w chromosomie Y jak i mutacje genów odpowiadających za proces spermatogenezy lub inne mechanizmy pośrednio wpływające na przebieg gametogenezy. Należy zwrócić również uwagę na czynniki epigenetyczne, stanowiące swojego rodzaju „*make up*” czy też rodzaj „*instrukcji*” dla czynników genetycznych i tym samym pełniących istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Wśród nich metylacja plemnikowego DNA (zarówno na poziomie globalnym, jak i wzorów metylacyjnych promotorów genów, w tym również piętnowanie rodzicielskie, tzw. „*imprinting genomowy*”), a także modyfikacje potranslacyjne

histonów i wariantów histonowych plemnika (najlepiej poznane: metylacja i acetylacja), pełnią kluczową rolę w prawidłowym przebiegu spermatogenezy, a następnie rozwoju zarodka [**podsumowano w pracy P6**]. Co istotne, to podatność znakowania epigenetycznego na zaburzenia wywołane podłożem genetycznym, czy też środowiskowym. W tym świetle, w zależności od kontekstu, wzajemne relacje czy oddziaływania pomiędzy czynnikami genetycznymi i epigenetycznymi mogą być zarówno przyczyną jak i skutkiem zaburzeń obserwowanych zmian prowadzących do niepowodzeń rozrodu.

Częstość występowania aberracji chromosomowych u mężczyzn z obniżoną płodnością stanowi średnio ok. 5% (2-8%) wszystkich czynników genetycznych. U mężczyzn z azoospermią odsetek ten wzrasta do ok. 15%. Najczęstszymi wykrywanymi aberracjami są aberracje struktury oraz liczby chromosomów. W populacji mężczyzn niepełnych prawdopodobieństwo wystąpienia aberracji chromosomowych jest kilkukilkunastokrotnie wyższe niż w populacji ogólnej. Dwie najczęściej spotykane aberracje strukturalne chromosomów (ok. 1/500–1/700 urodzeń) to translokacje Robertsonowskie (będące wynikiem połączenia długich ramion q dwóch chromosomów akrocentrycznych przy jednoczesnej utracie krótkich ramion p) oraz chromosomowe wzajemne (powstające na skutek wzajemnej wymiany fragmentów ramion między chromosomami). Szacuje się, że ok. 1% niepełnych mężczyzn jest nosicielami translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW), a całkowity poziom aberracji struktury wykrywany w limfocytach krwi obwodowej może być nawet 4-krotnie wyższy w porównaniu do mężczyzn płodnych. W przypadku azoospermii częstość nosicielstwa TCW wynosi ok. 0,5%, przy czym TCW stanowią ok. 4% aberracji spośród wszystkich obserwowanych w tym fenotypie niepełności. Z kolei u mężczyzn z obniżoną liczbą plemników (oligozoospermia) translokacje chromosomowe wzajemne wykrywa się u ok. 0,7% mężczyzn, co stanowi ok. 16% obserwowanych aberracji w tej grupie pacjentów. W przypadku translokacji Robertsonowskich częstość ich występowania wśród niepełnych mężczyzn z normozoospermią wynosi ok. 0,46%, natomiast u mężczyzn o obniżonych parametrach nasienia wzrasta ok. 2-9-krotnie. Wykazano, że 0,8% nosicieli translokacji Robertsonowskich stanowią mężczyźni z azoospermią (brakiem plemników w ejakulacie), a ok. 85% to pacjenci z oligozoospermią (obniżoną liczbą plemników w nasieniu). Często zdarza się, że wśród nosicieli aberracji o takich samych punktach złamań chromosomów w jednej rodzinie mogą być zarówno mężczyźni płodni, jak i niepełni (np. ojciec i syn, bracia, kuzyni). Jednak przyczyny tego zjawiska pozostają niewyjaśnione – dane opisujące przypadki rodzinne powstały przed ogólną dostępnością do badań całogenomowych, a istnieje duże prawdopodobieństwo, że obserwowane różnice w płodności są wynikiem mutacji genowych.

Dosyć specyficznym typem translokacji chromosomowych są tzw. kompleksowe rearanżacje chromosomowe (KRC; ang. *complex chromosomal rearrangement, CCR*), w których obserwuje się minimum trzy miejsca złamania na dwóch lub więcej chromosomach jednocześnie. W zależności od struktury rearanżacji, wyróżnia się cztery typy KRC [podsumowano w: Olszewska i Kurpisz, 2019; Madan, 2012]. Pierwsze trzy typy (I – trójstronna, ang. *three-way*; II – nadzwyczajna, ang. *exceptional*; III – podwójna, ang. *double-way*) charakteryzują się zrównoważoną ilością materiału genetycznego, podczas gdy typ IV (inercyjny, ang. *insertional*) związany jest z powstawaniem delecji, duplikacji lub przerwaniem ciągłości genu, powodując zaburzenia jego ekspresji. Od 1970 r. opisano ponad 250 przypadków nosicieli genetycznie zrównoważonych KRC, przy czym jedynie 163 przypadki obejmowały mężczyzn, w tym tylko 13 było płodnych [**podsumowano w pracy P3**]. Tak wysoka częstość mężczyzn niepełnych wśród nosicieli KRC wynika

z zahamowania lub zatrzymania spermatogenezy na skutek zaburzeń w parowaniu chromosomów homologicznych na etapie pachytemu poprzez ich konfigurację przestrzenną i z wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia niesparowanych odcinków chromosomów względem klasycznej TCW. Ponadto wzór segregacji mejozy zbadano dotychczas tylko dla 10 przypadków nosicieli KRC [podsumowano w pracy P3], przy czym częstość plemników niezrównoważonych genetycznie wynosiła nie mniej niż 73% (vs. TCW min. 20%). Przekłada się to na wysokie ryzyko wystąpienia niezrównoważonych genetycznie zarodków ulegających poronieniom u nosicieli KRC (50-100%), a odsetek KRC wykrywanych podczas badań prenatalnych stosunkowo niski (ok. 5-10%). Szacuje się, że dla genetycznie zrównoważonych KRC wykrywanych w badaniach prenatalnych ryzyko wystąpienia wad wrodzonych szacowane jest na ok. 3,5% na każde złamanie chromosomu.

Do aberracji strukturalnych zalicza się także inwersje chromosomowe (inv), powstające poprzez złamanie chromosomu w dwóch miejscach, obrocie powstałego fragmentu o 180° i ponownym połączeniu. Inwersje paracentryczne powstają, gdy oba miejsca złamań chromosomu lokalizują się na tym samym ramieniu chromosomu (nie obejmują centromeru), natomiast pericentryczne zawierają w sobie centromer, a miejsca złamań znajdują się na obu ramionach. Inwersje występują z częstością ok. 0,05% w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci, a wśród nosicieli 1-2% mężczyzn jest niepełnych. Jednakże mimo wielu doniesień literaturowych łączących inwersje chromosomowe z niepłodnością, ich rzeczywisty wpływ na niepowodzenia rozrodu pozostaje dyskusyjny.

Aberracje chromosomowe często nie wpływają na fenotyp osobniczy, w przeciwieństwie do spermatogenezy, podczas której przyczyniają się do nieprawidłowej segregacji chromosomów do komórek potomnych, tym samym prowadząc do wytworzenia części gamet niezrównoważonych genetycznie. To z kolei podwyższa ryzyko niepowodzenia rozrodu lub posiadania potomstwa z wadami na tle genetycznym. Stosując odpowiednie znakowanie chromosomów przy użyciu metod fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*) można oszacować odsetek segregantów powstałych w poszczególnych typach segregacji (16 dla TCW, 8 dla RobT, m.in. 64 dla KRC, 4 dla inv), a ich zestawienie tworzy tzw. wzór segregacji mejozy. Jest on determinowany przez: rodzaj zaangażowanych chromosomów (akrocentryczne, płci, z blokiem heterochromatyny), lokalizację miejsc złamań chromosomów i proporcji fragmentów ulegających translokacji do odcinków nietranslokowanych, występowaniu niesparowanych końców chromosomów podczas koniugacji w pachytemie, lokalizację i liczbę powstających chiazm, prawidłowe rozpoznawanie centromerów chromosomów homologicznych przez wrzeciono kariokinetyczne oraz konfiguracji multiwalentu na etapie diakinezy. Wzór segregacji jest niezmienny w ciągu życia oraz jest zbliżony dla nosicieli aberracji o tych samych punktach złamań chromosomów. Badanie wzorów segregacji mejozy pozwala na sprawdzenie rzeczywistego rozkładu częstości gamet o różnym genotypie, co stanowi świetne uzupełnienie szacunkowych wartości indywidualnego ryzyka poronień lub urodzenia dziecka z wadami i jest szczególnie informatywne przy braku danych rodowodowych oraz faktu, iż nie każdy rodzaj niezrównoważenia genetycznego jest obecny u żywo narodzonych dzieci.

Obok aberracji strukturalnych chromosomów, także zmiany liczby chromosomów mogą stanowić przyczynę niepowodzeń rozrodu. Aneuploidie (brak lub nadmiar danego chromosomu) występujące u człowieka wynikają z błędów w segregacji chromosomów zarówno macznych, jak i ojcowskich, przez co

stoją u podłoża wadliwej gametogenezy. Błędy w mejozie męskich komórek rozrodczych wynikają ze zredukowanej liczby chiasm lub ich braku lub też przedwczesnego rozchodzenia się chromatyd siostrzanych. Do większości nieprawidłowości dochodzi podczas I podziału meiotycznego. Wyższa częstość aneuploidii dotyczy głównie chromosomów płci, w których rekombinacja ma miejsce na ograniczonym, krótkim obszarze pseudoautosomalnym PAR (ang. *pseudoautosomal region*), a także chromosomów z grupy G o obniżonej liczbie chiasm z racji ich małego rozmiaru. Za około 95% aneuploidii obserwowanych we wczesnych zarodkach (głównie chromosomów autosomalnych) odpowiadają zaburzenia przebiegu mejozy matczynej i obejmują one błędy w I podziale meiotycznym (3:1 w stosunku do II podziału meiotycznego). Pochodzenia ojcowskiego są z kolei aneuploidie chromosomów płci (6% 47,XXX; 50% 47,XXY; 100% 47,XYY). Chromosomami, dla których poziom aneuploidii badany jest najczęściej są: 13, 18, 21, X i Y. Jest to spowodowane przeżywalnością (przy zaistnieniu wad wrodzonych) zarodków z trisomią chromosomów 13, 18 i 21 oraz aneuploidią chromosomów płci, podczas gdy aneuploidie innych chromosomów są letalne. Ponadto jedynie trisomia chromosomu 21 (Zespół Downa) pozwala na osiągnięcie wieku dojrzałego, przy czym jedynie 6-10% przypadków tej trisomii jest pochodzenia ojcowskiego. Poziom aneuploidii często szacowany jest również dla chromosomów: 15, 16 oraz 22 ze względu na podwyższoną częstość występowania tych aneuploidii w materiale z poronień. W przypadku chromosomów płci, najczęściej spotykaną aberracją jest Zespół Klinefeltera (47,XXY) przypadający na 0,1-0,2% nowonarodzonych dzieci, podczas gdy u niepłodnych mężczyzn odsetek nosicielstwa dodatkowego chromosomu X wzrasta od 5% (oligozoospermia) do 10% (azoospermia). W plemnikach 40-64% nosieli TCW obserwuje się tzw. efekt interchromosomowy (ICE, ang. *interchromosomal effect*), czyli podwyższoną częstość hiperhaploidalnych plemników zawierających chromosomy niezaangażowane w TCW. Poziom aneuploidii chromosomów niezaangażowanych w translokację chromosomową w plemnikach udokumentowano wobec aneuploidii obserwowanej w zarodkach, a także wykazano związek pomiędzy podwyższonym poziomem aneuploidii chromosomów 13, 21, 22, X i Y i/lub plemników diploidalnych u ojców dzieci z zespołami: Downa, Klinefeltera czy Turnera.

Szacunkowo u płodnych mężczyzn z normozoospermią sumaryczny odsetek plemników aneuploidalnych wynosi średnio około 4,5% (3-5%). Natomiast u mężczyzn niepłodnych wzrasta on 2-10-krotnie, co przypuszczalnie jest wynikiem niestabilności w mechanizmach kontrolujących podziały komórkowe, związanych z prawidłowym funkcjonowaniem mikrotubul wrzeciona podziałowego oraz z błędami w rekombinacji. Aspekt związku parametrów nasienia z poziomem aneuploidii w plemnikach z kolei pozostaje niejednoznaczny – dane literaturowe wskazują zarówno na wzrost częstości gamet aneuploidalnych, jak i na wartości zbliżone do kontrolnych, również plemników frakcjonowanych pod kątem ruchliwości (metoda wypływania „swim up”), czy gęstości chromatyny (wirowanie w gradiencie perkolu). Ciekawostką jest obserwacja tzw. wariantów aneuploidii dla wybranych chromosomów w plemnikach niektórych zdrowych mężczyzn z normozoospermią – na przestrzeni kilku lat powtarzanych badań poziom aneuploidii chromosomów był cały czas podwyższony. Około 4,6-krotnie wyższy poziom aneuploidii chromosomów 18, X i Y wykazano także w plemnikach o podwyższonym stopniu fragmentacji DNA.

Specyficznym rodzajem hiperhaploidii jest obecność tzw. chromosomu markerowego (ang. sSMC – *small supernumerary marker chromosome*) zdefiniowanego jako mały (mniejszy, niż najmniejszy chromosom w zestawie), strukturalny fragment chromosomu lub zbitok z fragmentów kilku chromosomów występujący

dodatkowo obok prawidłowego zestawu chromosomów. Częstość występowania chromosomów markerowych u nieplodnych mężczyzn jest wyższa 7,5-krotnie wobec kobiet oraz 3,75-krotnie względem częstości u nowo narodzonych dzieci. Chromosomy markerowe są także częściej dziedziczone od matki, a także obserwowane u nieplodnych synów w porównaniu do córek. Najczęściej chromosomy markerowe są pochodzenia akrocentrycznego (85%), w tym głównie od chromosomu 15 (45%). U mężczyzn o obniżonych parametrach nasienia nosicielstwo chromosomów markerowych jest również podwyższone (7%). W kontekście nieplodności sugeruje się rolę chromosomów markerowych coraz częściej dla przypadków idiopatycznych oraz z poronieniami nawracającymi (częstość występowania chromosomów markerowych: 22-47%). Sugeruje się, że chromosomy markerowe zaburzają koniugację i rozchodzenie się chromosomów homologicznych podczas mejozy.

Pozostając w tematyce chromosomów należy również wspomnieć o organizacji jądra komórkowego plemnika. Plemnik jest specyficzną komórką o unikatowym sposobie upakowania chromatyny – podczas spermiogenezy co najmniej 85% somatycznych białek histonowych zostaje zastąpione przez protaminy, małe zasadowe białka, co prowadzi do zwijania się cząsteczki DNA plemnikowego w szerokie, nakładające się okręgi – tzw. toroidy zastępując tym samym strukturę nukleosomu charakterystyczną dla komórek somatycznych. Odmienne sposoby organizacji genomu plemnikowego (jądro komórkowe plemnika to tylko ok. 5% objętości jądra diploidalnej komórki somatycznej) skutkuje różnicami na wszystkich poziomach organizacyjnych i funkcjonalnych chromatyny i jest ściśle związane z wyciszeniem aktywności genomu plemnikowego. To co istotne to fakt, iż również w plemniku każdy chromosom zajmuje określone miejsce w przestrzeni jądra komórkowego, w zależności od: wielkości chromosomu, „gęstości genowej” chromosomu, a także roli podczas zapłodnienia. Centromery chromosomów plemnika skierowane są do wewnątrz jądra komórkowego, tworząc kilka obszarów tzw. chromocentrum, podczas gdy telomery skierowane są peryferyjnie i wykazują tendencję do asocjacji w formie dimerów lub tetramerów. Wiadomo, że chromosomy płci preferują umiejscowienie w głębi jądra komórkowego plemnika, co ma zapewnić ochronę materiału genetycznego i jednocześnie w części akrosomalnej (przednia część główki plemnika okryta akrosomem), co pozwala odegrać kluczową rolę na pierwszych etapach zapłodnienia (uznaje się, że chromosom X jako pierwszy ulega kontaktowi z ooplazmą i jest odpowiedzialny za rozpoczęcie reorganizacji genomu ojcowskiego po zapłodnieniu). Dotychczasowe dane literaturowe (22 prace) obejmowały badania mężczyzn o prawidłowym kariotypie (płodnych i nieplodnych), nosicieli aberracji chromosomowych (translokacje chromosomowe wzajemne, translokacje Robertsonowskie, chromosomy markerowe) mężczyzn o obniżonych parametrach nasienia, czy podwyższonej fragmentacji DNA plemnikowego. Grupa kontrolna wykazywała stabilność w lokalizacji chromosomów, w przeciwieństwie do grup nieplodnościowych, w których umiejscowienie chromosomów ulegało zmianie i rozproszeniu. Tym samym, prawidłową organizację wewnątrzjądrową plemnika uznaje się jako jeden z istotnych elementów związanych z sukcesem rozrodczym.

Sugeruje się także, że zaburzenia integralności chromatyny plemnikowej (obejmujące zarówno fragmentację plemnikowego DNA, jak i obniżony poziom protaminacji) stanowią jeden z czynników determinujących obniżenie płodności u mężczyzn. Do uszkodzeń struktury chromatyny plemnikowej może dochodzić podczas przekształcania chromatyny somatycznej w typ plemnikowy na skutek naprężeń torsyjnych wywołujących pęknięcia nici DNA. Silnie upakowana chromatyna plemnikowa uniemożliwia



dostęp enzymów naprawczych do uszkodzonego DNA, a razem z wyciszeniem procesów transkrypcji i translacji całość sprawia, że apoptoza plemników z pofragmentowanym DNA nie przebiega w sposób typowy dla komórek somatycznych. Istotnym czynnikiem wpływającym na fragmentację DNA plemnikowego jest również stres oksydacyjny, a wrażliwość chromatyny o obniżonej ilości protamin (i tym samym o luźniejszej strukturze) na atak wolnych rodników tlenowych wydaje się być podwyższona. Dostępne dane wskazują również, że plemniki z fragmentacją DNA mogą reprezentować populację gamet, których dojrzewanie (w kontekście wymiany histonów na protaminy) nie zostało prawidłowo ukończone. W konsekwencji obniżona integralność chromatyny plemnika może także skutkować niepowodzeniami w rozwoju zarodka.

Należy pamiętać, że zmiany genetyczne i epigenetyczne w plemniku można nazwać „tykającą bombą biologiczną”, gdyż ich nosiciele bardzo często nie wykazują żadnych zmian fenotypowych, a średnio 40% ma prawidłowe parametry nasienia. Tym samym mężczyźni ci znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka prowadzącego nieprawidłowej ciąży oraz urodzenia dziecka z wadami rozwojowymi przez partnerkę. Jest to istotne w szczególności w kontekście pozyskiwania plemników przy zapłodnieniu pozaustrojowym (IVF – ang. *in vitro fertilization*), stanowiącym dziś już ok. 1-3% wszystkich urodzeń – potencjalne zaburzenia wywołane mutacjami w większości dotychczas poznanych genów związanych z rozrodem, jak również nosicielstwo aberracji chromosomowych, czy zmiany poziomu wzoru znaczników epigenetycznych nie mają przełożenia na ruch czy morfologię plemnika stanowiących jedyne kryterium wyboru danego plemnika do zapłodnienia pozaustrojowego. Stąd też diagnostyka męskiej niepłodności – mimo swojej wieloaspektowości (badania kliniczne, hormonalne, immunologiczne, biochemiczne i genetyczne i in.) nadal wymaga dogłębnej analizy przyczyn mechanizmów obserwowanych zaburzeń.

### Cel naukowy cyklu prac

Celem cyklu prac było wykazanie roli czynników cytogenetycznych oraz epigenetycznych w etiopatogenezie niepłodności męskiej. Cel ten realizowano poprzez kompleksową analizę molekularną chromosomów i chromatyny plemnika ludzkiego niepłodnych mężczyzn pod kątem wpływu kariotypu na: przebieg spermatogenezy (P1, P2, P3, P4), zmiany w wewnątrzjądrowej organizacji jądra komórkowego plemnika (P2), zmian w integralności chromatyny plemnikowej (P1, P2, P4, P5) oraz zmian poziomu metylacji i hydroksymetylacji globalnej DNA plemnikowego (P4, P5). Ponadto rolę czynników epigenetycznych w przebiegu spermatogenezy, rozwoju komórek płciowych oraz w kontekście zaburzeń płodności u mężczyzn podsumowano w pracy P6.

Powyzsze zagadnienia badawcze zostały przeze mnie podjęte w cyklu sześciu prac,  
składających się na osiągnięcie naukowe pt.:

#### **„Cytogenetyczne i epigenetyczne aspekty męskiej niepłodności”**

stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

## Omówienie prac włączonych do cyklu

- P1** Olszewska M, Huleyuk N, Fraczek M, Zastavna D, Wiland E, Kurpisz M: *Sperm FISH and chromatin integrity in spermatozoa from a t(6;10;11) carrier*. *Reproduction*, 2014, 147: 659–670  
opublikowano: maj 2014  
IF<sub>2014</sub> 3,174 IF<sub>5-letni</sub> 4,322 MNiSW 35 (obecnie MEiN 100)

Po uzyskaniu stopnia doktora jednym z pierwszych zagadnień podjętych przeze mnie była analiza interesującego przypadku nosiciela kompleksowej rearanżacji chromosomowej t(6;10;11) o potwierdzonej niepłodności i obniżonej ruchliwości plemników (astenozoospermia). W pracy P1 opisany przypadek t(6;10;11) stanowił typ I KRC – tzw. rearanżację trójstronną (ang. *three-way rearrangement*), w której każdy z zaangażowanych chromosomów miał jeden punkt złamania. We współpracy z ośrodkiem we Lwowie (*prof. D. Zastavna i dr N. Huleyuk, Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences*) dokonaliśmy szczegółowej charakterystyki punktów złamań chromosomów (klasyczne barwienie cytogenetyczne GTG oraz FISH, w tym również mFISH), a także określiliśmy częstość plemników niezrównoważonych genetycznie. Stanowiło to dość trudne zadanie ze względu na fakt, iż w przypadku trójstronnej KRC możliwych genotypów plemnikowych po segregacji mejotycznej było 64 (dla porównania: dla TCW liczba ta wynosi 16), a w celu ich uwidocznienia wymagane było zastosowanie kombinacji pięciu kolorów fluorescencyjnych jednocześnie. Również w przypadku analizowanym w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, otrzymany niski odsetek (21,18%) plemników prawidłowych lub zrównoważonych genetycznie wydaje się potwierdzać wysoki fakt niezrównoważenia gamet w związku z wystąpieniem rearanżacji kompleksowej. Dodatkowo oceniliśmy poziom występowania aneuploidii chromosomów: 13, 15, 18, 21, 22, X oraz Y, a zaobserwowany podwyższony poziom dla każdego z nich (2,4-11,0-krotnie, średnio: 5,3-krotnie) wskazuje na występowanie efektu interchromosomowego (ICE). Tym samym, wysoka częstość plemników niezrównoważonych genetycznie u analizowanego nosiciela KRC prawdopodobnie stanowiła przyczynę zatrzymania rozwoju zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego (IVF – *in vitro fertilization*), któremu para trzykrotnie się poddała (niestety, nie przeprowadzono diagnostyki przedimplantacyjnej). Także poziomy: stopnia protaminacji chromatyny plemnikowej oraz fragmentacji DNA plemnikowego, które nie odbiegały od wartości kontrolnych, wydają się wskazywać na rolę niezrównoważenia genetycznego plemnika w braku obserwowanego sukcesu rozrodczego badanego nosiciela KRC. Należy także dodać, że badanie integralności chromatyny plemnikowej u nosiciela KRC wykonaliśmy jako pierwsi (protaminacja chromatyny) lub drudzy (fragmentacja DNA). Występowanie efektu interchromosomowego może stanowić także przyczynę obserwowanej astenozoospermii – podwyższony poziom aneuploidii udokumentowano u mężczyzn o obniżonych parametrach nasienia.

**Praca P1** stanowiła składową cyklu publikacji: "*Genetyczne podłoże niepłodności męskiej - kompleksowe badania materiału genetycznego plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli aberracji chromosomowych*" nagrodzonego przez Polskie Towarzystwo Genetyczne (nagroda zespołowa razem z: dr hab. E. Wiland i prof. dr hab. M. Kurpiszem; 2016).

**P2** **Olszewska M**, Wanowska E, Kishore A, Huleyuk N, Georgiadis AP, Yatsenko AN, Mikula M, Zastavna D, Wiland E, Kurpisz M: *Genetic dosage and position effect of small supernumerary marker chromosome (sSMC) in human sperm nuclei in infertile male patient with increased sperm aneuploidy level.* Sci Reports, 2015, 5: 17408

opublikowano: listopad 2015

IF<sub>2015</sub> 5,228

IF<sub>5-letni</sub> 5,516

MNiSW 40

(obecnie MEiN 140)

W **pracy P2** kontynuowano analizę kolejnego ciekawego przypadku – nosiciela chromosomu markerowego, opisanego wstępnie jako 47,XY,+mar. Założeniem **pracy P2** było określenie różnic w lokalizacji wewnątrzjądrowej chromosomów: 15, 18, X, Y oraz chromosomu markerowego w plemnikach nosiciela 47,XY,+mar w układzie: plemniki zawierające chromosom markerowy (sSMC<sup>+</sup>) vs. plemniki bez chromosomu markerowego (sSMC<sup>-</sup>) pochodzące z tego samego ejakulatu, co stanowiło pierwsze doniesienie literaturowe tego typu. Analiza ta została poprzedzona szczegółową charakterystyką molekularną chromosomu markerowego, wykonaną we współpracy z ośrodkami: we Lwowie (*prof. D. Zastavna i dr N. Huleyuk, Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences* – charakterystyka pacjentów, klasyczne barwienie cytogenetyczne GTG) oraz w Pittsburghu (*zespół prof. A.N. Yatsenko, University of Pittsburgh, USA* – analiza genomowa z użyciem mikromacierzy aCGH). Analizy FISH wykonano w naszym Zakładzie. Szeroko zakrojone analizy mające na celu charakterystykę molekularną chromosomu markerowego pozwoliły na uszczegółowienie jego zapisu cytogenetycznego, wykazując obecność fragmentu centromeru chromosomu 15, zduplikowany region obszarów jąderkotwórczych (NOR – *nucleolar organizing region*) na obu końcach markera oraz euchromatynowy fragment prążka q11.2 (>2300 kpz) zawierający kopię wariantów polimorficznych 15 genów. Pacjent nie wykazywał zmian fenotypowych, co tym samym potwierdziło brak tzw. efektu dawki przez zduplikowany fragment genomowy.

W części obejmującej badanie plemników stwierdziliśmy obecność chromosomu markerowego w ok. 51% plemników w ejakulacie, co wskazuje na segregację mejozytyczną w proporcji zbliżonej do 1:1. Taka proporcja wydaje się świadczyć o unikaniu mechanizmu eliminującego nie zrównoważone genetycznie gamety, czemu może sprzyjać obecność fragmentu centromeru chromosomu 15 stanowiącego element odpowiedzialny za segregację markera do komórek potomnych. Ponadto odkryliśmy zmiany w lokalizacji badanych chromosomów – obecność chromosomu markerowego wywołała przemieszczenie się chromosomów płci w stronę peryferium jądra komórkowego, co może zaburzać rolę chromosomów X i Y na pierwszych etapach zapłodnienia. Jednocześnie chromosomy płci przyjęły lokalizację blisko chromosomu markerowego. Wspólna lokalizacja sugerować może asocjację markera do bivalentu XY podczas stadium pachytenu i tym samym prowadzić do zaburzeń spermatogenezy uwidocznionej jako obniżona koncentracja plemników w nasieniu pacjenta. Także udokumentowany efekt interchromosomowy (ICE) (2,7-15,1-krotnie podwyższony poziom aneuploidii dla chromosomów: 13, 15, 18, 21 oraz 22) może wpływać negatywnie na spermatogenezę lub niepowodzenia rozrodu. Z kolei poziom protaminacji chromatyny plemnikowej u badanego pacjenta nie uległ obniżeniu, co ponownie wydaje się podkreślać rolę niezrównoważenia genetycznego plemnika w etiologii niepłodności męskiej.

Za **pracę P2** otrzymałam Naukową Nagrodę Młodych im. Prof. Bokińca za *najlepszą pracę z dziedziny andrologii* przyznaną przez Polskie Towarzystwo Andrologiczne w roku 2016.

**Praca P2** stanowiła także składową w nagrodzonym przez Polskie Towarzystwo Genetyczne cyklu publikacji: "Genetyczne podłoże niepłodności męskiej - kompleksowe badania materiału genetycznego plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli aberracji chromosomowych" (nagroda zespołowa razem z: dr hab. E. Wiland i prof. dr hab. M. Kurpiszem, 2016).

**P3** **Olszewska M**, Stokowy T, Pollock N, Huleyuk N, Georgiadis A, Yatsenko S, Zastavna D, Yatsenko AN, Kurpisz M: *Familial infertility (azoospermia and cryptozoospermia) in two brothers – carriers of t(1;7) complex chromosomal rearrangement (CCR): molecular cytogenetic analysis.*

Int J Mol Sci, 2020, 21: 4559

opublikowano: czerwiec 2020

IF<sub>2020</sub> 5,923

IF<sub>5-letni</sub> 6,628

MEIN 140

Do osiągnięcia habilitacyjnego należy zaliczyć również **pracę P3** stanowiącą poszerzenie analiz pierwotnie wykonanych w ramach pracy doktorskiej dla kompleksowej rearanżacji chromosomowej typu II (tzw. nadzwyczajna – *exceptional complex chromosomal rearrangement*), charakteryzującej się wystąpieniem co najmniej dwóch miejsc złamań na jednym z zaangażowanych chromosomów. W pracy P3 szczegółowej charakterystyce poddaliśmy KRC pomiędzy chromosomami: 1 (dwa punkty złamań) oraz 7 (jeden punkt złamania) udokumentowaną w przypadku rodzinnym: dwóch braci oraz matki. W ramach wcześniejszych badań wykonano: barwienie GTG, FISH, mFISH, barwienia kompleksu synaptonemalnego oraz badanie wzoru segregacji mejozy, które następnie poszerzono o następujące analizy molekularne wnoszące nieocenione dane interpretacyjne: mapowanie punktów złamań (BAC-FISH) i tym samym ich zawężenie, analizę całogenomową z użyciem mikromacierzy aCGH (ze szczegółową oceną regionów około punktów złamań) wykluczającą liczbę kopii genów jako kluczową w zahamowaniu spermatogenezy u obu braci. Stworzono również model 3D kompleksu synaptonemalnego. Elementem dodanym jest także przegląd literaturowy wszystkich dostępnych danych i umieszczenie go jako integralnej części pracy P3. Przegląd literatury pozwolił na szczegółowe zestawienie przypadków męskich nosicieli KRC o potwierdzonych problemach z rozrodem, co stanowi pierwszy tak szeroki opis tego typu pacjentów. Całość została wykonana w ramach współpracy z ośrodkami: we Lwowie (*prof. D. Zastavna i dr N. Huleyuk, Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences* – charakterystyka pacjentów, klasyczne barwienie cytogenetyczne GTG), Pittsburghu (*zespół prof. A.N. Yatsenko, University of Pittsburgh, USA* – analiza aCGH) oraz z Uniwersytetem w Bergen (*dr hab. T. Stokowy, IT Division* – analiza genomowa wyników).

Badania nad przypadkiem rodzinnym t(1;7) przyczyniły się również do aplikacji (zakończonych pozytywnie) o projekt grantowy Narodowego Centrum Nauki, Opus 2015/17/B/NZ2/01157 (2016-2020, kierownik projektu: prof. dr hab. M. Kurpisz): *Poszukiwanie genów krytycznych dla oligo- i azoospermii u człowieka – myszy model doświadczalny typu 'knockout'*. Projekt oparty został o geny wyselekcjonowane z wyników sekwencjonowania całokomowego (WES) m.in. braci z przypadku rodzinnego t(1;7).

**P4** Olszewska M, Barciszewska MZ, Fraczek M, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, Barciszewski J, Kurpisz M: *Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations*. Asian J Androl, 2017, 19: 117-124

opublikowano: styczeń 2017

IF<sub>2017</sub> 3,259

IF<sub>5-letni</sub> 3,678

MNiSW 40

(obecnie MEiN 70)

W **pracy P4** kontynuowano badania w grupie mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu będącymi jednocześnie nosicielami różnych aberracji strukturalnych chromosomów, włączając w to: translokacje chromosomowe wzajemne, Robertsonowskie, KRC oraz inwersje chromosomowe. Jednakże celem pracy P4 była analiza globalnego poziomu metylacji DNA (5mC) w plemnikach ww. nosicieli, a następnie korelacja poziomu metylacji DNA z integralnością chromatyny plemnikowej. Całość wyników została zestawiona z grupą mężczyzn kontrolnych. Badania zostały przeprowadzone we współpracy z: Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (*prof. dr hab. M.Z. Barciszewska i prof. dr hab. J. Barciszewski* – analiza metylacji metodą chromatografii cienkowarstwowej), ośrodkiem we Lwowie (*prof. D. Zastavna i dr N. Huleyuk, Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences* – charakterystyka pacjentów, barwienia GTG) oraz w Moskwie (*dr hab. V.B. Chernykh, Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences* – charakterystyka pacjentów, barwienia GTG). Charakterystykę nasienia grupy kontrolnej i części pacjentów, immunofluorescencja oraz barwienia chromatynowe wykonano w naszym Zakładzie.

Jako pierwsi wykazaliśmy, że u nosicieli aberracji chromosomowych wzrostowi stopnia deprotaminacji chromatyny oraz fragmentacji DNA plemnikowego towarzyszy hipometylacja DNA, podczas gdy w grupie kontrolnej udokumentowaliśmy jego hipermetylację. Obserwacja ta świetnie wpisuje się w światowe dane literaturowe coraz częściej wskazujące na zaburzenia poziomu lub wzoru metylacji w plemnikach jako jednej z przyczyn szeroko rozumianej męskiej niepłodności lub też negatywnie wpływających (czy też wręcz determinujących) na aktywację genów na wczesnym etapie rozwoju zarodka (w szczególności hipometylacja). Potwierdziliśmy również wyniki literaturowe wskazujące na obniżone parametry nasienia u nosicieli aberracji chromosomowych oraz uzupełniliśmy dane dotyczące obniżenia integralności chromatyny plemnika o kolejne przypadki nosicieli aberracji chromosomowych. Wzrost dezintegracji chromatyny plemnika może wynikać m.in. z podwyższonych napięć torsyjnych podczas postawiania rearanżacji chromosomowych, a następnie destabilizacji na poziomie chromatyny, a w konsekwencji do wzrostu poziomu apoptozy w plemnikach i tym samym obniżenia jakości nasienia.

**Praca P4** została nagrodzona w 2019 r. przez redakcję Asian J Androl *Outstanding Paper Award dla najlepszej pracy opublikowanej w Asian J Androl*. **Praca P4** stanowiła także składową w nagrodzonym przez Polskie Towarzystwo Genetyczne cyklu publikacji: "*Genetyczne podłoże niepłodności męskiej - kompleksowe badania materiału genetycznego plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli aberracji chromosomowych*" (nagroda zespołowa razem z: dr hab. E. Wiland i prof. dr hab. M. Kurpiszem, 2016).

Wyżej opisane badania przyczyniły się również do otrzymania projektu grantowego Sonata NCN: *Badanie metylacji DNA plemników niepłodnych mężczyzn ze zdiagnozowaną oligozoospermią*, 2015/17/D/NZ5/03442 (2016-2020, kierownik projektu: dr M. Olszewska), a następnie kontynuowania tematyki zaburzeń czynników epigenetycznych u mężczyzn o obniżonych parametrach nasienia, czego efektem jest m.in. **praca P5** również włączona do cyklu.

**P5** Olszewska M\*, Kordyl O, Kamieniczna M, Fraczek M, Jędrzejczak P, Kurpisz M\*: *Global 5mC and 5hmC DNA levels in human sperm subpopulations with differentially protaminated chromatin in normo- and oligostahenozoospermic males.* Int J Mol Sci, 2022, 23: 4516

opublikowano: kwiecień 2022

IF<sub>2022</sub> 6,208

IF<sub>5-letni</sub> 6,628

MEiN 140

\*autorzy współ-korespondujący

**Praca P5** to kontynuacja zagadnień epigenetycznych w męskiej niepłodności. W tym przypadku skupiliśmy badania nad globalnymi poziomami metylacji (5mC) i hydroksymetylacji (5hmC) w DNA plemników pacjentów o prawidłowym kariotypie, ale z niepowodzeniami rozrodu i o obniżonej koncentracji i/lub ruchliwości plemników. Badania przeprowadzono we współpracy z prof. dr hab. P. Jędrzejczakiem (*Pracownia Andrologii, Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu – część kolekcji próbek*). Celem naszych badań było wykazanie potencjalnych korelacji pomiędzy stopniem integralności chromatyny plemnika a poziomem globalnym metylacji i hydroksymetylacji DNA plemnikowego i odniesienie tego do jakości nasienia. Co istotne jako pierwsi opracowaliśmy i zastosowaliśmy sekwencyjny algorytm barwień pozwalający na ocenę zmian w tym samym plemniku, tj. najpierw analizę stopnia protaminacji chromatyny, a następnie w tym samym miejscu badanie immunofluorescencyjne poziomów 5mC i 5hmC. Pozwoliło to na wyodrębnienie i udokumentowanie zmian epigenetycznych w trzech frakcjach plemnikowych o różnym stopniu protaminacji chromatyny. Najwyższy poziom 5mC i 5hmC zaobserwowaliśmy w plemnikach o prawidłowej protaminacji. Wykazaliśmy związek stopnia protaminacji i poziomów badanych epiznaczyków w grupie kontrolnej, a także jego zanik w przypadku pacjentów o obniżonych parametrach nasienia. Ponadto w grupie pacjentów wykazaliśmy korelację poziomu metylacji i hydroksymetylacji z ruchliwością i morfologią plemników. Potwierdziliśmy również dane literaturowe dotyczące zmian poziomu metylacji DNA plemnikowego u mężczyzn z oligozoospermią, a także zaobserwowaliśmy heterogenność w grupie pacjentów dla wszystkich analizowanych parametrów. Dodatkowym elementem pracy P5 jest również szczegółowy i pełny przegląd opublikowanej literatury zestawiającej dotychczasowe badania metylacji DNA plemnikowego u płodnych i niepłodnych mężczyzn.

Zarówno wyżej opisane badania, jak i wyniki z prac poprzednich (o charakterze cytogenetycznym) przyczyniły się do otrzymania projektu grantowego Sonata Bis NCN: *Badanie lokalizacji chromosomów w ludzkich plemnikach o różnym stopniu integralności chromatyny oraz różnicach w poziomie markerów epigenetycznych, z uwzględnieniem kariotypów oraz poszczególnych frakcji plemnikowych, 2020/38/E/NZ2/00134* (2021-2026, kierownik projektu: dr M. Olszewska) łączącego zagadnienia cytogenetyki, epigenetyki i przestrzennej organizacji jądra komórkowego plemnika. Jednym z pierwszych efektów realizacji projektu jest **praca P6** włączona do cyklu prac.

- P6** Odronec A, **Olszewska M\***, Kurpisz M: *Epigenetic markers in the embryonal germ cell development and spermatogenesis*. Basic and Clin Androl, 2023, 33: 6  
opublikowano: luty 2023  
IF<sub>2022</sub> 2,886 IF<sub>5-letni</sub> 3,262 MEiN 70  
\*autor korespondujący

**Praca P6** stanowi zebranie obecnej wiedzy i poglądów dotyczących roli znaczników epigenetycznych w rozwoju zarodkowych komórek płciowych i spermatogenezie. Założeniem było scharakteryzowanie poznanych dotychczas zmian epigenetycznych, zarówno DNA jak i histonów, a następnie umiejscowienie ich w szczegółowym opisie kolejnych etapów i stadiów spermatogenezy, rozpoczynając od rozwoju macierzystych komórek rozrodczych, poprzez podziały mitotyczne i mejotyczne, a kończąc na w pełni uformowanej męskiej gamecie – plemniku. Omówione zostały również białka biorące udział w spermatogenezie, w tym: poszczególne warianty histonowe, białka przejściowe oraz protaminy. Całość uzupełniono o zestawienie wyników badań modeli mysich nad enzymami powiązаныmi z regulacją epigenetyczną, istotnymi dla przebiegu spermatogenezy. Zebranie wszystkich danych pozwoliło na uzyskanie pełnego obrazu znaczenia epigenetyki dla powstawania męskich komórek płciowych oraz ryzyka potencjalnych zaburzeń dla płodności, procesu zapłodnienia czy zdrowia potomstwa.

### Podsumowanie najważniejszych wyników z przeprowadzonych badań

1. Scharakteryzowano unikatowe rearanżacje chromosomowe na poziomie molekularnym.
2. Wykazano negatywny wpływ występowania aberracji chromosomowych na:
  - przebieg spermatogenezy
  - organizację jądra komórkowego plemnika.
3. Potwierdzono występowanie obniżonych parametrów nasienia u nosicieli aberracji chromosomowych.
4. Potwierdzono występowanie wysokiej zmienności międzyosobniczej w badanych grupach pacjentów z niepowodzeniami rozrodu, niezależnie od kariotypu.
5. Wykazano związek poziomu metylacji i hydrosymetylacji DNA plemnikowego:
  - ze stopniem protaminacji chromatyny, w tym: poprzez utworzenie algorytmu barwienia sekwencyjnego umożliwiającego pokazanie i ocenę zmian epigenetycznych w różnych frakcjach plemnikowych
  - z ruchliwością i morfologią plemników u pacjentów o obniżonych parametrach nasienia.

---

**Literatura**

- Agarwal A.: *Male infertility*. Lancet, 2021, 397, 319-333.
- Aston K.I., Uren P.J., Jenkins T.G., Horsager A., Cairns B.R., Smith A.D., Carrell D.T. *Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality*. Fertil Steril, 2015, 104, 1388-1397.e5.
- Björndahl L., Barratt C.L.R., Mortimer D., Agarwal A., Aitken R.J. i wsp.: *Standards in semen examination: publishing reproducible and reliable data based on high-quality methodology*. Hum Reprod, 2022, 37, 2497-2502.
- Bonduelle M., Van Assche E., Joris H., Keymolen K., Devroey P., Van Steirteghem A. i wsp.: *Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters*. Hum Reprod, 2002, 17, 2600-2614.
- Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G., Sion B., Boucher D., i wsp.: *Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients*. Hum Reprod, 2006, 21: 685-93.
- Brunet B.C.F.K., Shen J., Cai L., Xie J., Cui Y., Liu J. i wsp.: *Preimplantation genetic testing for complex chromosomal rearrangement carriers by next-generation sequencing*. Reprod Biomed Online, 2018, 37, 375-382.
- Del Llano E., Perrin A., Morel F., Devillard F., Harbuz R. i wsp.: *Sperm Meiotic Segregation Analysis of Reciprocal Translocations Carriers: We Have Bigger FISH to Fry*. Int J Mol Sci, 2023, 24, 3664.
- Di Persio S., Leitão E., Wöste M., Tekath T., Cremers J.F., Dugas M., Li X., zu Hörste G.M., Kliesch S., Laurentino S., Neuhaus N., Horsthemke B.: *Whole-genome methylation analysis of testicular germ cells from cryptozoospermic men points to recurrent and functionally relevant DNA methylation changes*. Clin Epigenet, 2021, 13, 160.
- Escudero T., Estop A., Fischer J., Munne S.: *Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements*. Am J Med Genet A, 2008, 146A, 1662-1669.
- Ferfour F., Biotrelle F., Tapia S., Gomes D.M., Selva J., Vialard F.: *Sperm FISH analysis of a 46,XY,t(3;6)(p24;p21.2), inv(8)(p11;2q21.2) double chromosomal rearrangement*. Reprod Biomed Online, 2012, 24 219-223.
- Farkouh A., Agarwal A., Hamoda T.A.A., Kavoussi P., Saleh R., Zini A. i wsp.: *Controversy and Consensus on the Management of Elevated Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations*. World J Mens Health, 2023, doi: 10.5534/wjmh.230008.
- Giardino D., Corti C., Ballarati L., Colombo D., Sala E., Villa N. i wsp.: *De novo balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis*. Prenat Diagn, 2009, 29, 257-265.
- Godo A., Blanco J., Vidal F., Anton E.: *Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers*. Hum Reprod, 2013, 28, 840-849.
- Gunes S., Arslan M.A., Hekim G.N.T., Asci R.: *The role of epigenetics in idiopathic male infertility*. J Assist Reprod Genet, 2016, 33, 553-569.
- Greaves I.K., Rens W., Ferguson-Smith M.A., Griin D., Marshall Graves J.A. *Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance*. Chromosome Res, 2003, 11, 503-512.
- Halgren C., Nielsen N.M., Nazaryan-Petersen L., Silahtaroglu A., Collins R.L., Lowther C. i wsp.: *Risks and recommendations in prenatally detected de novo balanced chromosomal rearrangements from assessment of long-term outcomes*. Am J Hum Genet, 2018, 102, 1090-1103.
- Harton G.L., Tempest H.G.: *Chromosomal disorders and male infertility*. Asian J Androl, 2012, 14, 32-39.
- Houston B.J., Riera-Escamilla A., Wyrwoll M.J., Salas-Huetos A., Xavier M.J., Nagirnaja L., Friedrich C., i wsp.: *A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships*. Hum Reprod Update, 2021, 1355-4786.



- Hristova R., Ko E., Greene C., Rademaker A., Chernos J., Martin R.: *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia*. Biol Reprod, 2002, 66, 1781-1783.
- Ioannou D., Millan N.M., Jordan E., Tempest H.G.: *A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions*. Sci Rep, 2017, 7, 41585.
- Ke Y., Xu Y., Chen X., Fen S., Liu Z., Sun Y., i wsp.: *3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis*. Cell, 2017, 170, 367-381.
- Kim J.W., Chang E.M., Song S.H., Park S.H., Yoon T.K., Shim S.H.: *Complex chromosomal rearrangement in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis*. Fertil Steril, 2011, 95, 349-352.
- Krausz C., Riera-Escamilla A.: *Genetics of male infertility*. Nat Rev Urol, 2018, 15, 369-384.
- Levine H., Jørgensen N., Martino-Andrade A., Mendiola J., Weksler-Derri D., Mindlis I., Pinotti R., Swan S.H.: *Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis*. Hum Reprod Update, 2017, 23, 646-659.
- Li G., Shi W., Niu W., Xu J., Guo Y., Su Y., Sun Y.: *The influence of balanced complex chromosomal rearrangements on preimplantation embryonic development potential and molecular karyotype*. BMC Genomics, 2020, 21, 326.
- Liehr, T.: *Small supernumerary marker chromosomes*. <http://ssmc-tl.com/sSMC.html>
- Luján S., Caroppo E., Niederberger C., Arce J.-C., Sadler-Riggelman I., Beck D., Nilsson E., Skinner M.K.: *Sperm DNA methylation epimutation biomarkers for male infertility and FSH therapeutic responsiveness*. Sci Rep, 2019, 9, 16786.
- Machev N., Gosset P., Warter S., Treger M., Schillinger M., Viville S.: *Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect*. Fertil Steril, 2005, 84, 365-373.
- Madan K.: *Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review*. Am J Med Genet, 2012, 158A, 947-963.
- Montjean D., Zini A., Ravel C., Belloc S., Dalleac A., Copin H., Boyer P., McElreavey K., Benkhalifa M.: *Sperm global DNA methylation level: Association with semen parameters and genome integrity*. Andrology, 2015, 3, 235-240.
- Manvelyan M. i wsp.: *Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature*. Int J Mol Med, 2008, 21, 705-714.
- Miharu N.: *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia*. Cytogenet Genome Res, 2005, 111, 347-351.
- Nagirnaja L, Lopes AM, Charng WL, Miller B, Stakaitis R. i wsp.: *Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure*. Nat Commun, 2022, 13, 7953.
- Ogur C., Kahraman S., Griffin D.K., Cinar Yapan C., Tufekci M.A. i wsp.: *PGT for structural chromosomal rearrangements in 300 couples reveals specific risk factors but an interchromosomal effect is unlikely*. Reprod Biomed Online, 2023, 46, 713-727.
- Okubo T., Onda N., Hayashi T., Kobayashi T., Omi K., Segawa T.: *Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes*. BMC Urol, 2023, 23, 78.
- Oliver-Bonet M., Ko E., Martin R.H.: *Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair*. Cytogenet Genome Res, 2005, 111, 343-346.
- Olszewska M., Fraczek M., Huleyuk N., Czernikiewicz A., Wiland E., Boksa M., Zastavna D., Panasiuk B., Midro A.T., Kurpisz M.: *Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation carriers (RCT) with known meiotic segregation patterns*. Reprod Biol, 2013, 13, 209-220.

- Olszewska M., Wiland E., Huleyuk N., Fraczek M., Midro A.T., Zastavna D., Kurpisz M.: *Chromosome (re)positioning in spermatozoa of fathers and sons - carriers of reciprocal chromosome translocation (RCT)*. BMC Med Genomics, 2019, 12, 30.
- Perrin A., Caer E., Oliver-Bonet M., Navarro J., Benet J. i wsp.: *DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality*. Fertil Steril, 2009, 92, 583-589.
- Perrin A., Nguyen M.H., Bujan L., Vialard F., Amice V., Gueganic N., Douet-Guilbert N., De Braekeleer M., Morel F.: *DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement*. Andrology, 2013, 1, 632-638.
- Ribas-Maynou J., Abad C., Garcia-Segura S., Oliver-Bonet M., Prada E., Amengual M.J., Navarro J., Benet J.: *Sperm chromatin condensation and single- and double-stranded DNA damage as important parameters to define male factor related recurrent miscarriage*. Mol Reprod Dev, 2020, 87, 1126-1132.
- Riera-Escamilla A., Vockel M., Nagirnaja L., Xavier M.J., Carbonell A. i wsp.: *Large-scale analyses of the X chromosome in 2,354 infertile men discover recurrently affected genes associated with spermatogenic failure*. Am J Hum Genet, 2022, 109, 1458-1471.
- Rives N.M.D.: *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia*. Cytogenet Genome Res, 2005, 111, 172-176.
- Sciurano R.B., Rahn M.I., Rey-Valzacchi G., Coco R., Solari A.J. *The role of asynapsis in human spermatocyte failure*. Int J Androl, 2012, 35, 541-549.
- Smits R.M., Xavier M.J., Oud M.S., Astuti G.D.N., Meijerink A.M. i wsp.: *De novo mutations in children born after medical assisted reproduction*. Hum Reprod, 2022, 37, 1360-1369.
- Sujit K.M., Sarkar S., Singh V., Pandey R., Agrawal N.K., Trivedi S., Singh K., Gupta G., Rajender S.: *Genome-wide differential methylation analyses identifies methylation signatures of male infertility*. Hum Reprod, 2018, 33, 2256-2267.
- Tang S.S., Gao H., Zhao Y., Ma S.: *Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm*. Int J Androl, 2010, 33, e163-e179.
- Tempest H.G., Griffin D.K. *The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy*. Cytogenet Genome Res, 2004, 107, 83-94.
- Tong J., Jiang J., Niu Y., Zhang T.: *Do chromosomal inversion carriers really need preimplantation genetic testing?* J Assist Reprod Genet, 2022, 39, 2573-2579.
- Trunca C., Mendell N.R., Schilit S.L.P.: *Reproductive risk estimation calculator for balanced translocation carriers*. Curr Prot, 2022, 2, e633.
- Uroz L., Templado C.: *Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males*. Hum Reprod, 2012, 27, 1518-1524.
- Vallet-Buisan M., Mecca R., Jones C., Coward K., Yeste M.: *Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond*. Hum Reprod Update, 2023, doi: 10.1093/humupd/dmad006
- Verges L., Blanco J., Valero O., Vidal F., Sarrate Z.: *Chromosome size, morphology, and gene density determine bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes*. Fertil Steril, 2014, 101, 818-824.
- Wiland E., Fraczek M., Olszewska M., Kurpisz M.: *Topology of chromosome centromeres in human sperm nuclei with high level of DNA damage*. Sci Rep, 2016, 6, 31614.
- Wiland E., Olszewska M., Woźniak T., Kurpisz M.: *How much, if anything, do we know about sperm chromosomes of Robertsonian translocation carriers?* Cell Mol Life Sci, 2020, 77, 4765-4785.
- Wu J., Xu J., Liu B., Yao G., Wang P., Lin Z. i wsp.: *Chromatin analysis in human early development reveals epigenetic transition during ZGA*. Nature, 2018, 557, 256-260.

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

Opis pozostałych kierunków badawczych, w które byłam lub jestem zaangażowana, poza osiągnięciem wynikającym z art. 219 ust. 1. pkt. 2b Ustawy

### Lokalizacja chromosomów w jądrze komórkowym ludzkiego plemnika

Z Instytutem Genetyki Człowieka PAN związana jestem od roku 2004, kiedy to w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych (kierownik: prof. dr hab. M. Kurpisz) rozpoczęłam realizację mojej pracy magisterskiej pt.: „*Topologia chromosomów w jądrze komórkowym ludzkiego plemnika*”. Zakres moich wczesnych zainteresowań badawczych obejmował poszukiwanie potencjalnych zmian w organizacji przestrzennej jądra komórkowego ludzkiego plemnika u pacjentów z niepowodzeniami rozrodu będących jednocześnie nosicielami translokacji chromosomowych wzajemnych lub wykazujących podwyższony poziom aneuploidii w plemniku. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy magisterskiej zostały opublikowane w formie czterech artykułów naukowych – dwóch poglądowych (obydwa w *Post Hig Med Dośw*, 2006) oraz dwóch oryginalnych (obydwa w prestiżowym piśmie cytogenetycznym *Chromosome Res*, 2008). Nasze prace wpisały się w dane światowe i jako pierwsi wykazaliśmy zmiany w lokalizacji chromosomów nosicieli TCW (badaliśmy centromery chromosomów: 7, 9, X i Y) oraz u pacjentów o podwyższonym poziomie aneuploidii (centromery chromosomów: 15, 18, X i Y). Wyniki jasno wskazywały na wysoką heterogenność lokalizacji chromosomów w grupach pacjentów wobec płodnej grupy kontrolnej, tym samym determinując powiększenie obszaru chromocentrum w stronę akrosomu (grupa TCW) oraz przesunięcie chromocentrum w głąb jądra komórkowego plemnika. Wątek ten kontynuowany był przez kolejne lata poszerzając zarówno grupę chromosomów badanych jak i grupy pacjentów o kolejnych nosicieli TCW [*BMC Med Genomics*, 2019], w tym dwa rodzinne przypadki ojców i synów, u których zaobserwowaliśmy podobne zmiany lokalizacji chromosomów (także i fragmentów chromocentrum) wobec kontroli. Ciekawostką jest to, że różnice w lokalizacji chromosomów wykryto także pomiędzy ojcem a synem, a wynikały one prawdopodobnie z różnic w stopniu integralności chromatyny plemnikowej. Analiza większej liczby chromosomów (4, 7, 8, 9, 10, 11, 18, X, Y) pozwoliła także na ugruntowanie pozycji centromerów, zgrupowanych w trzech fragmentach chromocentrum. Udokumentowaliśmy również nadrzędną rolę kariotypu (w tym proporcję fragmentu translokowanego wobec ramienia chromosomu) oraz hiperhaploidii w zaburzeniach lokalizacji chromosomów (liczba zmian) wobec stopnia protaminacji chromatyny oraz fragmentacji DNA plemnikowego (kierunek przesunięć). Wyniki te stanowiły także jedną z części mojej pracy doktorskiej.

Jako pierwsi wykazaliśmy także zmiany w lokalizacji obszarów jąderkotwórczych (NOR – ang. *nucleolar organizing region*; zlokalizowanych na krótkich ramionach chromosomów akrocentrycznych) w układzie: nosiciele translokacji Robertsonowskich vs. kontrola [*Sci Rep*, 2019]. U nosicieli RobT lokalizacja ta była przesunięta w stronę peryferium części apikalnej jądra komórkowego plemnika, a liczba skupisk w których były obserwowane wynosiła 3 u nosicieli RobT wobec 2 w plemnikach kontrolnych. Podjęliśmy także pionierskie badanie lokalizacji chromosomów w plemnikach pacjentów o wysokim stopniu fragmentacji DNA plemnikowego [*Sci Rep*, 2016]. Wykonując FISH bezpośrednio na plemnikach analizowanych testem

TUNEL wykazaliśmy różnice w pozycjonowaniu badanych centromerów między plemnikami z fragmentacją DNA (komórki apoptotyczne wybarwione pozytywnie) a plemnikami prawidłowymi (niewybarwionymi).

Dotychczas opublikowano jedynie 22 prace doświadczalne dotyczące lokalizacji chromosomów w jądrze komórkowym plemnika, z czego sześć prac stanowi nasz wkład w literaturę światową [włączając publikację P2 cyklu]. Część poniższych prac powstała we współpracy z: *Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences, Lviv* (prof. dr hab. Zastavna, dr Huleyuk), *Zakładem Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku* (prof. dr hab. A.T. Midro) oraz *Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow* (dr hab. V.B. Chernykh). Wyniki zostały także zaprezentowane jako 11 doniesień konferencyjnych (**Załącznik 4**).

**Żegała M**, Wiland E, Kurpisz M: *Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Diploidalna komórka somatyczna. Część 1*. Post Hig Med Dośw, 2006, 60: 331-342

Wiland E, **Żegała M**, Kurpisz M: *Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Plemnik. Część 2*. Post Hig Med Dośw, 2006, 60: 343-351

Wiland E, **Żegała M**, Kurpisz M: *Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations*. Chromosome Res, 2008,16: 291-305

**Olszewska M**, Wiland E, Kurpisz M: *Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy*. Chromosome Res, 2008, 16: 875-890

Wiland E, Frączek M, **Olszewska M**, Kurpisz M: *Topology of chromosome centromeres in human sperm nuclei with high levels of DNA damage*. Sci Reports, 2016, 6:31614

Wiland E, **Olszewska M**, Huleyuk N, Chernykh VB, Kurpisz M: *The effect of Robertsonian translocations on the intranuclear positioning of NORs (nucleolar organizing regions) in human sperm cells*. Sci Reports, 2019, 9: e2213

**Olszewska M**, Wiland E, Huleyuk N, Frączek M, Midro AT, Zastavna D, Kurpisz M: *Chromosome (re)positioning in spermatozoa of fathers and sons – carriers of reciprocal chromosome translocation (RCT)*. BMC Med Genomics, 2019, 12: 30

### Cytogenetyka nosicieli aberracji chromosomowych

Realizując założenia mojej rozprawy doktorskiej, kontynuowałam tematykę cytogenetyki u nosicieli aberracji chromosomowych, skupiając się na charakterystyce samej rearanżacji, badaniu wzorów segregacji mejotycznej i poziomu aneuploidii w plemniku, a także na analizie integralności chromatyny plemnikowej. Należy zaznaczyć, że badania wzoru segregacji mejotycznej zostały zapoczątkowane w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych ok. 20 lat temu podążając za światową nowością, którą było zastosowanie FISH do analizy chromosomów plemnika. Około 10% wszystkich opublikowanych wzorów segregacji pochodzi z naszego laboratorium, co stanowi cenny wkład w poradnictwo genetyczne. W naszych pracach udokumentowaliśmy unikatowość wzoru segregacji dla każdej translokacji chromosomowej wzajemnej (TCW) badanej przez nas, jak również wykazaliśmy podobieństwo wzorów segregacji u nosicieli o tych samych lub podobnych punktach złamań chromosomów [*Reprod Biol*, 2013; *J Hum Genet*, 2014]. Ponadto z mojej inicjatywy do rutynowej analizy laboratoryjnej wprowadziliśmy ocenę stopnia protaminacji chromatyny plemnikowej badanej za pomocą barwienia kwaśnym błękitem aniliny, a wyniki analiz integralności chromatyny wykazały jej obniżenie u nosicieli aberracji chromosomowych. Z kolei u nosicieli translokacji Robertsonowskich (zarówno często „common” jak i rzadko „rare” spotykanych) wykazaliśmy odsetek genetycznie prawidłowych lub zrównoważonych plemników na poziomie >75%, co wpisuje się w dane literaturowe dla tej grupy pacjentów, a zebrane i podsumowane przez nas w najszerszym dostępnym

dotychczas opracowaniu [*Cell Mol Life Sci*, 2020] obejmującym także aspekt geometrii chromosomów zaangażowanych w aberracje [*Sci Rep*, 2019; *Cell Mol Life Sci*, 2020; *Post Hig Med Dośw*, 2021]. Dla obu grup nosiciele aberracji chromosomowych określiliśmy także poziom aneuploidii (w większości podwyższony) dla szeregu chromosomów, a otrzymane wyniki wskazują na heterogenność wyników w tej grupie niepłodności męskiej.

Oczywiście badaniu zmian chromosomowych i chromatynowych w plemniku towarzyszyła szczegółowa charakterystyka kariotypu. Oprócz standardowej oceny cytogenetycznej (prążkowanie), dla każdego przypadku wykonaliśmy barwienia FISH pozwalające na potwierdzenie lub uściślenie punktów złamań chromosomów zaangażowanych w daną aberrację. Zapoczątkowałam także badania wysokorozdzielczej hybrydyzacji aCGH dla wybranych przypadków, a otrzymane wyniki pozwoliły na pełną charakterystykę mężczyzn z azoospermią – nosiciele unikatowych rearanżacji: (i) pomiędzy chromosomami 9 i 13 [*Mol Cytogenet*, 2014] oraz (ii) chromosomu pochodnego der(Y) o nietypowej strukturze [*Reprod Biomed Online*, 2015]. W przypadku t(9;13) oprócz translokacji pomiędzy całym ramieniem q obu chromosomów, udokumentowaliśmy duplikację ramienia 13p oraz uformowanie się neocentromeru na chromosomie pochodnym der(9). Co więcej, w ejakulacie pacjenta zaobserwowaliśmy złuszczające się komórki szlaku spermatogenezy, co pozwoliło nam na określenie proporcji poszczególnych typów komórek mejotycznych, a także udokumentowanie kompleksu chromosomów (złożonego z chromosomów: 9, 13, biwalentu XY oraz autosomów: 5 i 22) na etapie pachytenu, co stanowiło bezpośrednią przyczynę obserwowanej azoospermii. W przypadku pacjenta z nieprawidłowym chromosomem Y, scharakteryzowaliśmy jego strukturę, w której wykazaliśmy zduplikowany fragment ramienia Yq wraz z delecją fragmentu regionu pseudoautosomalnego PAR1 (bierze udział w koniugacji na etapie pachytenu), co stanowiło przyczynę obserwowanej azoospermii.

Część opisanych wyżej wyników stanowiło także część mojej pracy doktorskiej [*Reprod Biol*, 2013; *Mol Cytogenet*, 2014]. Kontynuację analizy rzadkich (nietypowych) przypadków aberracji strukturalnych chromosomów u mężczyzn niepłodnych stanowiły **prace: P1 i P3 cyklu** (opisana w części IV Autoreferatu, str. 12). Wyniki zostały także zaprezentowane jako 23 doniesienia konferencyjne (**Załącznik 4**).

Poniższe prace (6 z 7) są wynikiem współpracy z: *Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences, Lviv* (prof. dr hab. Zastavna, dr Huleyuk), *Zakładem Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku* (prof. dr hab. A.T. Midro), *Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow* (dr hab. V.B. Chernykh), *University of Pittsburgh, PA, USA* (prof. dr A.N. Yatsenko) oraz z *Kliniką Leczenia Niepłodności „Novum”*, Warszawa (dr J.K. Wolski).

**Olszewska M**, Fraczek M, Huleyuk N, Czernikiewicz A, Wiland E, Boksa M, Zastavna D, Panasiuk B, Midro AT, Kurpisz M: *Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation carriers (RCT) with known meiotic segregation patterns*. *Reprod Biol*, 2013, 13: 209-220

Wiland E, **Olszewska M**, Georgiadis A, Huleyuk N, Panasiuk B, Zastavna D, Yatsenko SA, Jedrzejczak P, Midro AT, Yatsenko AN, Kurpisz M: *Cytogenetic and molecular analysis of chromosomes de novo translocation dic(9;13)(p11.2;p12) infertile male*. *Mol Cytogenet*, 2014, 7: 14

Midro AT, Panasiuk B, Stasiewicz-Jarocka B, **Olszewska M**, Wiland E, Myśliwiec M, Kurpisz M, Shaffer LG, Gajecka M: *Recurrence risks for different pregnancy outcomes and meiotic segregation analysis of spermatozoa in carriers of t(1;11)(p36.22;q12.2)*. *J Hum Genet*, 2014, 59: 667-674

Wiland E, Yatsenko AN, Kishore A, Stanczak H, Zdzarta A, Ligaj M, **Olszewska M**, Wolski JK, Kurpisz M: *FISH and array CGH characterization of de novo derivative Y chromosome (Yq duplication and partial Yp deletion) in an azoospermic male*. *Reprod Biomed Online*, 2015, 31: 217-224

Wiland E, **Olszewska M**, Huleyuk N, Chernykh VB, Kurpisz M: *The effect of Robertsonian translocations on the intranuclear positioning of NORs (nucleolar organizing regions) in human sperm cells*. Sci Reports, 2019, 9: e2213

Wiland E, **Olszewska M**, Wanowska E, Wozniak T, Kurpisz M: *How much, if anything, do we know about sperm chromosomes of Robertsonian translocation carriers?* Cell Mol Life Sci, 2020,77: 4765-4785

**Olszewska M**, Wiland E, Wanowska E, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, Kurpisz M: *Analysis of sperm chromosomes in six carriers of rare and common Robertsonian translocations*. PostHig Med Dosw, 2021, 75: 199-210

### Podłoże genowe niepłodności męskiej

Od ok. 10 lat uczestniczę także w badaniach wielośrodkowych mających na celu poszukiwanie nowych wariantów genowych odpowiedzialnych za niepłodność męską. Dotychczas w badaniach koordynowanych przez ośrodek w Pittsburghu, USA (prof. AN Yatsenko) odkryliśmy warianty genetyczne warunkujące wystąpienie azoospermii w genach: *TEX11*, *GCNA* oraz *TEX15* [*New Engl J Med.*, 2015, *Hum Genet*, 2021, *Front Genet*, 2023]. Do tego celu zastosowaliśmy sekwencjonowanie całogenomowe WGS (ang. *whole genome sequencing*) lub eksomowe WES (ang. *whole exome sequencing*), mikromacierze aCGH, a także sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek scRNAseq (ang. *single-cell sequencing*) tkanki jądra, które pozwoliło na szczegółowe określenie typów komórek szlaku spermatogenezy wykazujących ekspresję badanego genu (*TEX15*: wszystkie typy komórek gametogenicznych, ekspresja tkankowo specyficzna; *GCNA*: ekspresja od etapu spermatogonii do spermatyd wydłużonych). *TEX11* z kolei wykazywał ekspresję od spermatocytów II-rzędu do etapu spermatyd wydłużonych, a badania zostały wykonane na bazie pilotażowej grupy pacjentów m.in. z naszego Zakładu. Udokumentowanie patologicznych wariantów genów *TEX11* oraz *GCNA* w azoospermii stanowiło pionierskie doniesienia dla człowieka. Badania wariantów genu *TEX15* uwypukliło zróżnicowany stopień upośledzenia spermatogenezy w zależności od układu (homozygota vs. heterozygota złożona ang. *compound*). Kolejne warianty genetyczne dla 39 azoospermików zostały określone w badaniach koordynowanych przez dr Agnieszkę Malcher z naszego Zakładu [*Andrology*, 2022], co poszerzyło listę genów kandydujących dla azoospermii oraz wykazało wyższą efektywność sekwencjonowania WGS wobec WES (u 5/6 pacjentów poddanych pierwotnie WES dopiero WGS pozwoliło na wykrycie wariantów przyczynowych).

Badania podłoża genowego w męskiej niepłodności wykonane zostały nie tylko dla grup z azoospermią lecz także dla mężczyzn o obniżonej liczbie plemników w nasieniu – od oligozoospermii do kryptozoospermii [*J Assist Reprod Genet*, 2022]. Stosując kombinację technik WES i aCGH wykryto szereg zmian liczby kopii (CNV, ang. *copy numer variation*) lub pojedynczych wariantów nukleotydowych (SNV, ang. *single nucleotide variant*) u 15% pacjentów, co znakomicie wydaje się podkreślać potrzebę analiz genomowych na etapie diagnostyki u pacjentów z niepłodnością o podłożu idiopatycznym.

Wspólne badania z Uniwersytetem w Pittsburghu, USA, zaowocowały także rozszerzeniem aktywności w zakresie badań genomowych o mysie modele typu *knockout* niepłodności męskiej. Selekcja potencjalnych genów kandydujących na bazie danych z sekwencjonowania oraz aCGH pozwoliła skutecznie zaaplikować o projekt grantowy Narodowego Centrum Nauki (2015/17/B/NZ2/01157 (2016-2020): *Poszukiwanie genów krytycznych dla oligo- i azoospermii u człowieka – mysy model doświadczalny typu 'knockout'*), wzbogacając nasz warsztat o badania *in vivo*. W ramach projektu utworzyliśmy cztery linie doświadczalne dla czterech wybranych genów. Wyniki pierwszych badań [*Hum Reprod Open*, 2023] wykazały wpływ mutacji w genie *Tcte1* jako kluczowych w etiopatogenezie astenozoospermii w stopniu

uniemożliwiającym zapłodnienie w sposób naturalny, jak również stojących u podstaw oligo- i teratozoospermii przy udziale mechanizmu haploinsuficencji. Badania nadal są kontynuowane.

Wyniki zostały zaprezentowane dotychczas w formie 18 doniesień konferencyjnych (**Załącznik 4**). Głównymi ośrodkami badawczymi, z którymi były możliwe powyższe odkrycia są: *University of Pittsburgh, PA, USA* (prof. dr A.N. Yatsenko), *University of Bergen, Norway* (dr hab. T. Stokowy), *Institute of Reproductive Genetics, Münster, Niemcy* (prof. F. Tüttelmann), *Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu* (prof. dr hab. Piotr Jędrzejczak) oraz *Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu* (dr inż. J. Suszyńska-Zajczyk, prof. dr hab. H. Jackowiak).

Yatsenko AN, Georgiadis AP, Ropke A, Berman AJ, Jaffe T, **Olszewska M**, Westernstroer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, Yatsenko SA, Kliesch S, Schlatt S, Tüttelmann F: *Mutations in X-linked TEX11 cause meiotic arrest and azoospermia*. *New Engl J Med*, 2015, 372: 2097-2107

Hardy JJ, Wyrwoll MJ, Mcfadden W, Malcher A, Rotte N, Pollock NC, Munyoki S, Veroli MV, Houston BJ, Xavier MJ, Kasak L, Punab M, Laan M, Kliesch S, Schlegel P, Jaffe T, Hwang K, Vukina J, Brieño-Enríquez MA, Orwig K, Yanowitz J, Buszczak M, Veltman JA, Oud M, Nagirnaja L, **Olszewska M**, O'Bryan MK, Conrad DF, Kurpisz M, Tüttelmann F, Yatsenko AN: GEMINI Consortium. *Variants in GCNA, X-linked germ-cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure*. *Hum Genet*, 2021,140: 1169-1182

Hardy JJ, Pollock N, Gingrich T, Sweet P, Ramesh A, Kuong J, Basar A, Jiang H, Hwang K, Vukina J, Jaffe T, **Olszewska M**, Kurpisz M, Yatsenko AN: *Genomic testing for copy number and single nucleotide variants in spermatogenic failure*. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39: 2103-2114

Malcher A, Stokowy T, Berman A, **Olszewska M**, Jędrzejczak P, Sielski D, Nowakowski A, Rozwadowska N, Yatsenko AN, Kurpisz M: *Whole genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia*. *Andrology*, 2022, 10: 1605-1624

Qureshi S, Hardy JJ, Pombar C, Berman AJ, Malcher A, Gingrich T, Hvasta R, Kuong J, Munyoki S, Hwang K, Orwig KE, Ahmed J, **Olszewska M**, Kurpisz M, Conrad DF, Kahn MJ, Yatsenko AN: *Genomic study of TEX15 variants: Prevalence and allelic heterogeneity in men with spermatogenic failure*. *Front Genet*, 2023, 14: 1134849

**Olszewska M**, Malcher A, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Suszyńska-Zajczyk J, Jackowiak H, Jędrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M: *Tcte1 knockout influence on energy chain transportation, apoptosis and spermatogenesis – implications for male infertility*. *Hum Reprod Open*, 2023; preprint: medArxiv doi: 10.1101/2022.11.17.22282339 – praca na etapie rewizji (praca oryginalna)

*Badania, w które zaangażowana byłam lub jestem drugoplanowo:*

### **Proteom plemnika**

Z pojęciem niepłodności męskiej związany jest także proteom plemnika, czyli białkowy komponent komórki. W naszym Zakładzie również ten aspekt badań jest analizowany, a ostatnio otrzymane wyniki pozwoliły na wyselekcjonowanie 25 białek plazmy nasiennej wykazujących silny związek z astenozoospermią, głównie poprzez wpływ na mitochondrialną maszynę energetyczną plemnika [*J Physiol Pharmacol*, 2018]. Z kolei białko HSPA2 zostało ugruntowane jako kluczowe dla powodzenia zapłodnienia, szczególnie w przypadku kryptozoospermii, a jego rola jako potencjalnego biomarkera prawidłowego przebiegu spermatogenezy wydaje się być ugruntowana [*Reprod Biol*, 2022].

Nowicka-Bauer K., Lepczyński A, Ozgo M, Kamieniczna M, Frączek M, Stański L, **Olszewska M**, Malcher A, Skrzypczak W, Kurpisz MK: *Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia*. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69: 403-417

Nowicka-Bauer K, Malcher A, Włoczkowska O, Kamieniczna M, **Olszewska M**, Kurpisz MK: *Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status*. *Reprod Biol*, 2022,22: 100597

## Komórki macierzyste mięśnia sercowego

W latach 2006-2013 byłam także zaangażowana w badania nad komórkami macierzystymi mięśnia sercowego prowadzonymi w naszym Zakładzie w ujęciu modelu mysiego w sercu pozawałowym. Obserwacje echokardiografii serca w układzie: po zawale vs. serce zdrowe pozwoliły na uzyskanie wysokiej powtarzalności wyników umacniając znaczenie badania echokardiograficznego u myszy jako informatywne dla celów poznawczych [*J Cardiovasc Med.*, 2013]. Ponadto wykonałam barwienia FISH do jąder komórkowych aktywnie dzielących się mioblastów oraz miotub, co umożliwiło wykonanie porównawczej analizy zmian architektury wewnątrzjądrowej (w tym istotne różnice w lokalizacji wybranych chromosomów) w trakcie różnicowania się komórek [*PLoS One*, 2013].

Wyniki zostały także zaprezentowane jako 10 doniesień konferencyjnych (**Załącznik 4**).

Szymczyk E, Lipiec P, Plewka M, Białas M, **Olszewska M**, Rozwadowska N, Kamiński K, Kurpisz M, Michalski B, Kasprzak JD: *Feasibility of strain and strain rate evaluation by two-dimensional speckle tracking in murine model of myocardial infarction: comparison with tissue Doppler echocardiography*. *J Cardiovasc Med*, 2013, 14: 136-143

Rozwadowska N, Kolanowski T, Wiland E, Siatkowski M, Pawlak P, Malcher A, Miętkiewski T, **Olszewska M**, Kurpisz M: *Characterization of nuclear architecture alterations during in vitro differentiation of human stem cells of myogenic origin*. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73231

## Nowe kierunki badawcze

Obecnie skupiam się na realizacji projektu grantowego Sonata Bis (Narodowe Centrum Nauki, 2020/38/E/NZ2/00134, „*Badanie lokalizacji chromosomów w ludzkich plemnikach o różnym stopniu integralności chromatyny oraz różnicach w poziomie markerów epigenetycznych, z uwzględnieniem kariotypów oraz poszczególnych frakcji plemnikowych*”), w którym łączę zagadnienia cytogenetyczne z epigenetycznymi (m.in. opisanymi w **pracach P4, P5 i P6**, a których byłam inicjatorką w naszym Zakładzie), włączając w to kontekst integralności chromatyny plemnika oraz badań na poziomie pojedynczych komórek (barwienia sekwencyjne). Projekt ten stwarza nowe szanse poznawcze dla wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za organizację jądra komórkowego plemnika w aspekcie niepłodności męskiej. Oprócz standardowych metod doświadczalnych (m.in. FISH, czy immunofluorescencja), planuję poszerzenie warsztatu o najnowsze techniki mapowania optycznego genomu (OGT, ang. *optical genomic mapping*), czy analiz z zakresu ustalania konformacji chromosomu poprzez interakcje pomiędzy konkretnymi fragmentami (domenami) chromosomów (ang. *chromosome conformation capture* (Hi-C)). Pozwoli to na odkrycie i/lub scharakteryzowanie nowych mechanizmów i wprowadzenie nowej jakości badawczej, w szczególności dla nosicieli aberracji chromosomowych. Dotychczasowe wyniki badań zostały zaprezentowane w formie 7 doniesień konferencyjnych.

Ponadto nadal aktywnie kontynuuję zagadnienia badań genomowych w modelu mysim spermatogenezy skupiając się na analizie genów związanych nie tylko z całkowitym brakiem plemników w ejakulacie (azoospermia), ale również w aspekcie obniżonych parametrów nasienia, takich jak ruchliwość czy morfologia. Podjęcie współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym (dr inż. J. Suszyńska-Zajczyk) stwarza nowe możliwości eksperymentalne prowadzonych badań. A to razem z powiększającą się naszą bazą próbek od mężczyzn niepłodnych oraz prowadzonymi współpracami (USA, Turcja, kliniki w Polsce) pozwoli pójść w kierunku stworzenia panelu genowego dla konkretnego fenotypu niepłodności męskiej.



Jestem także członkiem programu **COST ANDRONET** (CA20119 – *European andrology network – research coordination, education and public awareness*; X 2021-X 2025; <http://www.andronet.cat/>), którego celem jest podniesienie multidyscyplinarnej współpracy badawczej i wymiany danych między ośrodkami andrologicznymi oraz transfer wiedzy do krajów o mniej rozwiniętych badaniach poprzez stworzenie sieci współpracujących ze sobą jednostek naukowych na terenie Europy w tematyce męskiej niepłodności. ANDRONET ma na celu poprawę edukacji zawodowej w zakresie andrologii, co ma przyczynić się do uznania andrologii za podspecjalizację medyczną na poziomie europejskim. ANDRONET będzie dążył także do przekazywania wiedzy społeczeństwu, a tym samym zwiększania świadomości na temat przyczyn męskiej niepłodności, co ma przyczynić się do rozwoju profilaktyki. W ramach akcji ANDRONET działalność prowadzą trzy Grupy Robocze (Working Groups), skupiające się na: koordynowaniu badań (WG1), profesjonalnej edukacji (WG2) oraz podnoszeniu świadomości zdrowotnej mężczyzn (WG3). Jestem członkiem każdej z wymienionych grup.

**Załącznik 8g**

### Podsumowanie współpracy naukowej

University of Pittsburgh, PA, USA (prof. dr A.N. Yatsenko)

University of Bergen, Norway (dr hab. T. Stokowy)

Ondokuz Mayiz University, Samsun, Turkiye (prof. dr hab. Sezgin Günes)

Institute of Hereditary Pathology, Ukrainian Academy of Medical Sciences, Lviv  
(prof. dr hab. Zastavna, dr Huleyuk)

Klinika Pastelowa, Poznań (prof. dr hab. P. Jędrzejczak, dr A. Berger, do IX 2022 w Pracowni Andrologii, Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu)

Klinika Leczenia Niepłodności „Novum”, Warszawa (dr J.K. Wolski)

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań (prof. dr hab. J. Barciszewski)

Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku (prof. dr hab. A.T. Midro)

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (dr inż. J. Suszyńska-Zajczyk)

**Załącznik 8d**

### **Łączna liczba doniesień konferencyjnych w moim dorobku 64**

w tym:

26 zagranicznych, w tym 14 pierwszoautorskich

38 krajowych, w tym 17 pierwszoautorskich;

- międzynarodowe:

European Congress of Andrology: 2018, 2014, 2008

Florence-Utah Symposium on Genetics of Male Infertility: 2013, 2010

European Cytogenetics Conference: 2021, 2013, 2011

ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), 2020, 2013

ESHG (European Society of Human Genetics): 2021

Annual Meeting of American Society of Andrology (ASA): 2022, 2019, 2018, 2017, 2012, 2011, 2010

Biennial American Cytogenetic Conference (ACC): 2012

European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (ETW): 2021, 2010

Annual Meeting of British Andrology Society: 2006

- krajowe:

Zjazd Polskiego Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR): 2021, 2017, 2011, 2010, 2008

Dzień Andrologiczny (Polskie Towarzystwo Andrologiczne PTA): 2020, 2019, 2016, 2015, 2013

Polski Kongres Genetyki: 2022, 2013, 2010, 2007

Genomica: 2022

Konferencja Polskiego Towarzystwa Zwierząt Laboratoryjnych (PolLASA): 2010, 2008

Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego (PTK): 2011, 2009, 2008.

Szczegółowa lista doniesień w **Załączniku 4**

## STAŻE NAUKOWE

- **06-10.03.2023** University of Bergen, IT Division, Bergen, Norwegia; staż szkoleniowy "Mobility Agreement Staff Mobility For Teaching" w ramach stypendium Erasmus+

Podczas stażu przedstawiłam cykl wykładów pt.: „*Characteristics of sperm chromosomes: karyotyping, Y-chromosome microdeletion tests, and sperm chromatin integrity*”, a także podjęte zostały konsultacje wyników analiz bioinformatycznych, stanowiące integralną całość manuskryptu będącego obecnie na etapie rewizji w *Hum Reprod Open*, 2023 (IF 7,130): Olszewska M, Malcher A, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Suszynska-Zajczyk J, Jackowiak H, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M: „*Tcte1 knockout influence on energy chain transportation, apoptosis and spermatogenesis – implications for male infertility*”. Manuskrypt jest dostępny jako preprint: medArxiv: <https://dx.doi.org/10.1101/2022.11.17.22282339>

Efektem stażu jest wspólna publikacja naukowa (ww.).

- **14.11.2022-28.02.2023** Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii;

Odbyłam staż obejmujący praktyczną naukę przygotowywania i barwienia mrożeniowych preparatów tkanek mysich. Wykonane preparaty posłużyły do uzupełnienia wyników o nowe dane doświadczalne w manuskrypcie będącym obecnie na etapie rewizji w *Hum Reprod Open*, 2023 (IF 7,130): Olszewska M, Malcher A, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Suszynska-Zajczyk J, Jackowiak H, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M: „*Tcte1 knockout influence on energy chain transportation, apoptosis and spermatogenesis – implications for male infertility*”. Manuskrypt jest dostępny jako preprint: medArxiv: <https://dx.doi.org/10.1101/2022.11.17.22282339>

Efektem stażu jest wspólna publikacja naukowa (ww.).

- **27.09-01.10.2021** Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turcja 2021; staż szkoleniowy "Mobility Agreement Staff Mobility For Teaching" w ramach stypendium Erasmus+

Podczas stażu przedstawiłam cykl wykładów pt.: „*Characteristics of sperm chromatin integrity and sperm chromosomes*”, a także brałam udział w uzgodnieniach dalszych warunków współpracy z zespołem prof. Sezgin Günes.

Efektem stażu jest powstanie wspólnego planu badawczego dla realizacji projektu grantowego Narodowego Centrum Nauki Opus nr 2020/37/B/NZ5/00549 (2021-2025): „*Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych*

genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu”, realizowanego w ramach współpracy badawczej Zakładu Rozrodu i Komórek Macierzystych.

- **12-14.09.2007** MetaSystems, Altlussheim, Niemcy; Szkolenie z zakresu technik fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) „*Training workshop on mFISH and mBAND*”

Podczas szkolenia opanowałam techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w różnych wariantach znakowania oraz na różnych typach komórek, co stanowiło nowość w tamtym czasie.

Efektom szkolenia jest wykorzystanie wyników powstałych w trakcie stażu w mojej rozprawie doktorskiej (2013), w publikacji w *Mol Cytogenet*, 2014, 7: 14 (IF 2,140): Wiland E, **Olszewska M**, Georgiadis A, Huleyuk N, Panasiuk B, Zastavna D, Yatsenko SA, Jedrzejczak P, Midro AT, Yatsenko AN, Kurpisz M: „*Cytogenetic and molecular analysis of chromosomes de novo translocation dic(9;13)(p11.2;p12) infertile male*” oraz w monografii: **Olszewska M**: „*Analiza cytogenetyczna plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW) z niepowodzeniami rozrodu*”. Wyd.: Instytut Genetyki Człowieka PAN, 2016, ISBN 978-83-947911-2-4.

**Załącznik 8c**

## REALIZACJA PROJEKTÓW GRANTOWYCH

Poza udziałem w realizacji łącznie 13 krajowych projektów grantowych (w tym: 9 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, 2 przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz 1 przez Narodowe Centrum Nauki i Rozwoju; szczegółowo wymienione w Załączniku 4), byłam również wykonawcą zagranicznego projektu grantowego: „*Genetic Basis of Oligozoospermia in Infertile Males*” nr K08HD058073 (2010-2015), finansowanego przez National Institute of Health (NIH), NICHD, USA, którego kierownikiem był prof. Alexander N. Yatsenko z University of Pittsburgh, USA. Do moich zadań należało: planowanie i projektowanie części zadań doświadczalnych, wybór przypadków do analiz, izolacja DNA, barwienia i analiza preparatów oraz interpretacja wyników.

**Głównym efektem realizacji projektu** było odkrycie i udokumentowanie roli wariantów w genie *TEX11*, jako przyczyny azoospermii, co zostało opublikowane w pracy: Yatsenko AN, Georgiadis AP, Ropke A, Berman AJ, Jaffe T, **Olszewska M**, Westernstroer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, Yatsenko SA, Kliesch S, Schlatt S, Tüttelmann F: *Mutations in X-linked TEX11 cause meiotic arrest and azoospermia*. *New Engl J Med.*, 2015, 372: 2097-2107 (IF 59,558, MNiSW 50, MEiN 200).

**Załącznik 8d**

## WSPÓŁPRACA Z AGENCJAMI BADAWCZYMI

Od 2018 r. jestem recenzentem i/lub ekspertem: Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR), Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA), Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) oraz od 2022 r. również Agencji Badań Medycznych (ABM).

**Załącznik 8j**

## RECENZENT MANUSKRYPTÓW NAUKOWYCH

Dotychczas wykonałam ponad 90 recenzji manuskryptów przesłanych do redakcji czasopism branżowych z listy Journal Citation Reports (JCR), w tym do: Hum Reprod, PLoS One, Reprod Biomed Online, Reprod Biol, Asian J Androl, J Assist Reprod Genet, BMC Med Genet, BMC Genet, Andrology, Andrologia, Fertil Steril, Cytogenet Genome Res, Sci Reports, Aging, Int J Mol Sci, Biomolecules, Genes, Cells, Front Genet oraz Clin Genet.

**Załącznik 8i**

## VI INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ

### OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

- **kierownik Zespołu Badawczego Genetyki Plemnika**

**Załącznik 8a**

Od X 2021 kieruję nowo powołanym Zespołem Badawczym Genetyki Plemnika utworzonym w wyniku otrzymania przeze mnie finansowania Narodowego Centrum Nauki dla projektu grantowego: Sonata Bis nr 2020/38/E/NZ2/00134 „Badanie lokalizacji chromosomów w ludzkich plemnikach o różnym stopniu integralności chromatyny oraz różnicach w poziomie markerów epigenetycznych, z uwzględnieniem kariotypów oraz poszczególnych frakcji plemnikowych”. Obecnie Zespół realizuje zadania badawcze z zakresu epigenetyki i cytogenetyki plemników mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu łączące zagadnienia naukowe zarówno ww. projektu, jak i projektu Sonata nr 2015/17/D/NZ5/03442 „Badanie metylacji DNA plemników niepłodnych mężczyzn ze zdiagnozowaną oligozoospermią”, którego również jestem kierownikiem.

Zadania badawcze Zespołu opierają się na kompleksowym podejściu eksperymentalnym wobec plemników mężczyzn z oligozoospermią, a także nosicieli aberracji chromosomowych, uwzględniającym charakterystykę zarówno zawartości genetycznej jak i epigenetycznej plemnika istotnych dla przebiegu spermatogenezy. Jednoczesna ocena wszystkich wymienionych parametrów może stanowić bodziec do opracowania nowych testów oceniających zarówno warstwę strukturalną, jak i regulatorową materiału genetycznego plemnika.

Głównym celem projektu 00134 jest odpowiedź na pytanie o to, w jaki sposób lokalizacja poszczególnych chromosomów w jądrze komórkowym plemnika może ulec zmianie/zaburzeniu w zależności od: typu niepowodzeń rozrodu, kariotypu, integralności chromatyny, zmian epigenetycznych DNA/histonów plemnikowych, a także czy istnieją zmiany między członkami tej samej rodziny, z uwzględnieniem jakości różnych frakcji plemnikowych (o prawidłowym ruchu, z dojrzałą chromatyną oraz o sprawdzonym potencjale do zapłodnienia). Nowatorskim charakterem projektu jest prowadzenie analiz w sposób sekwencyjny na tym samym plemniku, co oznacza, że lokalizacja chromosomów zostanie określona w każdej komórce z osobna, po uprzednim jej scharakteryzowaniu pod kątem: zawartości genetycznej, stanu dojrzałości chromatyny, a także zmian epiznaczyków. Analizy prowadzone są na materiale od mężczyzn o prawidłowym kariotypie (grupa kontrolna, członkowie tej samej rodziny: płodni kontra niepłodni, np. bracia), a także u nosicieli

rearanżacji chromosomowych, bez zmian fenotypowych (m.in. translokacje chromosomowe wzajemne TCW, translokacje Robertsonowskie Rob), podkreślając rolę charakterystyki zaangażowanych chromosomów w organizację przestrzenną jądra komórkowego plemnika.

Natomiast, celem projektu 03442 jest określenie wzorów metylacji wybranych genów w DNA plemnikowym u niepłodnych mężczyzn o obniżonej liczbie plemników (oligozoospermia). W projekcie zakłada się, że plemniki niepłodnych mężczyzn z oligozoospermią mają zmieniony wzór metylacji genów kluczowych dla spermatogenezy, co rzutuje na przyczyny zmniejszającej się liczby plemników w ejakulacie oraz status płodności pacjentów. W plemnikach mężczyzn z oligozoospermią obserwuje się również podwyższony poziom aneuploidii chromosomów oraz integralność chromatyny plemnikowej obejmującą zarówno stopień jej deprotaminacji, jak i fragmentację DNA. Kompleksowa charakterystyka plemników mężczyzn z oligozoospermią podjęta w ww. projekcie pozwoli na określenie roli znaczników epigenetycznych DNA lub histonów w etiopatogenezie oligozoospermii. Badania obejmują: (i) ustalenie wzorów metylacji DNA plemnikowego (hipo/hipermetylacja) dla promotorów wybranych genów (panel genów i/lub badanie całego metylomu), (ii) badanie globalnego poziomu metylacji DNA plemnikowego oraz analiza metylacji i acetylacji wybranych reszt lizynowych histonów wraz z ich immunolokalizacją w jądrze komórkowym plemnika, (iii) ocenę integralności chromatyny plemnikowej oraz (iv) ocenę poziomu aneuploidii wybranych chromosomów w plemnikach mężczyzn z oligozoospermią.

- **kierownik projektów grantowych**

finansowanie ze środków Narodowego Centrum Nauki:

- Sonata Bis (2021-2026): [nr 2020/38/E/NZ2/00134](#) „Badanie lokalizacji chromosomów w ludzkich plemnikach o różnym stopniu integralności chromatyny oraz różnicach w poziomie markerów epigenetycznych, z uwzględnieniem kariotypów oraz poszczególnych frakcji plemnikowych”
- Sonata (2016-2020): [nr 2015/17/D/NZ5/03442](#) „Badanie metylacji DNA plemników niepłodnych mężczyzn ze zdiagnozowaną oligozoospermią”.

- **członek komitetów konferencyjnych**

- komitet naukowy konferencji: X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2018 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 17-18 marca 2018, Lublin
- komitet organizacyjny konferencji: IX Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR), 2-4 września 2021, Poznań
- komitet naukowy i organizacyjny: Pierwsza Poznańska TBR-ówka pt. „Model myszy w badaniach niepłodności męskiej”; mini-symposium, połączone z warsztatem praktycznej nauki badania nasienia u myszy, 20 marca 2023, Poznań

**Załącznik 8I**

## OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

Jako pracownik naukowy jednostki PAN nie mam obowiązku prowadzenia zajęć dydaktycznych. Tym niemniej, moja aktywność obejmuje także i tenże rodzaj aktywności. Dotychczas pełniłam następujące role:

- **promotor prac dyplomowych**

praca magisterska: 2022

studentka Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, kierunek: *biotechnologia*

dwie prace licencjackie: 2019

studentki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, kierunek: *biotechnologia*

- **opiekun naukowy**

Od 2012 r. byłam opiekunem łącznie 21 studentów poznańskich uczelni (Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Uniwersytetu Przyrodniczego oraz Uniwersytetu Medycznego; kierunki studiów: biotechnologia lub biologia), w tym:

- 6 magistrantów
- 3 licencjatów
- 9 stażystów, w tym 5 osób w ramach programu: *Studiujesz? Praktykuj! Program staży zawodowych dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu*, finansowanego przez Fundusze Europejskie (POWR.03.01.00-00-S126/17)
- 3 praktykantów.

Dodatkowo, w roku 2018 pod moją opieką naukową pozostawała jedna stypendystka finansowana z projektu Narodowego Centrum Nauki.

### **Obecnie pod moją opieką pozostają:**

od X 2021 słuchaczka Poznańskiej Szkoły Doktorskiej Instytutów Polskiej Akademii Nauk, stypendystka w ramach mojego projektu grantowego Sonata Bis (pełnię funkcję **promotora pomocniczego**) oraz trzy magistrantki Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, kierunek: biotechnologia.

Ze względu na obowiązujące przepisy RODO, dane ww. osób zostały zawarte w **Załączniku 8m**.

- **zajęcia dla studentów**

W ramach umowy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu w naszym Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, prowadziłam zajęcia dla studentów kierunku: biotechnologia medyczna:

- 2015 – ćwiczenia laboratoryjne z tematyki cytogenetyki plemnika
- 2011 – ćwiczenia laboratoryjne w ramach fakultetu „Inżynieria komórkowa”.

## OSIĄGNIĘCIA POPULARYZACYJNE

- Jestem laureatką 5. Edycji Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju, w kategorii: *Naukowiec Przyszłości*, 2020. W związku z tym, w serwisie rzecz.pl umieszczony został podcast (<https://rzecz.pl/rzecz-o-innowacjach-podcast-19/>) oraz ukazał się krótki artykuł popularyzacyjny: „*Walcząc z niepłodnością*”.
- Genetic Training Week: byłam wykładownicą podczas spotkania dla doktorantów z różnych części świata, podczas którego zaprezentowałam osiągnięcia Zakładu Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych; 6-10.09.2021, Poznań.

## VII INNE ISTOTNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

**Członek Rady Naukowej** Instytutu Genetyki Człowieka PAN:

kadencje: 2019-2022 oraz 2023-2026

**Załącznik 8b**

### Kursy, szkolenia, warsztaty

- *Akademia Managera* – Krajowy Punkt Kontaktowy i Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, IX-XII 2022
- *Kierowanie Zespołem* – Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Centrum Edukacji Menedżerskiej, X 2022
- *IRP in research institutions* – trening umiejętności miękkich, program: Next\_Level, Poznań, II 2022
- *Diagnostics & therapy for 2030 and beyond (Course 1)* – European Society of Human Reproduction and Embryology, VII 2020
- *Is sex worth the effort? (Course 5)* – European Society of Human Reproduction and Embryology, VII 2020
- *PolLASA* – szkolenia w zakresie pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi – 2020, 2015, 2008
- *Zarządzanie zespołem międzynarodowym – trening interkulturowy (2INTEGRATE)* w ramach programu Welcome to Poland – Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań, II 2020
- *Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS* – Poznań, VI 2019
- *Kurs przygotowania bibliotek do sekwencjonowania DNA na sekwenatorach nowej generacji* – Warszawa IV 2016
- *Warsztaty IMSI oraz automatycznej oceny seminologicznej* – Poznań, X 2015
- Warsztaty poświęcone technikom *in vitro* - ICSI and IMSI z wykorzystaniem systemu mikroskopowego AM 6000 (Kawaska, Leica). Poznań, V 2013
- Szkolenie: *Standardowe procedury operacyjne przy pracy z IVC*; Tecniplast, Warszawa, IX 2010
- Warsztaty: *Obrazowanie molekularne in vivo i in vitro*; Carestream, Warszawa, IX 2010
- Andrology Lab Workshop: *'Sperm morphology: a hands-on workshop'*, 35th Annual Meeting of American Society of Andrology, Houston, TX, USA, IV 2010
- Seminarium Roche Diagnostics: *'Roche Diagnostics - 454 Genome Sequencer FLX - new generation sequencing'* and *'Roche NimbleGen - high resolution microarrays'*. Poznań, VI 2009
- Sympozjum Ehret Labor und Pharma Technik: *Nowoczesne rozwiązania z zakresu hodowli i przetrzymywania zwierząt laboratoryjnych*; Poznań, III 2008
- *Training workshop on mFISH and mBAND*, MetaSystems, Altlußheim, Germany, IX 2007
- Dni Otwarte Centrum Medycyny Doświadczalnej, Białystok, X 2006.

**Załącznik 8e**

**Członek rady redakcyjnej czasopism z listy JCR**

- 2008-2012: *Central European Journal of Biology* (od 2014: *Open Life Sciences*) – Associate Editor, IF 1,016, MEiN 40, wyd. De Gruyter Open Ltd. (wcześniej: Versita)
- od 2020 *International Journal of Molecular Sciences* – Reviewer Board Member, IF 6,208, MEiN 140, wyd. MDPI
- od 2021 *Biomolecules* – Topical Advisory Panel Member, IF 6,064, MEiN 100, wyd. MDPI
- od 2022 *Frontiers in Genetics* – Topic Editor: “*Women in Applied Genetic Epidemiology*”, IF 4,772, MEiN 100, wyd. Frontiers Media SA
- od 2022 *Frontiers in Genetics* – Topic Editor: “*Searching for Causes of Infertility: From Pathophysiologic Mechanisms to Therapeutic Strategies*”, IF 4,772, MEiN 100, wyd. Frontiers Media SA
- od 2022 *Open Medicine* – Editor, IF 2,123, MEiN 70, wyd. De Gruyter Poland Sp. z o.o.
- od 2022 *Andrologia* – Academic Editor, IF 2,532, MEiN 70, wyd. Wiley
- od 2022 *Human Mutation* – Academic Editor, IF 4,700, MEiN 140, wyd. Wiley

**Załącznik 8h****Nagrody**międzynarodowe:

- 2022 International Travel Award (The International Liaison Committee); 47<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Andrology (ASA), San Diego, USA; individual award
- 2021 Early Stage Investigator registration scholarship, American Society of Andrology, 46<sup>th</sup> Annual Conference
- 2019 Outstanding Paper Award for the best paper published in Asian Journal of Andrology (Olszewska M i wsp. “*Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations*”. Asian J Androl, 2017, 19: 117-124; **P4 w cyklu**)
- 2011 National Institute of Health (NIH) Trainee Travel Award; 36<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Andrology (ASA); Montreal, Canada; individual award
- 2010 Lalor Foundation and World Health Organization (WHO) Travel Award; 35<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Andrology (ASA); Houston, USA; individual award

krajowe:

- 2020 Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju, kategoria: Naukowiec Przyszłości, 2020, za realizację projektu: „*Badanie metylacji DNA plemników niepełnych mężczyzn ze zdiagnozowaną oligozoospermia*”, NCN SONATA 2015/D/NZ5/03442
- 2016 Nagroda Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Genetycznego za cykl publikacji nt: “*Genetycznego podłoża niepłodności męskiej - kompleksowe badania materiału genetycznego plemników i komórek gametogenicznych u nosicieli aberracji chromosomowych*”; (nagroda zespołowa razem z: dr hab. E. Wiland i prof. dr hab. M. Kurpiszem) (**prace: P1, P2, P4 w cyklu**)
- 2016 Naukowa Nagroda Młodych im. Prof. Bokińca za najlepszą pracę z dziedziny andrologii; przyznana przez Polskie Towarzystwo Andrologiczne za publikację: Olszewska M. i wsp. “*Genetic dosage and*



*position effect of small supernumerary marker chromosome (sSMC) in human sperm nuclei in infertile male patient", Scientific Reports, 2015, 5: 17408 (P2 w cyklu)*

2014 Wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN

2014 Nagroda Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN za wyróżniającą się rozprawę doktorską

2022-2013 Nagroda Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN za prace naukowe opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach – łącznie 9 nagród.

**Załącznik 8k**

#### **Członek towarzystw naukowych**

2021-2024 Sekretarz Poznańskiego Oddziału Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR)

2019-2020 European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

od 2016 Polskie Towarzystwo Andrologiczne (PTA)

od 2016 Towarzystwo Biologii Rozrodu (TBR)

od 2014 Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka (PTGC)

od 2011 European Cytogenetic Association (ECA)

od 2010 Polskie Towarzystwo Zwierząt Laboratoryjnych (POLLASA)

**Załącznik 8f**

#### **Przerwa w pracy naukowej**

związana z urlopem macierzyńskim: 07.11.2016-05.11.2017 (364 dni)

**Załącznik 8n**