

Autoreferat

Dr n. med. Katarzyna Iżykowska

**Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk
2023 Poznań**

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Katarzyna Łżykowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1. **Licencjat**, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Data uzyskania: 26.06.2003
Kierunek studiów i specjalność: biologia eksperymentalna
Tytuł pracy licencjackiej: „Cykl komórkowy i jego modulacje w terapii przeciwnowotworowej”
2. **Magister**, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Data uzyskania: 23.05.2005
Kierunek studiów i specjalność: biologia eksperymentalna
Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ wybranych cukrowców na hemolityczną aktywność amfoterycyny B wobec erytrocytów świńskich”
3. **Master of Applied Science**, The University of Sydney, Australia
Data uzyskania: 06.08.2007
Kierunek studiów i specjalność: Molecular Biotechnology
4. **Doktor nauk medycznych**, Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Data uzyskania: 25.03.2013
Dyscyplina: biologia medyczna
Praca doktorska: „Charakterystyka molekularna delecji w regionie 6q23-27 w zespole Sézary’ego i białaczce z dużych ziarnistych limfocytów T”

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

1. Woolcock Institute of Medical Research, Sydney, Australia
Research Assistant; 17.07.2007-17.08.2007
2. Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Doktorant; 2008-2012
3. Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Biolog; 08.10.2012 - 31.08.2013
4. Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Adiunkt; 01.09.2013 - obecnie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA W RAMACH CYKLU PRAC

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. „Poszukiwanie podłoża molekularnego zespołu Sézary’ego należącego do grupy chłoniaków skórnych z komórek T”

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach w latach 2017-2023. Łączna wartość współczynnika Impact Factor (IF) tych prac wynosi **41,664** (wg Web of Science) oraz **560** punktów ministerialnych (Ministerstwa Edukacji i Nauki, MEiN). Cztery artykuły stanowią prace badawcze dotyczące poszukiwania podłoża molekularnego zespołu Sézary’ego, natomiast jedna publikacja jest pracą przeglądową dotyczącą terapii celowanych stosowanych w leczeniu chłoniaków T-komórkowych, w tym zespołu Sezary’ego i innych chłoniaków skórnych z komórek T. W każdej z prac, wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, jestem pierwszym autorem lub drugim i jednocześnie korespondencyjnym. Mój udział we wszystkich pracach był znaczący i obejmował opracowanie koncepcji badań, planowanie i udział w dużej części eksperymentów, analizę danych, koordynowanie pracy grupy badawczej poprzez nadzór merytoryczny, przygotowanie manuskryptów.

1. **Katarzyna Iżykowska**, Grzegorz K Przybylski*, Claudia Gand, Floriane C Braun, Piotr Grabarczyk, Andreas W Kuss, Karolina Olek-Hrab, Armando N Bastidas Torres, Maarten H Vermeer, Willem H Zoutman, Cornelis P Tensen, Christian A Schmidt *Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sézary syndrome.*

Oncotarget. 2017 Jun 13;8(24):39627-39639. doi: 10.18632/oncotarget.17383.

IF₂₀₁₇- 0 (czasopismo utraciło IF po opublikowaniu pracy)

(IF₂₀₁₆-5,168)

MEiN₂₀₁₇-40

Q1 Oncology

- 2. Katarzyna Iżykowska**, Karolina Rassek, Magdalena Żurawek, Karina Nowicka, Julia Paczkowska, Iwona Ziólkowska-Suchanek, Marta Podralska, Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, Monika Joks, Karolina Olek-Hrab, Maciej Giefing, Grzegorz K Przybylski*
Hypomethylation of the promoter region drives ectopic expression of TMEM244 in Sézary cells.
J Cell Mol Med. 2020 Sep;24(18):10970-10977. doi: 10.1111/jcmm.15729. Epub 2020 Aug 14.
IF₂₀₂₀-5,310
MEiN₂₀₂₀-100
Q2 Cell Biology; Q2 Medicine, Research & Experimental
- 3. Katarzyna Iżykowska**, Karolina Rassek, Dorota Korsak, Grzegorz K Przybylski*
Novel targeted therapies of T cell lymphomas. (praca przeglądowa)
J Hematol Oncol. 2020 Dec 31;13(1):176. doi: 10.1186/s13045-020-01006-w.
IF₂₀₂₀-17,388
MEiN₂₀₂₀-140
Q1 Hematology; Q1 Oncology
- 4.** Karolina Rassek, **Katarzyna Iżykowska***, Magdalena Żurawek, Karina Nowicka, Monika Joks, Karolina Olek-Hrab, Berenika Olszewska, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Wojciech Biernat, Roman J Nowicki, Grzegorz K Przybylski
TMEM244 gene expression as a potential blood diagnostic marker distinguishing Sézary syndrome from mycosis fungoides and benign erythroderma.
J Invest Dermatol. Volume 143, Issue 2, February 2023, Pages 344-347.e3. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.046.
IF₂₀₂₁-7,59
MEiN₂₀₂₁-140
Q1 Dermatology
- 5.** Karolina Rassek, **Katarzyna Iżykowska***, Magdalena Żurawek, Monika Pieniawska, Karina Nowicka, Xing Zhao, Grzegorz K. Przybylski*
TMEM244 is a long non-coding RNA necessary for CTCL cell growth
Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(4), 3531; <https://doi.org/10.3390/ijms24043531>
IF₂₀₂₁-6,208
MEiN₂₀₂₂-140
Q1 Biochemistry & Molecular Biology

* autor korespondencyjny

Opis wkładu współautorów publikacji jest zawarty w oświadczeniach zebranych w załącznikach nr 7.1-7.5 (oświadczenia zebrano od autorów o największym udziale w powstawaniu pracy).

Wstęp

Pierwotne chłoniaki skórne należą do grupy chłoniaków nieziarnicznych i rozwijają się głównie w skórze, a nie w węzłach chłonnych [1, 2]. Około 75% stanowią chłoniaki wywodzące się z komórek T, z czego większość diagnozowana jest jako częściej występujący ziarniniak grzybiasty (ok. 70%) oraz rzadszy zespół Sézary'ego (ok. 5%). Częstość występowania chłoniaków skórnych z komórek T (ang. *CTCL – cutaneous T-cell lymphoma*) obecnie wynosi 6,4 na milion osób, z obserwowaną od lat tendencją wzrostową, a 5-letni wskaźnik przeżycia pacjenta to 20-60%. Średni wiek pacjenta w momencie rozpoznania wynosi 52-62 lata, jednak częstość zachorowania zdecydowanie wrasta z wiekiem i jest 4-rotnie wyższa u osób powyżej 70 roku życia. Diagnoza CTCL stanowi duże wyzwanie dla klinicystów, ponieważ objawy CTCL często przypominają inne choroby skóry o podłożu nienowotworowym. Proces diagnozy może trwać nawet kilka lat i opiera się na zastosowaniu różnych metod histochemicznych, immunohistochemicznych i genetycznych [2]. Poszukiwanie swoistego markera diagnostycznego, który umożliwiłby szybką diagnozę i rozróżnienie zespołu Sézary'ego od ziarniniaka grzybiastego czy innych chorób o podobnym obrazie klinicznym, jest od lat jednym z nurtów badań naukowców zajmujących się chłoniakami skórnymi.

Częściej występujący ziarniniak grzybiasty charakteryzuje się łagodniejszym przebiegiem i lepszymi rokowaniami. U pacjentów dominują zmiany skórne w postaci rumieni, nacieków i guzów, składające się z nowotworowych, epidermotroficznych limfocytów z nieregularnym, podzielonym jądrem, ale także atypowych limfocytów, wykazujących cechy prozapalne i reaktywne [1]. W obrazie histopatologicznym dominują limfocyty CD4+, mniej jest limfocytów CD8+. Nowotworowe limfocyty często wykazują klonalność i utratę markerów typowych dla limfocytów T CD7 i CD5. Średni czas przeżycia pacjentów zależy od stadium choroby, w przypadku stadium I-IIA średni czas przeżycie sięga nawet 15-35 lat, natomiast gwałtownie spada do 1-5 lat u pacjentów w stadium IIB-IVB [2].

Zespół Sézary'ego występuje o wiele rzadziej, ale jest też zdecydowanie bardziej agresywny w swoim przebiegu, ze swoistym dla choroby 5-letnim przeżyciem wynoszącym 36% i medianą przeżycia 2–4 lata [3]. W rozpoznaniu klinicznym widoczne jest o wiele większe zajęcie obszaru skóry w postaci uogólnionej erythrodermii, jak również obecność nowotworowych komórek Sézary'ego w węzłach chłonnych, krwi obwodowej, a nawet narządach wewnętrznych [1]. Kryteria diagnostyczne we krwi są następujące: bezwzględna liczba komórek Sézary'ego ≥ 1000 komórek/ μl , stosunek CD4/CD8 $\geq 10:1$, utrata markerów T-komórkowych (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 i/lub CD26) i zwiększona liczba klonalnej populacji limfocytów T.

W rzadkich przypadkach zespół Sézary'ego może wystąpić u pacjentów z ziarniniakiem grzybiastym, jak również u pacjentów z ziarniniakiem grzybiastym może wystąpić postać białaczkowa z zajęciem krwi obwodowej, ale bez erythrodermii [1, 2]. Ze względu na podobieństwo niektórych objawów, ziarniniak grzybiasty i zespół

Sézary'ego były kiedyś uważane za różne stadia tej samej choroby. Natomiast badania sugerują, iż obie choroby wywodzą się od różnych subpopulacji limfocytów [4]. Ziarniniak grzybiasty wywodzi się z niemigrującej populacji limfocytów T_{RM} (ang. *resident memory T-cells*), posiadających typowe dla tej grupy markery powierzchniowe CD69 i CD103, oraz receptory typowe dla limfocytów obecnych w skórze CCR4 i CLA. Zespół Sézary'ego wywodzi się z limfocytów T_{CM} (ang. *central memory T-cells*), posiadających markery CCR7 i CD62L, migrujących ze skóry do krwiobiegu [4]. W związku z odmiennym obrazem klinicznym, jak również w celu lepszej diagnostyki różnicowej, zaproponowano ostatnio zakwalifikowanie zespołu Sézary'ego do grupy białaczek z dojrzałych limfocytów T i NK [5].

Właściwy mechanizm odpowiedzialny za rozwój choroby nie został jak dotąd wyjaśniony. Badania przeprowadzone w naszym zespole [6, 7], wykazały olbrzymią różnorodność zmian na poziomie genomu, transkryptomu i epigenomu u pacjentów z CTCL, co potwierdzają również wyniki innych grup badawczych. Wysokoprzepustowe techniki takie, jak sekwencjonowanie następnej generacji WGS (ang. „*whole genome sequencing*”) i RNAseq wykazały olbrzymią heterogenność zmian pomiędzy pacjentami a wprowadzona w ostatnich latach technologia scRNAseq (ang. „*single cell RNAseq*”) pokazała także dużą heterogenność w obrębie poszczególnych pacjentów [8]. Udowodniono między innymi, iż profile ekspresji różnicują komórki nowotworowe w skórze od tych krążących we krwi obwodowej, podkreślając znaczenie mikrośrodowiska i ewolucji klonalnej komórek nowotworowych [9]. Pomimo wielu badań z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technologii, dokładny mechanizm rozwoju chłoniaków skórnych nie jest znany. Hipoteza powstania choroby opiera się na przekonaniu, iż w trakcie całego życia aktywowane limfocyty T znajdujące się w skórze są narażone na różnego rodzaju mutageny, takie jak promieniowanie UV, czy związki chemiczne, co w połączeniu ze starzejącym się z układem immunologicznym prowadzi do niestabilności chromosomowej i nagromadzenia się dużej ilości zmian prowadzących do proliferacji klonu nowotworowego, odpornego na procesy apoptozy [1]. W przebiegu choroby kluczowa jest rola mikrośrodowiska, w którym w wyniku wytwarzania przez różne komórki cytokin, chemokin i czynników wzrostu, dochodzi do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym, co sprzyja progresji nowotworowej [10].

Komórki Sézary'ego charakteryzują się olbrzymią niestabilnością chromosomową i obecnością wielu nieprawidłowości w genomie. Wysokoprzepustowe badania genomów i transkryptomów wykazały wpływ dużych zmian liczby kopii i rearanżacji genomowych na szereg kluczowych ścieżek sygnałowych zaangażowanych w regulację ekspresji genów, kontrolę cyklu komórkowego czy aktywację limfocytów T [1, 7]. Natomiast wykryte mutacje w przewodzie wykazują sygnaturę specyficzną dla mutagenezy indukowanej promieniowaniem UV, co może sugerować jego wpływ na zapoczątkowanie transformacji nowotworowej w limfocytach zasiedlających skórę [11]. Najczęściej powtarzającymi się zmianami u pacjentów z CTCL były delecje w

regionach 10q i 17p, oraz amplifikacje 8q i 17q, oraz inne złożone strukturalne rearanżacje chromosomowe, prowadzące do zmian liczby kopii w obrębie kluczowych genów i w rezultacie do deregulacji poziomu ich ekspresji [12]. Wiele z tych genów należy do znanych onkogenów i genów supresorowych. Delecje i inaktywacja genów supresorowych takich, jak TP53, PTEN czy CDKN1 i CDKN2A, oraz amplifikacje w obrębie onkogenów m.in. MYC prowadzą do zaburzeń cyklu komórkowego i niekontrolowanej proliferacji. Niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych jest dodatkowo napędzana ciągłą aktywacją szlaków TCR i NF- κ B [13], oraz deregulacją szlaku JAK-STAT, w związku z licznymi mutacjami i zmianami liczby kopii genów zaangażowanych w te szlaki, takich jak TNFAIP3, STAT3, STAT5, ZEB1, JAK1. Liczne zmiany odnotowane na poziomie transkryptomu są także związane ze zmianami liczby kopii genów zaangażowanych w epigenetyczną regulację ekspresji genów, takich jak ARID1A, CTCF czy DNMT3A [12], czy też obecnością somatycznych mutacji genów zaangażowanych w metylację, acetylację i ubikwitynację histonów [14].

Pomimo wielu badań i postępow w zrozumieniu podłoża molekularnego chłoniaków skórnych, choroba pozostaje nieuleczalna. Terapie ukierunkowane na skórę obejmują terapię wiązką elektronów, terapię światłem ultrafioletowym, miejscową chemioterapię i sterydy [15]. W przypadku terapii systemowych stosuje się beksaroten (syntetyczne retinoidy), interferony alfa i gamma, metotreksat, pralatreksat, denileukinę difitoks, oraz inhibitory deacetylaz histonowych (HDACi): Romidepsynę i Vorinostat [1]. Natomiast stosowane przeciwciała monoklonalne to skoniugowany z toksyną brentuksymab (anty-CD30) i mogamulizumab (anty-CCR4). Duże nadzieje związane są z opracowaniem nowych, bardziej celowanych terapii np. inhibitorów BCL-2, BET, czy swoistych HDACi, z możliwością ich zastosowania w kombinacji, aby z jednej strony zmniejszyć toksyczność stosowanych leków, a z drugiej ograniczyć możliwość powstania opornych klonów nowotworowych [1].

Przeprowadzone przeze mnie na przestrzeni lat badania były osadzone w tematyce CTCL realizowanej także w zagranicznych ośrodkach badawczych. Począwszy od poszukiwań zmian na poziomie DNA, przy pomocy nowatorskich wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania, mających wpływ na zmianę ekspresji genów, poprzez analizę zaburzonych szlaków sygnałowych i procesów komórkowych, kończąc na identyfikacji markerów diagnostycznych i potencjalnych celów terapeutycznych. Wyniki moich badań w dużym stopniu poszerzyły wiedzę dotyczącą podłoża genetycznego zespołu Sézary'ego, ale także dały możliwość opracowania nowego markera diagnostycznego, który może być potencjalnym celem terapii antynowotworowej w przyszłości.

Cel naukowy cyklu prac

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań było poszukiwanie podłoża molekularnego zespołu Sézary'ego. W celu zrealizowania podjętego przeze mnie problemu badawczego w pierwszej kolejności przeanalizowałam genomy i transkryptomy pacjentów z zespołem Sézary'ego i wskazałam nowe geny mogące mieć znaczenie dla rozwoju choroby. Jeden z wybranych przeze mnie genów, *TMEM244*, został przeanalizowany szczegółowo pod kątem jego mechanizmów regulacji, funkcji i potencjalnego znaczenia diagnostycznego i terapeutycznego. Natomiast przygotowana praca przeglądowa miała na celu przedstawienie celowanych terapii w trudno uleczalnych chłoniakach T-komórkowych, w tym zespołu Sezary'ego i podkreślenie znaczenia badań podstawowych w procesie opracowywania i doskonalenia nowych terapii.

Omówienie osiągnięcia

Badaniem podłoża molekularnego zespołu Sézary'ego (ZS) zajmuję się już w trakcie doktoratu, gdzie przeanalizowałam szczegółowo region 6q23-27 u pacjentów pod kątem rearanżacji genomowych mogących mieć znaczenie w rozwoju choroby, co zostało opublikowane prestiżowym czasopiśmie z dziedziny dermatologii *Journal of Investigative Dermatology* [6]. Doświadczenie, które zdobyłam analizując część próbek przy pomocy sekwencjonowania następnej generacji NGS pozwoliły mi na podjęcie się analizy „omicznej” całych genomów i transkryptomów u pacjentów z zespołem Sézary'ego w ramach projektu HARMONIA, realizowanego we współpracy z Uniwersytetem w Greifswaldzie (Niemcy) i finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). Badania uzyskane w ramach tego projektu potwierdziły olbrzymią różnorodność zmian wśród pacjentów, amplifikacje w regionach onkogenów i delecje w genach supresorowych, czy zmiany w genach zaangażowanych w szlak sygnalizacji komórkowej TCR. Zidentyfikowałam nowe rearanżacje i geny fuzyjne, wytypowałam nowe geny do dalszych badań, między innymi gen *TMEM244*, omawiany w niniejszym osiągnięciu, ale także geny kodujące deacetylasy histonowe *HDAC9* i *HDAC10*, analizowane obecnie w ramach grantu NCN SONATA, którego jestem kierownikiem.

Wspomniany *TMEM244* to tylko jeden z genów, który wykazywał zmieniony profil ekspresji u pacjentów. Jego ekspresja była znacząco podwyższona u wszystkich pacjentów z zespołem Sézary'ego, w porównaniu z komórkami od zdrowych dawców, co wykazałam łącznie na grupie 20 pacjentów, stosując dwie niezależne metody analizy ekspresji: RNAseq i RT-qPCR (ang. *reverse transcription quantitative real-time PCR*). Pacjenci z zespołem Sézary'ego charakteryzują się bardzo dużą heterogennością zmian, stąd identyfikacja tak powtarzalnej zmiany była warta dalszych badań. Dodatkowo, funkcja genu nie była jak dotąd poznana dając olbrzymie możliwości badawcze pod kątem mechanizmów jego regulacji i znaczenia w komórce. We współpracy z profesorem Grzegorzem Przybylskim przygotowaliśmy wniosek grantowy mający na celu poznanie funkcji genu *TMEM244* w chorobach hematologicznych, który uzyskał

finansowanie w konkursie NCN OPUS14. Podczas realizacji projektu, byłam głównym wykonawcą, pełniącym nadzór zarówno nad częścią merytoryczną jak i eksperymentalną projektu, oraz promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Karoliny Rassek. Badania postanowiliśmy rozpocząć od analizy ekspresji *TMEM244* u pacjentów z różnymi nowotworami hematologicznymi, zarówno z komórek T jak i B, w celu weryfikacji, czy wysoka ekspresja tego genu jest charakterystyczna tylko dla zespołu Sézary'ego, czy być może dla wszystkich chłoniaków skórnych, albo dla wszystkich chłoniaków T komórkowych. Wyniki naszych poprzednich badań jednoznacznie wykazały, iż ekspresja genu *TMEM244* u zdrowych dawców w populacji komórek jednojądrzastych jest tylko na śladowym poziomie. Natomiast w kolejnym eksperymencie przeprowadzonym na wyselekcjonowanych ośmiu subpopulacjach komórek jednojądrzastych krwi zaobserwowaliśmy niewielką aktywację genu *TMEM244* w limfocytach T pamięci CD45RO+CD8+ i CD45RO+CD4+. Brak jest natomiast ekspresji w limfocytach B i nowotworach B-komórkowych. Co ciekawe, w nowotworach T-komórkowych, innych niż zespół Sézary'ego, ekspresja była wyższa, natomiast nie osiągnęła tak wysokiego poziomu jak w zespole Sézary'ego. Wyniki te skłoniły nas do podjęcia badań w celu weryfikacji czy *TMEM244* może być markerem diagnostycznym w zespole Sézary'ego, który jest trudny w diagnostyce, ponieważ jest wiele chorób o podobnym obrazie klinicznym. W badaniu postanowiliśmy zestawić grupę pacjentów z zespołem Sézary'ego z grupą pacjentów chorujących na ziarniniaka grzybiastego i erythrodermie nienowotworowe o różnym podłożu. Wykorzystaliśmy zarówno separowane limfocyty CD4+, jak i całą populację komórek jednojądrzastych krwi od pacjentów, których próbki udało nam się zebrać na przestrzeni lat (łącznie 16 pacjentów z zespołem Sézary'ego, 6 z ziarniniakiem grzybiastym, 8 z erythrodermiami nienowotworowymi). Analiza wykazała znaczącą nadekspresję genu *TMEM244* u pacjentów z ZS, w porównaniu z grupą chorób o podobnym obrazie klinicznym. Ponieważ różnica w poziomie ekspresji była wyraźnie widoczna w całej populacji komórek jednojądrzastych, stwierdziliśmy, iż może być to wykorzystane w szybkiej diagnostyce.

Następnym pytaniem na które chcieliśmy odpowiedzieć było to, czy *TMEM244* może być nie tylko markerem diagnostycznym, ale także celem terapeutycznym w leczeniu zespołu Sézary'ego. Wykazaliśmy, że wyciszenie genu *TMEM244* ma negatywny efekt na wzrost komórek, sugerując, iż jest on istotny dla wzrostu komórek nowotworowych. Dużym zaskoczeniem było, iż gen *TMEM244*, którego adnotacja w bazach danych sugerowała kodowanie białka transbłonowego, okazał się być genem nie kodującym białko, a długim niekodującym RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA), co udowodniliśmy w szeregu eksperymentów *in vitro* i *in silico*. Udało nam się wykazać, iż *TMEM244* lncRNA lokalizuje się głównie w cytoplazmie i ma kilka wariantów transkrypcji, a wszystkie charakteryzują się niskim potencjałem kodującym. Pokazaliśmy, że nie tylko zaburzenia w genach kodujących białka, ale także długie niekodujące RNA mogą mieć znaczenie w rozwoju zespołu Sézary'ego.

Podczas analizy znaczącej liczby zmian na poziomie genomu i transkryptomu w zespole Sézary'ego pojawiło się pytanie, która jest zmianą pierwotną, powodującą rozwój choroby, a która wtórną związaną z progresją nowotworową. Postanowiliśmy zbadać nie tylko znaczenie nadekspresji *TMEM244* w komórkach, ale także zidentyfikować mechanizm, który do tej nadekspresji doprowadził. Mechanizmy związane z zaburzeniami metylacji są często odpowiedzialne za deregulację genomów i procesy nowotworzenia. Badania pokazały, iż u pacjentów z zespołem Sézary'ego genom jest w większości hipometylowany, co sprzyja niestabilności chromosomowej, a wiele modulatorów epigenetycznych jest deregulowanych [16]. W moich badaniach pokazałam między innymi powtarzalne rearanżacje i spadek ekspresji genu metylotransferazy *DNMT3A* u pacjentów z ZS. Postanowiliśmy sprawdzić jaki jest status metylacji promotora genu *TMEM244*. Wykazaliśmy, iż w próbkach z ekspresją genu *TMEM244* promotor jest hipometylowany, a im wyższa ekspresja tym słabiej metylowany promotor. Wyniki potwierdziliśmy w nowatorskim eksperymencie z użyciem systemu CRISPR-dCas9-TET1, gdzie po swoistej demetylacji promotora udało się aktywować ekspresję genu *TMEM244* w linii modelowej. Tym samym potwierdziliśmy, iż hipometylacja jest mechanizmem, który spowodował silną nadekspresję genu.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż podłoże molekularne zespołu Sézary'ego jest bardzo złożone i wiele zmian może mieć znaczenie dla procesu nowotworzenia, w tym zmian na poziomie genomu czy transkryptomu, ale także epigenomu, związanych chociażby z poziomem metylacji DNA. Ponadto, wykazaliśmy, iż w rozwoju choroby mogą mieć znaczenie nie tylko geny kodujące białko, wpływające na kluczowe szlaki sygnalizacji komórkowej, ale także długie niekodujące RNA. Dodatkowo nasze badania wykazały, iż analiza podłoża molekularnego nowotworów, nawet tak złożonego jak w zespole Sézary'ego, może prowadzić do wytypowania nowego markera diagnostycznego i potencjalnego celu terapeutycznego, będącego nadzieją na wyleczalność chłoniaków T-komórkowych, co przedstawiono w pracy przeglądowej.

Omówienie prac wchodzących w skład cyklu

1. **Katarzyna Iżykowska, Grzegorz K Przybylski*, Claudia Gand, Floriane C Braun, Piotr Grabarczyk, Andreas W Kuss, Karolina Olek-Hrab, Armando N Bastidas Torres, Maarten H Vermeer, Willem H Zoutman, Cornelis P Tensen, Christian A Schmidt**
Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sézary syndrome.
Oncotarget. 2017 Jun 13;8(24):39627-39639. doi: 10.18632/oncotarget.17383.

Publikacja jest rezultatem wielośrodkowej współpracy z partnerami z Polski i z zagranicy, która była realizowana w ramach projektu badawczego NCN HARMONIA4. Celem badań było zebranie jak największej grupy pacjentów z zespołem Sézary'go, a następnie przeanalizowanie genomów i transkryptomów metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS), w celu zidentyfikowania rearanżacji i zmian w ekspresji genów mogących mieć znaczenie dla rozwoju choroby. Łącznie przeanalizowano genomy i transkryptomy 9 pacjentów z zespołem Sézary'ego oraz w stabilnej linii SeAx, wyprowadzonej od pacjenta z zespołem Sézary'ego. Próbkę od pacjentów pozyskano z Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz z Kliniki Dermatologii Centrum Medycznego Uniwersytetu w Leiden w Holandii. Materiał kontrolny do analizy RNAseq został przygotowany w Klinikce Chorób Wewnętrznych C, Uniwersytetu w Greifswaldzie (Niemcy), a stanowiły go separowane limfocyty T aktywowane i nieaktywowane. Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona w Instytucie Genetyki i Funkcjonalnych Badań Genomu na Uniwersytecie w Greifswaldzie (Niemcy). Genomy i transkryptomy przeanalizowano przy pomocy programu Integrated Genome Viewer IGV, a geny fuzyjne i zmiany w ekspresji genów dodatkowo potwierdzono przy pomocy technik PCR. Analiza genomowego DNA wykazała liczne zmiany liczby kopii w rejonach znanych już genów supresorowych, onkogenów i nowych genów kandydatów, takich jak *MYC*, *TOX*, *TP53*, *NCOR1*, *PTEN*, *FAS*, *DNMT3A*, *USP28*, *CAAP1*. Ponadto, zidentyfikowano nowe rearanżacje genów, które wpłynęły znacząco na poziom ekspresji genów, takich jak *TMEM244*, *EHD1*, *MTMR2*, *RNF123* and *TOX*. W wyniku rearanżacji zidentyfikowano 15 nowych genów fuzyjnych, z czego 9 uległo ekspresji w postaci transkryptów fuzyjnych zgodnych z ramką odczytu: *EHD1-CAPN12*, *TMEM66-BAIAP2*, *MBD4-PTPRC*, *PTPRC-CPN2*, *MYB-MBNL1*, *TFG-GPR128*, *MAP4K3-FIGLA*, *DCP1A-CCL27*, *MBNL1-KIAA2018*, natomiast 5 doprowadziło do ekspresji fragmentów genów nieulegających ekspresji w limfocytach T, takich jak *BAIAP2*, *CPN2*, *GPR128*, *CAPN12*, *FIGLA*.

Wyniki badań potwierdziły olbrzymią różnorodność zmian występujących u pacjentów z Zespołem Sézary'go oraz rolę znanych genów supresorowych (*TP53*, *FAS*), modulatorów epigenetycznych (*NCOR1*, *DNMT3A*) i zmian regulacji szlaków sygnałowych (*PTPRC* w sygnalizacji TCR) w patogenezie zespołu Sézary'ego. Ponadto, badania te umożliwiły wytypowanie nowych genów kandydatów, takich jak *TMEM244*, czy geny kodujące deacetylazy histonowe klasy II, które skłoniły nas do kontynuowania tej tematyki badawczej w ramach projektów realizowanych w późniejszych latach. Praca ma obecnie 32 cytowania.

Mój wkład polegał na: gromadzeniu materiału od pacjentów oraz zdrowych dawców z Polski; separacji komórek jednojądrzastych z krwi; izolacji RNA i DNA; przygotowaniu materiału do analizy RNAseq; analizie wyników NGS przy pomocy programu IGV; przeprowadzaniu reakcji PCR, RT-PCR oraz analizie ekspresji RT-qPCR;

ustaleniu koncepcji pracy; napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin i tabel; uczestniczeniu w procesie związanym z procedurą wydawniczą

2. **Katarzyna Iżykowska, Karolina Rassek, Magdalena Żurawek, Karina Nowicka, Julia Paczkowska, Iwona Ziółkowska-Suchanek, Marta Podralska, Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, Monika Joks, Karolina Olek-Hrab, Maciej Giefing, Grzegorz K Przybylski***

Hypomethylation of the promoter region drives ectopic expression of TMEM244 in Sézary cells.

J Cell Mol Med. 2020 Sep;24(18):10970-10977. doi: 10.1111/jcmm.15729. Epub 2020 Aug 14.

Celem pracy było przeanalizowanie chorych na nowotwory hematologiczne pod kątem ekspresji genu *TMEM244*, którego ektopowa ekspresja została wykazana u pacjentów z zespołem Sézary'ego w naszych poprzednich badaniach. We współpracy z Katedrą i Kliniką Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Katedrą i Kliniką Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu zebrano grupę pacjentów z zespołem Sézary'ego, ziarniniakiem grzybiastym, innymi chłoniakami T-komórkowymi i ostrą białaczką limfoblastyczną T-komórkową, oraz białaczką B-komórkową. Analiza RT-qPCR wykazała, iż gen *TMEM244* ulega ekspresji ektopowej u wszystkich pacjentów z zespołem Sézary'ego i liniach komórkowych pochodzących z ZS, w mniejszym stopniu w ziarniniaku grzybiastym i we frakcji chłoniaków T-komórkowych, ale nie ulega ekspresji w nowotworach złośliwych z komórek B i komórkach jednojądrzastych zdrowych osób. Dodatkowo, we współpracy z Zakładem Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka PAN wykazano negatywną korelację pomiędzy poziomem ekspresji genu *TMEM244* a stopniem metylacji w jego rejonie promotorowym. Trzy dinukleotydy CpG w regionie promotora *TMEM244* analizowano za pomocą pirosekwencjonowania wodorosiarczynem. Wyniki pokazały, że w komórkach bez lub ze śladową ekspresją *TMEM244* miejsca CpG były poddane silnej metylacji, natomiast w komórkach wykazujących ekspresję *TMEM244* na znaczącym poziomie promotor był hipometylowany. Spośród 39 próbek pobranych od pacjentów, zdrowych dawców i linii komórkowych, znaczącą ekspresję *TMEM244* zaobserwowano w 13 próbkach: 5 zespołu Sézary'ego, 2 ziarniniakach grzybiastych, jednej CLL, T-ALL, w chłoniaku z komórek T i trzech liniach komórkowych z komórek T. W tych próbkach średni poziom metylacji promotora wynosił 44,11%, a średnia relatywna ekspresja *TMEM244* wynosiła $1246E-6$. W próbkach ze śladową ekspresją *TMEM244* lub jej brakiem, średni poziom metylacji był wyraźnie wyższy (85%). Na podstawie uzyskanych wyników ustalono wartość odcięcia dla hipometylacji promotora na 70% oraz dla ekspresji *TMEM244* na $100E-6$. Stosując te wartości odcięcia, 11/12 próbek z

hipometylacją promotora miało ekspresję *TMEM244* i 25/27 próbek z metylovanym promotorem nie wykazywało ekspresji badanego genu ($P < 0,000001$ test Fishera). Test współczynnika korelacji Pearsona wykazał silną ujemną korelację między ekspresją *TMEM244* a kwadratem metylacji jego promotora ($R = -0,7813$; $P < 0,00001$).

W pracy udowodniono również, że ekspresję *TMEM244* można aktywować *in vitro* przez indukowaną systemem CRISPR-dCas9 specyficzną demetylację regionu promotorowego genu *TMEM244*. Zastosowano nowatorskie podejście przy pomocy białka dCas9 połączonego z domeną aktywną demetylasy TET1 oraz sgRNA nakierowanych na rejon CpG promotora genu *TMEM244*. Przy użyciu dwóch z czterech sgRNA spowodowano istotne obniżenie poziomu metylacji odpowiednio o 30% i 25%, natomiast nie wykryto żadnego efektu dla dwóch innych sgRNA, a także dla dwóch próbek kontrolnych (ang. *non-targeting*, NT). Zmniejszeniu metylacji DNA towarzyszyła aktywowana ekspresja *TMEM244* w komórkach linii Jurkat, w których brak jest endogennej ekspresji genu *TMEM244*. Aby sprawdzić korelację między ekspresją *TMEM244* a metylacją promotora, przeprowadzono test współczynnika korelacji Pearsona dla wszystkich próbek dCas9-TET1. Analiza wykazała, że poziom ekspresji *TMEM244* jest ujemnie skorelowany z kwadratem poziomu metylacji w regionie promotora ($R = -0,4766$), a korelacja ta jest wysoce istotna ($P < 0,0002$).

Wyniki przeprowadzonych badań umożliwiły wyjaśnienie mechanizmów regulacji ekspresji genu *TMEM244*, jak również wytypowanie go jako potencjalnego markera diagnostycznego w Zespole Sézary'ego. Praca ma obecnie 6 cytowań.

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonywaniu eksperymentów; gromadzeniu materiału od pacjentów i prowadzeniu bazy danych; separacji limfocytów T z części próbek krwi i szpiku kostnego; separacji limfocytów T z biopsji skórnych; analizie ekspresji RT-qPCR; powadzeniu hodowli komórkowych i transdukcji komórek; zaplanowaniu i opracowaniu protokołu eksperymentu CRISPR-dCas9; zaprojektowaniu wektorów i sgRNA oraz klonowaniu; interpretacji wyników oraz analizie statystycznej danych; napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin i tabel; uczestniczeniu w procesie związanym z procedurą wydawniczą

3. Katarzyna Iżykowska, Karolina Rassek, Dorota Korsak, Grzegorz K Przybylski*

Novel targeted therapies of T cell lymphomas.

J Hematol Oncol. 2020 Dec 31;13(1):176. doi: 10.1186/s13045-020-01006-w.

Chłoniaki T-komórkowe (ang. T-cell lymphoma, TCL) stanowią heterogenną grupę chłoniaków nieziarnicznych (ang. non-Hodgkin's lymphoma, NHL), które w chwili rozpoznania często występują w zaawansowanym stadium i najczęściej mają agresywny przebieg kliniczny. Do tej grupy należą także chłoniaki skórne z komórek T, w tym zespół Sézary'ego. Leczenie TCL często wiąże się z wysokim odsetkiem niepowodzeń i nawrotami choroby. Ponadto, w przeciwieństwie do NHL z komórek B,

w którym poczyniono znaczne postępy kliniczne wraz z wprowadzeniem przeciwciał monoklonalnych, nie zaobserwowano porównywalnych postępów w TCL. Aby poprawić rokowanie w TCL, konieczne jest opracowanie nowych terapii ukierunkowanych na geny. Jest to obecnie możliwe dzięki ogromnemu postępowi, jaki dokonał się w ostatnich latach w zrozumieniu biologii i patogenezy molekularnej TCL, co umożliwi wdrożenie wyników badań do praktyki klinicznej. W pracy przeglądowej przedstawiono nowe terapie oraz aktualne badania kliniczne i przedkliniczne nad ukierunkowanymi terapiami TCL, w tym zespołu Sézary'ego i innych chłoniaków skórnych CTCL, przy użyciu inhibitorów deacetylazy histonowej (HDACi), przeciwciał, chimerycznych komórek T receptora antygeny (CART), inhibitorów kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3Ki), inhibitorów kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALKi) i antybiotyków, stosowanych pojedynczo lub w kombinacjach. Praca ma obecnie 25 cytowań.

Mój wkład polegał na: zaplanowaniu i napisaniu części dotyczącej inhibitorów deacetylaz histonowych w leczeniu chłoniaków T komórkowych, w tym zespołu Sezar'ego i innych T-komórkowych chłoniaków skórnych, na podstawie dostępnych danych literaturowych; przygotowaniu tabeli 2 dotyczącej obecnie przeprowadzanych prób klinicznych leczenia chłoniaków T-komórkowych; korekcie rozdziałów przygotowanych przez pozostałych współautorów; uczestniczeniu w procesie związanym z końcową korektą manuskryptu i procedurą wydawniczą

4. Karolina Rassek, **Katarzyna Łzykowska***, Magdalena Żurawek, Karina Nowicka, Monika Joks, Karolina Olek-Hrab, Berenika Olszewska, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Wojciech Biernat, Roman J Nowicki, Grzegorz K Przybylski
TMEM244 gene expression as a potential blood diagnostic marker distinguishing Sézary syndrome from mycosis fungoides and benign erythroderma.
J Invest Dermatol. Volume 143, Issue 2, February 2023, Pages 344-347.e3. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.046.

W naszym poprzednim badaniu zidentyfikowaliśmy ektopową ekspresję genu *TMEM244*, o nieznanym funkcji biologicznej, u pacjentów z zespołem Sezar'ego (ZS), ale nie u osób zdrowych. Celem badania była analiza potencjału diagnostycznego ekspresji genu *TMEM244* do identyfikacji zespołu Sézary'ego. Ekspresję analizowano zarówno w całej populacji komórek jednojądrzastych krwi, jak i w separowanych limfocytach T CD4+, przy użyciu techniki RT-qPCR. Łącznie przeanalizowano grupę 16 pacjentów z zespołem Sézary'ego, 6 z ziarniniakiem grzybiastym, 8 z erythrodermią nienowotworową oraz 44 zdrowych dawców, co było wynikiem połączenia analiz z naszych poprzednich projektów jak i nowo pozyskanego materiału od pacjentów hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Ponadto, zbadano ekspresję genu *TMEM244*

w różnych subpopulacjach komórek krwi od sześciu zdrowych dawców pozyskanych z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu.

Analiza wykazała, iż w populacji komórek jednojądrzastej krwi mediana relatywnej ekspresji genu *TMEM244* była istotnie wyższa u pacjentów z ZS ($1500E-06$, $n = 13$) niż u zdrowych dawców ($29,4E-06$, $n=30$; $P < 0,00001$), jak również u osób z ziarniniakiem grzybiastym (ang. *mycosis fungoides*, MF) i erytrodermią (MF/E) ($23,7E-06$, $n = 9$; $P = 0,0001$). Podobnie, mediana ekspresji genu *TMEM244* była znacznie wyższa w populacji separowanych komórek T CD4+ od pacjentów z ZS ($2360E-06$, $n=6$) niż u zdrowych dawców ($27,5E-06$, $n=14$; $P=0,00084$) czy w grupie z MF/E ($70E-06$, $n = 14$; $P = 0,002$). Na podstawie zebranych wyników ustalono wartość graniczną dla diagnozy ZS na poziomie $100E-06$ dla komórek jednojądrzastych krwi, oraz $360E-06$ dla sortowanych komórek CD4+, co może być wykorzystane jako punkt odniesienia dla innych badaczy.

Analiza ekspresji genu *TMEM244* została również przeprowadzona w różnych subpopulacjach komórek krwi: CD4+, CD8+, CD45RA+, CD45RO+, CD31+, CD56+, CD14+ i CD19+, pozyskanych od zdrowych dawców. Wykazano, iż ekspresja *TMEM244* była wyższa w limfocytach T, zarówno CD4+ (mediana= $392E-06$) jak i CD8+ (mediana= $557E-06$), niż w komórkach B CD19+ (mediana= $23E-06$), komórkach NK CD56+ (mediana= $106E-06$) oraz monocytach CD14+ (mediana= $51E-06$). Ponadto analiza populacji limfocytów T pamięci CD45RO+ (mediana= $189E-06$), limfocytów T naiwnych CD45RA+ (mediana= $51E-06$) i najmniej dojrzałych naiwnych limfocytów T CD31+ (mediana= $75E-06$) wykazała, że ekspresja *TMEM244* jest powiązana ze stanem aktywacji limfocytów T.

Nasze badania wykazały, że ekspresja *TMEM244* u pacjentów z ZS jest znacznie wyższa nie tylko w porównaniu ze zdrowymi dawcami, ale przede wszystkim wyższa niż u pacjentów z chorobami o podobnym obrazie klinicznym, takimi jak ziarniniak grzybiasty i erytrodemie nienowotworowe, co może być szczególnie pomocne w diagnostyce, która nadal stanowi duże wyzwanie dla klinicystów. Ponadto, wykazano wyższą ekspresję *TMEM244* w komórkach pamięci (CD45RO+) CD4+ i CD8+, co jest zgodne z immunofenotypem komórek Sézary'ego. Uzyskane wyniki mogą mieć zastosowanie aplikacyjne, gdyż pomiar ekspresji *TMEM244* przy użyciu RT-qPCR może być precyzyjnym i dającym szybki wynik markerem diagnostycznym krwi do rozróżnienia zespołu Sézary'ego od chorób o podobnym przebiegu klinicznym.

Mój wkład polegał na: opracowaniu planu badań i zaplanowaniu eksperymentów; nadzorowaniu prac pod kątem merytorycznym; analizie danych; ustalenie ostatecznej koncepcji pracy; koordynacji współpracy z klinicystami i przyjmowaniu materiału do badań i danych klinicznych od pacjentów; prowadzeniu bazy danych pacjentów; udostępnieniu analiz ekspresji z moich poprzednich badań do zbiorczej analizy przedstawionej w pracy; separacji limfocytów T części próbek krwi; opracowaniu protokołu i wykonaniu eksperymentu separacji ośmiu subpopulacji komórek jednojądrzastych krwi; barwieniu komórek, analizie komórek przy pomocy cytometrii

przeptywowej i analizie wyników; uczestniczeniu w pisaniu manuskryptu, tworzeniu rycin i korekcie manuskryptu; koordynowaniu procesu związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny

5. Karolina Rassek, Katarzyna Iżykowska*, Magdalena Żurawek, Monika Pieniawska, Karina Nowicka, Xing Zhao, Grzegorz K. Przybylski*

TMEM244 is a long non-coding RNA necessary for CTCL cell growth

Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(4), 3531; <https://doi.org/10.3390/ijms24043531>

Celem pracy było zbadanie funkcji genu *TMEM244* w chłoniakach skórnych T-komórkowych. Funkcja tego genu nie została jak dotąd zbadana w kontekście żadnej jednostki chorobowej.

W pierwszej kolejności naszym celem badawczym było zidentyfikowanie ekspresji genu *TMEM244* na poziomie białka. Zbadano dwie linie komórkowe CTCL: SeAx i HH, a także linie komórkowe inne niż CTCL: HDLM2, D341med i COLO684, z przewidywanymi wysokimi poziomami transkryptu *TMEM244*. Wysoki poziom ekspresji *TMEM244* w linii komórkowej Jurkat indukowano przy użyciu dwóch systemów lentiwirusowych z różnymi promotorami (CMV i PGK). Sekwencje FLAG wprowadzono na N- lub C-końcu genu *TMEM244*. Ekspresja *TMEM244* na poziomie mRNA, określona za pomocą RT-qPCR, była najwyższa w komórkach Jurkat-CMV i Jurkat-PGK. W liniach komórkowych z endogenną ekspresją *TMEM244* najwyższy poziom wykryto w D341med, następnie COLO684, SeAx, HDLM2 i HH. Po potwierdzeniu ekspresji *TMEM244* w wybranych liniach komórkowych przeprowadzono analizę Western blot z użyciem specjalnie wykonanych przeciwciał anty-*TMEM244* i przeciwciała anty-FLAG, z linią komórkową typu dzikiego stosowaną jako kontrola. Ponadto, dostępny komercyjnie lizat białkowy z tkanki mózgowej analizowano pod kątem ekspresji białka *TMEM244*, ponieważ zgodnie z bazą danych Human Protein Atlas *TMEM244* ulega wysokiej ekspresji na poziomie mRNA w mózgu. Żadna z analiz Western blot nie wykryła białka *TMEM244*. Ponadto, analiza *in silico* wykazała bardzo niski potencjał kodujący genu *TMEM244*, z wartością odcięcia $< 0,364$ wskazującą na sekwencję niekodującą. Podsumowując, wyniki te wskazują, że *TMEM244* nie ulega ekspresji na poziomie białka, stąd nie jest genem kodującym białko a długim niekodującym RNA (lncRNA).

Eksperymenty w wykorzystaniem metody frakcjonowania oraz RNA FISH pozwoliły na ocenę lokalizacji transkryptu *TMEM244* w komórce, która znajduje się głównie w cytoplazmie. Natomiast dzięki technologii RACE (ang. *rapid amplification of cDNA ends*) zidentyfikowano nowe warianty genu *TMEM244* ulegające ekspresji na poziomie mRNA. Oprócz dwóch znanych transkryptów: wariantu 1 z 5 eksonami (RefSeq NM_001010876; ENST00000368143.6) i wariantu 2 z dodatkowym eksonem na końcu 5' (ENST00000438392.2), dostępnych w Genome Browser, zidentyfikowano dwa dodatkowe warianty: wariant 3 bez eksonu 4 i wariant 4 bez eksonów 2 i 3. Profil

ekspresji każdego wariantu w liniach komórkowych z ekspresją *TMEM244* (SeAx, HH, Hut78, HDML2 i D341med) przeprowadzono przy użyciu RT-qPCR ze starterami specyficznymi dla wariantu. W większości linii komórkowych poziom ekspresji był następujący: wariant 1>wariant2>wariant3>wariant4, z wyjątkiem D341med, gdzie ekspresja wariantu 3 była wyższa niż wariantu 2. Aby ocenić potencjał kodowania każdego wariantu transkryptu, przeprowadzono analizę *in silico* przy użyciu programu CPAT. Analiza potwierdziła, że żaden z wykrytych wariantów nie miał potencjału do kodowania białka. Potencjał kodowania wynosił odpowiednio 0,0976; 0,0003; 0,0359 i 0,0043 dla wariantów 1, 2, 3 i 4.

Aby ustalić funkcję *TMEM244* w komórkach nowotworowych, przeanalizowano wpływ wyciszenia *TMEM244* w liniach komórkowych SeAx i HH z endogenną ekspresją. Wyciszenie *TMEM244* przy użyciu shRNA spowodowało silny negatywny wpływ na wzrost komórek co zostało wykazane w teście kompetycji wzrostu komórek z białkiem zielonej fluorescencji (gfp). Wzrost komórek z wyciszonym genem *TMEM244* był obniżony o 50% w stosunku do komórek prawidłowych. W celu dalszego zbadania mechanizmu hamowania wzrostu po wyciszeniu *TMEM244* w komórkach nowotworowych przeprowadzono barwienie aneksyną V/7AAD w kierunku oceny apoptozy. Wykazano jednak tylko niewielką różnicę w odsetku komórek apoptotycznych w populacji komórek nowotworowych z wyciszonym *TMEM244*.

Podsumowując, badania wykazały, że ekspresja *TMEM244* jest niezbędna do wzrostu komórek CTCL, dlatego można go potencjalnie uznać za nowy cel terapeutyczny w leczeniu CTCL. Chociaż transkrypt *TMEM244* jest zlokalizowany w cytoplazmie, nie koduje on białka, lecz jest długim niekodującym RNA (lncRNA). Zidentyfikowano różne warianty transkryptu *TMEM244*, jednak żaden z nich nie miał znaczącego potencjału kodującego białko i wszystkie ulegały ekspresji na niższym poziomie w porównaniu z głównym wariantem.

Mój wkład polegał na: opracowaniu koncepcji badań; zaplanowaniu eksperymentów; nadzorowaniu prac pod kątem merytorycznym; analizie danych; przeprowadzeniu eksperymentów i interpretacji wyników dotyczących identyfikacji nowych transkryptów (RACE; RT-qPCR); zaprojektowaniu wektorów do nadekspresji; opracowaniu protokołu RNA FISH i analizie danych z eksperymentu; wykonywaniu cytometrii przepływowej i opracowywaniu wyników; prowadzeniu hodowli komórkowych; uczestniczeniu w pisaniu i korekcie manuskryptu; koordynowaniu procesu związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań

Do najważniejszych osiągnięć prac badawczych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego należą:

1. Przeanalizowanie genomów i transkryptomów pacjentów z zespołem Sézary'ego pod kątem zmian liczby kopii i rearanżacji skutkujących deregulacją transkryptomu oraz wytypowanie nowych genów kandydatów do dalszych badań.
2. Wykazanie zmian liczby kopii w rejonach znanych już genów supresorowych (TP53, PTEN, FAS), onkogenów (MYC), i nowych genów kandydatów (ZEB1, USP28, CAAP1), oraz deregulacji modulatorów epigenetycznych (NCOR1, CTBP1, DNMT3A) i genów zaangażowanych w szlak sygnalizacji TCR (PTPRC).
3. Zidentyfikowanie nowych genów fuzyjnych, ulegających ekspresji w postaci transkryptów fuzyjnych zgodnych z ramką odczytu, albo prowadzących do aktywacji fragmentów genów nieulegających ekspresji w limfocytach T.
4. Zidentyfikowanie nowych rearanżacji genów, które wpłynęły znacząco na poziom ekspresji genów, takich jak *TMEM244*, *EHD1*, *MTMR2*, *RNF123* and *TOX*.
5. Wykazanie, iż gen *TMEM244* ulega ekspresji ektopowej u wszystkich pacjentów z zespołem Sézary'ego, w mniejszym stopniu w ziarniniaku grzybiastym i innych chłoniakach T-komórkowych, ale nie ulega ekspresji w nowotworach złośliwych z komórek B i komórkach jednojądrzastych zdrowych osób.
6. Wykazanie, iż w prawidłowych komórkach ekspresja genu *TMEM244* jest wykrywalna na niewielkim poziomie tylko w populacji dojrzałych limfocytów T pamięci CD45RO+, zarówno CD4+ jak i CD8+, co jest zgodne z immunofenotypem zespołu Sezry'ego
7. Wskazanie hipometylacji jako mechanizmu regulującego ekspresję *TMEM244*, co zaobserwowano w nowatorskiej analizie *in silico* z zastosowaniem systemu CRISPR-dCas9-TET1 do swoistej demetylacji badanego regionu promotorowego.
8. Wykazanie, iż *TMEM244* nie koduje białka, a pełni funkcję długiego niekodującego RNA, który zlokalizowany jest głównie w cytoplazmie.
9. Zidentyfikowanie nowych wariantów transkrypcji genu *TMEM244* i potwierdzenie ich niskiego potencjału kodującego.
10. Udowodnienie, iż wysoka ekspresja *TMEM244* ma potencjał diagnostyczny mogący odróżnić zespół Sezar'ego od innych chorób o podobnym obrazie klinicznym, w tym ziarniniaka grzybiastego oraz erytrodemii nienowotworowych.
11. Wykazanie, iż ekspresja *TMEM244* jest niezbędna dla wzrostu komórek nowotworowych i może być potencjalnym celem terapii antynowotworowej.
12. Przedstawienie celowanych terapii chłoniaków T-komórkowych wdrożonych jak i testowanych w próbach klinicznych.

OMÓWIENIE GŁÓWNYCH OSIĄGNIĘĆ POZA CYKLEM PRAC

Wpływ nadekspresji deacetylazy histonowej 10 na biologię komórek nowotworowych w zespole Sézary'ego

Tematyka poszukiwania podłoża molekularnego zespołu Sézary'ego jest przede mną kontynuowana w ramach trwającego projektu, którego jestem kierownikiem, pt. „Znaczenie deacetylaz histonowych klasy II: HDAC9 i HDAC10 w zespole Sézary'ego”, finansowanego w ramach konkursu NCN SONATA15 (2019/35/D/NZ5/00407). Jedną z terapii w leczeniu chłoniaków skórnych jest zastosowanie inhibitorów deacetylaz histonowych (HDACi), głównie w lekach takich jak Verinostat i Romidepsina [1]. Deacetylazy histonowe (HDACs) biorą udział w regulacji ekspresji genów poprzez deacetylację histonów i zmianę w kondensacji chromatyny w wyniku czego zablokowany jest dostęp czynników transkrypcyjnych, co prowadzi do represji transkrypcji [17]. Zidentyfikowano 18 HDACs i pogrupowano je w cztery klasy. Inhibitory HDAC (HDACi) wpływają na HDAC klasy I, II i IV, prowadząc do kilku dalszych efektów w komórkach nowotworowych, w tym zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Jednak trudno jest przypisać precyzyjny sposób działania tych leków, ponieważ mają one szerokie spektrum działania i wpływają na wiele deacetylaz. W celu opracowania nowych, bardziej specyficznych terapii, kluczowe jest zrozumienie, które HDACs ulegają deregulacji w poszczególnych nowotworach i jakie są tego konsekwencje. Celem obecnego projektu jest analiza, czy zmieniona ekspresja określonego HDAC przyczynia się do wzrostu lub przeżycia komórek nowotworowych w chłoniakach skórnych z komórek T. Wykazano, że ekspresja HDAC klasy II może być specyficzna dla danego typu nowotworu i związana z przebiegiem choroby. Analiza RNAseq pacjentów z ZS, którą przeprowadziłam będąc głównym wykonawcą w projekcie NCN HARMONIA, wykazała nadekspresję większości genów HDAC klasy II w próbkach od pacjentów z zespołem Sézary'ego w porównaniu z normalnymi komórkami T, a wyniki zostały potwierdzone z użyciem RT-qPCR na dodatkowej grupie pacjentów. Ponieważ różnica w ekspresji była bardzo znacząca dla HDAC9 i HDAC10, wyselekcjonowałam je do dalszych badań i przygotowałam projekt grantowy, który uzyskał finansowanie w konkursie NCN SONATA 15. Celem projektu jest zbadanie znaczenia wybranych deacetylaz histonów klasy II HDAC9 i HDAC10 w zespole Sézary'ego, ich wpływu na biologię komórki, globalną ekspresję genów i poszczególne szlaki komórkowe. W ramach projektu badany jest wpływ HDAC9 i HDAC10 na kluczowe procesy biologiczne, takie jak apoptoza, cykl komórkowy, proliferacja komórek i autofagia. Dodatkowo, przeprowadzana jest analiza RNAseq w celu indentyfikacji zmian w globalnej ekspresji genów i szlakach komórkowych, na które wpływają te deacetylazy. Przy pomocy ChiP-Seq mapowane są miejsca wiązania dla HDAC9 i HDAC10 w genomie, a za pomocą koimmunoprecypitacji (Co-IP) i spektrometrii mas identyfikowane są białka, z którymi badane deacetylazy tworzą

kompleksy. Wyniki uzyskane w ramach realizowanego projektu przyczynią się nie tylko do lepszego zrozumienia patogenezы zespołu Sézary'ego i być może do ulepszenia terapii, ale także do zwiększenia ogólnej wiedzy na temat HDAC9 i HDAC10 oraz sposobu ich działania.

Projekt jest prowadzony od lipca 2020 roku. W ramach projektu realizowana jest praca doktorska Moniki Pieniawskiej, oraz praca magisterska Bogumiły Skwary, a także współpraca z Katedrą i Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Katedrą i Kliniką Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Jak dotąd opracowaliśmy stabilne linie komórkowe z nadekspresją i wyciszeniem genów HDAC9 i HDAC10, oraz przeprowadziliśmy większość testów funkcjonalnych. Wpływ nadekspresji HDAC10 dodatkowo zbadaliśmy w pierwotnych limfocytach T CD4+ pozyskanych od zdrowych dawców. Ponadto, oceniliśmy lokalizację badanych białek zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych. Analizy pokazały głównie cytoplazmatyczną lokalizację wybranych białek w limfocytach T i komórkach Sézary'ego. Ponadto, wykazaliśmy wpływ nadekspresji HDAC10 na progresję apoptozy w komórkach w obecności czynnika proapoptycznego kamptotecyny, który jest zaliczany do leków przeciwnowotworowych. Ta obserwacja sugeruje, iż nadekspresja HDAC10 może zmieniać odpowiedź komórek nowotworowych na działanie innych leków indukujących apoptozę stosowanych w terapii antynowotworowej chłoniaków skórnych, takich jak np. doksorubicyna. Ta hipoteza będzie weryfikowana w kolejnych badaniach z zastosowaniem leków indukujących programowaną śmierć komórki i swoistych inhibitorów HDAC10.

Uzyskane jak dotąd wyniki zostały zaprezentowane w postaci plakatów na VI Kongresie Genetyki w Krakowie (26-30.06.2022) oraz na międzynarodowej konferencji EMBL (Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej; ang. EMBL) pt. „Chromatin and transcription” w Hedeilbergu (26-30.08.2022): Pieniawska M., Rassek K., Skwara B., Żurawek M., Ziółkowska-Suchanek I., Podralska M., Nowicka K., Rozwadowska N., **Iżykowska K.**, *Histone deacetylase 10 is localized mainly in the cytoplasm and its overexpression affects the apoptosis progression in cutaneous T-cell lymphoma cells.* Ponadto, nasze badania zostały docenione przez organizatorów dwóch wydarzeń krajowych i wybrane do prezentacji ustnej na Zjeździe sekcji Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w Łodzi (20-21.10.22), gdzie prezentacja ustna, wygłoszona przez doktorantkę Monikę Pieniawską, została wyróżniona w sesji prac eksperymentalnych, oraz na „XIV Ogólnopolskiej Konferencji Postępów w Badaniach Biomedycznych”, która odbyła się 04.03.2023r. w Warszawie, gdzie Monika Pieniawska otrzymała główną nagrodę im. Prof. Kazimierza Ostrowskiego za wystąpienie ustne pt. „Wpływ nadekspresji deacetylazy histonowej 10 na biologię komórek nowotworowych w Zespole Sézary'ego”. W ramach projektu powstała również praca przeglądowa dotycząca znaczenia deacetylaz histonowych w limfocytach T (Monika Pieniawska, **Katarzyna Iżykowska***, *Role of Histone Deacetylases in T-Cell Development and*

Function. Int J Mol Sci. 2022 Jul 15;23(14):7828. doi: 10.3390/ijms23147828), przedstawiająca aktualny stan wiedzy na temat olbrzymiej roli jaką pełnią deacetylazy histonowe w rozwoju i funkcjonowaniu limfocytów T.

Stworzenie indukowalnego nokautu genu BCL11B w transgenicznym mysim modelu TAL1/LMO1 białaczki/chłoniaka z komórek T

W ramach pierwszego polsko-chińskiego konkursu bilateralnego NCBiR byłam zaangażowana w realizację projektu pt. „Podwójny efekt supresji genu *BCL11B* w celowanej terapii nowotworów z komórek T”, pełniąc funkcję współkierownika projektu. Grant był realizowany we współpracy z profesorem Grzegorzem Przybylski i profesor Yangqiu Li z Uniwersytetu Jinan w Guangzhou w Chinach. Gen *BCL11B* odgrywa kluczową rolę w rozwoju komórek T, ale jego rola w nowotworach złośliwych z komórek T jest nadal niejasna [18]. W Instytucie Genetyki Człowieka PAN prowadzone były badania z wykorzystaniem mysiego modelu białaczki/chłoniaka z komórek T z indukowalnym systemem wycięcia genu *BCL11B*, w celu oceny efektu terapeutycznego wyciszenia tego genu w komórkach nowotworowych. Myszy posiadające ludzki onkogen *TAL1* lub *LMO1*, odpowiedzialne za rozwój ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek T (ang. *T-cell acute lymphoblastic leukemia*, T-ALL), krzyżowano z osobnikami „*BCL11B* floxed” i z „*CRE-ER/lox*”. Myszy z pojedynczym onkogenem *BCL11B*^{flox/flox}*CRE*^{tg/tg}*TAL1*^{tg} lub *BCL11B*^{flox/flox}*CRE*^{tg/tg}*LMO1*^{tg} były zdrowe, hodowane normalnie i były używane do utrzymania myszy w hodowli. Po skrzyżowaniu u ponad 90% podwójnie transgenicznych myszy *BCL11B*^{flox/flox}*CRE*^{tg/tg}*TAL1*^{tg}*LMO1*^{tg}, w ciągu 3 do 6 miesięcy po urodzeniu, spontanicznie rozwijała się białaczka/chłoniak z komórek T. Po podaniu syntetycznego estrogeny (tamoksyfenu), który wiąże się z receptorem estrogenowym i aktywuje rekombinazę Cre, gen *BCL11B* został wyeliminowany przez wycięcie jego czwartego eksonu z genomu. Opis wyprowadzania modelu mysiego przedstawiono w pracy: Grzegorz K Przybylski*, Dorota Korsak, **Katarzyna Iżykowska**, Karina Nowicka, Tomasz Zalewski, Małgorzata Tubacka, Maria Mosor, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska, Magdalena Frydrychowicz, Maciej Boruczkowski, Grzegorz Dworacki, Jens van den Brandt, Piotr Grabarczyk, Christian A Schmidt, Chengwu Zeng, Yangqiu Li. *Generation of Inducible BCL11B Knockout in TAL1/LMO1 Transgenic Mouse T Cell Leukemia/Lymphoma Model*. Int J Mol Sci. 2022 Apr 29;23(9):4932. doi: 10.3390/ijms23094932 (IF₂₀₂₁-6,208). Rozpoznanie atypowych limfocytów T potwierdzane było przy pomocy cytometrii przepływowej komórek krwi obwodowej. Opracowany protokół barwienia komórek krwi umożliwił ocenę rozwoju białaczki na podstawie analizy ekspresji markerów powierzchniowych takich jak CD3, CD4, CD8, CD44, CD25, oraz markera wewnątrzkomórkowego jakim była terminalna transferaza deoksynukleotydowa (TdT). W przeciwieństwie do zdrowych myszy, u zwierząt, u których rozwinęła się białaczka, oprócz zwiększonego stosunku komórek CD3+, wykryto podwójnie dodatkowo subpopulacje komórek T CD4+/CD8+, CD25+ lub

TdT+. Kolejny pomiar przeprowadzono po wycięciu genu BCL11B, w celu oceny efektu wycięcia tego genu na obecność markerów nowotworowych we krwi. Dodatkowo wykazano, iż supresja BCL11B powoduje transformację komórek T w komórki NK, czego dowodem jest ekspresja markera NK1.1. Natomiast w zespole profesor Yangqiu Li prowadzone są badania nad określeniem efektu terapeutycznego genu BCL11B w modelu mysim NSI (NOD-scid-IL2Rg^{-/-}) po ksenotransplantacji komórek od pacjentów z białaczką T-ALL.

Stworzony przez nas model myszy można wykorzystać do badania funkcji genu BCL11B w nowotworach złośliwych z komórek T, zwłaszcza wpływu supresji tego genu na komórki nowotworowe, tym bardziej iż nadal nie wynaleziono swoistego inhibitora BCL11B.

Piśmiennictwo

1. Yumeen, S. and M. Girardi, *Insights Into the Molecular and Cellular Underpinnings of Cutaneous T Cell Lymphoma*. Yale J Biol Med, 2020. **93**(1): p. 111-121.
2. Hristov, A.C., T. Tejasvi, and R.A. Wilcox, *Mycosis fungoides and Sezary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2019. **94**(9): p. 1027-1041.
3. Willemze, R., et al., *The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas*. Blood, 2019. **133**(16): p. 1703-1714.
4. Nakai, S., E. Kiyohara, and R. Watanabe, *Malignant and Benign T Cells Constituting Cutaneous T-Cell Lymphoma*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
5. Alaggio, R., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms*. Leukemia, 2022. **36**(7): p. 1720-1748.
6. Izykowska, K., et al., *Identification of multiple complex rearrangements associated with deletions in the 6q23-27 region in Sezary syndrome*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(11): p. 2617-2625.
7. Izykowska, K., et al., *Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sezary syndrome*. Oncotarget, 2017. **8**(24): p. 39627-39639.
8. Rassek, K. and K. Izykowska, *Single-Cell Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphomas Revealed Using RNA-Seq Technologies*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).
9. Herrera, A., et al., *Multimodal single-cell analysis of cutaneous T-cell lymphoma reveals distinct subclonal tissue-dependent signatures*. Blood, 2021. **138**(16): p. 1456-1464.
10. Miyashiro, D., et al., *The Role of Tumor Microenvironment in the Pathogenesis of Sezary Syndrome*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(2).
11. Wang, L., et al., *Genomic profiling of Sezary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes*. Nat Genet, 2015. **47**(12): p. 1426-34.
12. Choi, J., et al., *Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 1011-9.

13. Sors, A., et al., *Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2354-63.
14. da Silva Almeida, A.C., et al., *The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sezary syndrome*. Nat Genet, 2015. **47**(12): p. 1465-70.
15. Foss, F.M. and M. Girardi, *Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome*. Hematol Oncol Clin North Am, 2017. **31**(2): p. 297-315.
16. Izykowska, K., *Methylation patterns of cutaneous T-cell lymphomas*. Exp Dermatol, 2021. **30**(8): p. 1135-1140.
17. Milazzo, G., et al., *Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability*. Genes (Basel), 2020. **11**(5).
18. Avram, D. and D. Califano, *The multifaceted roles of Bcl11b in thymic and peripheral T cells: impact on immune diseases*. J Immunol, 2014. **193**(5): p. 2059-65.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

OPIS KIERUNKÓW BADAWCZYCH REALIZOWANYCH W OKRESIE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA:

Aktywność naukowa w zagranicznej jednostce naukowej – Woolcock Institute of Medical Research, Sydney, Australia

Po zakończeniu studiów magisterskich na Wydziale Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu wyjechałam do Australii, gdzie w 2006 roku rozpoczęłam studia magisterskie na wydziale biotechnologii molekularnej Uniwersytetu w Sydney. Studia ukończyłam w 2007 roku i uzyskałam tytuł „Master of Applied Science”. W czasie trwania studiów zrealizowałam samodzielnie projekt naukowy w instytucji naukowej **Woolcock Institute of Medical Research**, w którym prowadzone są badania dotyczące zaburzeń snu, problemów z oddychaniem oraz alergii. W zespole profesora Euana Tovey’a (Allergen Group), oraz pod bezpośrednią opieką Jasona Sercombe, zrealizowałam projekt dotyczący pomiaru stężenia alergenu Der p 1 w powietrzu, w obecności zlokalizowanych systemów filtracji powietrza. Po udanej współpracy zostałam zatrudniona w zespole profesora Tovey’a w celu kontynuacji pracy. Alergen Der p 1 jest produkowany przez roztocza domowe i stanowi w Australii jedną z głównych przyczyn zaostrzenia objawów astmy oskrzelowej. Jego wysokie stężenie może znajdować się nie tylko w osadzonym kurzu, ale także w powietrzu, co ma o wiele większe znaczenie w kontekście zaostrzenia objawów alergii. Pomiar stężenia alergenu w powietrzu pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów ekspozycji na alergeny wziewne oraz zbadanie efektywności miejscowej filtracji

powietrza przez urządzenia zaprojektowane w celu redukcji ekspozycji. Zespół profesora Tovey'a nie tylko opracował technologię pomiaru alergenów w powietrzu, ale także zainicjował prace nad stworzeniem bardziej efektywnych urządzeń do filtracji powietrza, które mogłyby być stosowane przez osoby z alergiami wziewnymi.

W realizowanym przeze mnie projekcie stężenie alergenu Der p 1 w powietrzu mierzono w dwóch sypialniach w dwóch oddzielnych domach przy użyciu próbników frakcji wdychanej powietrza IOM oraz testów immunologicznych ELISA i testu halogenowego. Liczbę cząsteczek unoszących się w powietrzu zmierzono za pomocą laserowego licznika cząstek. Pomiaru były wykonane zarówno bez filtracji powietrza, jak i w bliskiej odległości od specjalnie zaprojektowanego filtra powietrza, w warunkach spokojnej aktywności domowej oraz w pustym pomieszczeniu. Pomiaru wykazały, iż bez filtracji powietrza występuje wysoki poziom Der p 1 w powietrzu w warunkach dużej aktywności w pomieszczeniu (średnia geometryczna testu ELISA 3567,7 pg/m³). Mniej unoszącego się w powietrzu Der p 1 wykryto przy cichej aktywności (46,40 pg/m³) i w niezamieszkanym pomieszczeniu (11,35 pg/m³). Z filtrem powietrza stężenie Der p 1, zmierzone metodą ELISA, zmniejszyło się o >70% (p=0,0037), co wykazał również test immunologiczny halogen. Natomiast pomiar laserowego licznika cząstek wykazał, że filtr powietrza wytworzył zlokalizowaną strefę z > 85% redukcją unoszących się w powietrzu cząsteczek ≥1 μm. Podsumowując, miejscowy filtr powietrza skutecznie usuwał unoszące się w powietrzu alergeny rozpuszczone Der p 1 i inne cząstki z małej strefy w pobliżu wylotu przefiltrowanego powietrza. Wyniki zostały przedstawione w postaci dwóch doniesień zjazdowych: „Airborne der p 1 can be found in undisturbed conditions and can be removed by localized air filtration (P21)”, **Katarzyna Wrzeszcz (K. Iżykowska)**, Christina Weber-Chrysochoou, Jason Sercombe, Euan Tovey; Australian Society of Clinical Immunology & Allergy 18th Annual Scientific Meeting; INTERNAL MEDICINE JOURNAL 2007 (<https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2007.01558.x> (poster 21)), oraz “Localized air filtration can reduce airborne der p 1 allergen concentration and airborne particle count in both disturbed and undisturbed conditions” **K. Wrzeszcz (K. Iżykowska)**, J. K. Sercombe, E. R. Tovey; 64th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. J ALLERGY CLIN IMMUNOL, FEBRUARY 01, 2008 (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.12.367>). (Wrzeszcz jest moim nazwiskiem panięskim)

Charakterystyka molekularna delecji w regionie 6q23-27 w zespole Sézary'ego i białaczce z dużych ziarnistych limfocytów T

Po powrocie do Polski rozpoczęłam staż doktorski w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w Zakładzie Patologii Molekularnej kierowanego przez profesora Jerzego Nowaka. Promotorem mojej pracy doktorskiej był profesor Grzegorz Przybylski, a tematem rozprawy „Charakterystyka molekularna delecji w regionie

6q23-27 w zespole Sézary'ego i białaczce z dużych ziarnistych limfocytów T (T-LGL)". Projekt był realizowany we współpracy z ośrodkami zagranicznymi: Uniwersytetem w Greifswaldzie, Charité-Universitätsmedizin w Berlinie i HELIOS Klinikum Berlin Buch. Zarówno zespół Sézary'ego jak i białaczka T-LGL należą do grupy rzadkich chłoniaków nieziarnicznych z dojrzałych komórek T i charakteryzują się obecnością komórek nowotworowych we krwi obwodowej oraz dużą niestabilnością chromosomową. W momencie, kiedy rozpoczęłam pracę w tej tematyce, nie udało się ustalić typowych aberracji chromosomowych, które mogłyby być bezpośrednio zaangażowane w rozwój tych nowotworów. Prowadzone badania cytogenetyczne i molekularne wykazywały obecność wielu aberracji chromosomowych u pacjentów z zespołem Sézary'ego i T-LGL, a delecje w obrębie długiego ramienia chromosomu 6-tego (6q) były jednymi z najczęściej pojawiających się zmian. Region 6q często ulega zmianom w różnych nowotworach, stąd przypuszczano, iż znajdują się tam geny biorące udział w onkogenezie. Szczegółowa charakterystyka molekularna zmian na poziomie DNA mogła zatem ujawnić, które geny uległy zmianom i wyłonić możliwe geny fuzyjne. Celem tego projektu była analiza regionu 6q23-27 na poziomie molekularnym u 12 pacjentów z zespołem Sézary'ego i w linii komórkowej SeAx, MOTN-1 oraz u 3 pacjentów z T-LGL. Wysokorozdzielcza porównawcza hybrydyzacja genomów (FT-CGH) przeprowadzona dla regionu 6q23-27 wykazała obecność delecji u 6 pacjentów z zespołem Sézary'ego, linii SeAx i MOTN-1, oraz u jednego pacjenta z T-LGL. Wcześniejsze badania wykazały, iż zmiany liczby kopii DNA wykryte metodą FT-CGH mogą być skojarzone w miejscu pęknięcia ze zmianami strukturalnymi, takimi jak inwersje czy translokacje. Próbkę, w których obecność delecji została wykazana metodą FT-CGH poddano analizie techniką ang. ligation-mediated PCR (LM-PCR) w celu zsekwencjonowania poszczególnych punktów pęknięcia. Dodatkowo, dla dwóch przypadków zespołu Sézary'ego przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji z dwóch końców (ang. *paired-end next generation sequencing*) przy wykorzystaniu platformy HiSeq2000 firmy Illumina, co w czasie kiedy wykonywałam pracę doktorską było podejściem bardzo nowatorskim. Nasza grupa badawcza zainicjowała powyższe analizy w Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Wykorzystując te metody scharakteryzowałam łącznie 42 punkty pęknięć i wykryłam 25 nowych rearanżacji, będących wynikiem 8 prostych delecji, 8 inwersji, 5 translokacji (z chromosomem 3, 10, 12 w zespole Sézary'ego i chromosomem 14 i 22 w T-LGL) oraz 4 transpozycji. W wyniku zidentyfikowanych rearanżacji 16 genów uległo pęknięciu, w tym onkogen MYB i IL22RA2 uległy pęknięciu więcej niż jeden raz w zespole Sézary'ego. Podsumowując, połączenie techniki FT-CGH i LM-PCR, oraz zastosowanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania NGS wykazało obecność wielu różnych rearanżacji, również wynikających z inwersji oraz translokacji, skojarzonych z delecją w rejonie 6q-23-27 z zespołem Sézary'ego i białaczce T-LGL.

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej były opublikowane w formie dwóch prac oryginalnych, z czego jedna dotyczyła zespołu Sézary'ego, natomiast druga

białaczki T-LGL, i zostały przyjęte do druku po obronie doktoratu. W pracy dotyczącej zespołu Sézary'ego: **Iżykowska K**, Zawada M, Nowicka K, Grabarczyk P, Braun FCM, Delin M, Möbs M, Beyer M, Sterry W, Schmidt CA, Przybylski GK. *Identification of Multiple Complex Rearrangements Associated with Deletions in the 6q23-27 Region in Sézary Syndrome*. J Invest Dermatol. 2013 Nov;133(11):2617-2625. doi: 10.1038/jid.2013.188. Epub 2013 Apr 18. (IF₂₀₁₃-6,372), zamieściłam nie tylko wyniki mojej pracy doktorskiej opisane powyżej, ale poszerzyłam badania o analizę RT-qPCR oraz technikę wielokolorowej fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. multicolour FISH; mFISH). Analiza cytogenetyczna na linii SeAx przy pomocy mFISH potwierdziła obecność większych rearanżacji wykrytych przy pomocy technik molekularnych. W celu zbadania wpływu rearanżacji na ekspresję genów, ekspresja trzech genów zaangażowanych w rearanżacje: *MYB*, *IL22RA2* i *PERP*, oraz trzech genów regulowanych przez c-MYB: *MYC*, *BCL2*, and *HSPA8*, została oceniona przy pomocy techniki RT-qPCR. Wszyscy trzej pacjenci ze zmianami w genie *MYB* wykazywali niski poziom ekspresji *MYB*, podczas gdy siedmiu pozostałych pacjentów wykazało nadekspresję. Większość pacjentów z nadekspresją *MYB* wykazywało również zwiększoną ekspresję *MYC*, *HSPA8* i *BCL2*. Poza tym zidentyfikowano pięć fuzji genów, z których dwa, *CCDC28A-IL22RA2* i *AIG1-GOSR1*, oba w SeAx, były w tej samej orientacji i uległy ekspresji na poziomie RNA.

W pracy dotyczącej białaczki T-LGL: **Iżykowska K**, Zawada M, Nowicka K, Grabarczyk P, Kuss AW, Weissmann R, Busemann C, Ludwig WD, Schmidt CA, Przybylski GK. *Submicroscopic genomic rearrangements change gene expression in T-cell large granular lymphocyte leukemia*. Eur J Haematol. 2014 Aug;93(2):143-9. doi: 10.1111/ejh.12318. Epub 2014 Apr 9. (IF₂₀₁₄-2,066), zamieściłam wyniki mojej rozprawy doktorskiej, jak i badania uzyskane w ramach realizacji projektu NCN PRELUDIUM, którego byłam kierownikiem podczas stażu doktorskiego. Oprócz analizy regionu 6q u pacjentów z białaczką T-LGL, przeprowadzono analizę mFISH linii komórkowej MOTN-1, wyprowadzonej od pacjenta z T-LGL, jak również sekwencjonowanie nowej generacji (NGS; Illumina HiSeq2000) tej linii komórkowej i jednego pacjenta z T-LGL, natomiast ekspresję genów badano przy pomocy techniki RNAseq (SOLID5500). Rearanżacje wykryte w rejonie 1p i 2q w linii MOTN-1 spowodowały zmianę ekspresji genów *FGR*, *ZEB2* i *CASP8*, natomiast te wykryte w rejonie 6q w MOTN-1 i u jednego pacjenta z T-LGL, wpłynęły na poziom ekspresji genów *MAP3K5* i *IFNGR1*. Dziewiętnaście genów, w tym *FOXN3*, *RIN3*, *AKT1*, *PPP2R5C*, uległo nadekspresji w wyniku amplifikacji w regionie 14q u jednego pacjenta z T-LGL oraz zidentyfikowano dwa nowe transkrypty fuzyjne: *CASP8-ERBB4* w linii MOTN-1 i *SBF1-PKHD1L1* u pacjenta z T-LGL.

Charakterystyka starzenia się układu immunologicznego u długowiecznych myszy Ames dwarf

W trakcie trwania doktoratu byłam również zaangażowana w realizację projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N401 0426 38 pt.: „Charakterystyka starzenia się układu immunologicznego u długowiecznych myszy Ames dwarf”, we współpracy z Michałem Masternakiem. W ramach projektu wykonano analizę RT-qPCR liczby kopii TREC i genu referencyjnego RAG2 w próbkach DNA z leukocytów krwi obwodowej myszy Ames dwarf i normalnej kontroli, w celu porównania historii proliferacyjnej limfocytów T. Historię proliferacyjną limfocytów T można ustalić oznaczając odsetek komórek posiadających fragment genu receptora limfocytów T ulegających wycięciu podczas jego rearanżacji (ang. *T cell receptor excision circle*; TREC), gdyż wskaźnik ten maleje po każdym podziale komórki. W czterech niezależnych pomiarach, próbek pobranych od czterech różnych grup zwierząt stwierdzono nieznacznie wyższy (12-20%) poziom TREC u myszy Ames dwarf w porównaniu z ich normalną kontrolą.

OPIS KIERUNKÓW BADAWCZYCH REALIZOWANYCH W OKRESIE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA:

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w 2013 roku, oprócz badań opisanych wyżej w osiągnięciach, które stanowiły główny nurt mojej pracy, byłam i jestem nadal zaangażowana w inne projekty realizowane w Instytucie Genetyki Człowieka PAN i we współpracy ze innymi ośrodkami.

Znaczenie indukowanego hipoksją genu FAM13A w niedrobnokomórkowym raku płuc

W ramach współpracy z dr hab. n. med. Iwoną Ziótkowską-Suchanek brałam udział w realizacji projektu dotyczącego oceny wpływu hipoksji na ekspresję genów *IREB2* i *FAM13A* w niedrobnokomórkowym raku płuc (ang. non small cell lung cancer – NSCLC). Poziom ekspresji genów badano w liniach NSCLC i prawidłowych komórkach płuc oraz wycinkach guzów płuc, hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i hipoksji. Dodatkowo, określono wpływ hipoksji na ilość produktu białkowego badanych genów przy pomocy metody Western blot. Materiał do badań pozyskiwano z Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii im. Eugenii i Janusza Zeylandów w Poznaniu. Wykazano, że hipoksja indukuje nadekspresję genu *FAM13A*, zwłaszcza w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i fragmentach pozyskanych z guzów płuc. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Journal of Cancer*: Ziótkowska-Suchanek I*, Mosor M, Podralska M, **Iżykowska K**, Gabryel P, Dyszkiewicz W, Słomski R, Nowak J. *FAM13A as a Novel Hypoxia-Induced Gene in Non-Small Cell Lung Cancer*.

J Cancer. 2017 Oct 23;8(19):3933-3938. doi: 10.7150/jca.20342 (IF₂₀₁₇-3,249). Badania nad genem FAM13A kontynuowano w projekcie dotyczącym efektu wyciszenia tego genu w komórkach raka płuc. Przeprowadzono szereg testów funkcjonalnych, w celu określenia proliferacji, migracji oraz inwazyjności komórek NSCLC z wyłączonym genem *FAM13A*. Wykazano, iż inhibicja genu *FAM13A* w liniach niedrobnokomórkowego raka płuc, hodowanych w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu i hipoksji, powoduje ograniczenie proliferacji w wyniku zaburzeń cyklu komórkowego, spowolnienie tempa migracji w związku ze zmianami w cytoskiecie, oraz zmniejszenie inwazyjności, co sugeruje iż *FAM13A* wpływa na potencjał przerzutowy komórek raka płuc. Wyniki opublikowano w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences: Iwona Ziółkowska-Suchanek*, Marta Podralska, Magdalena Żurawek, Joanna Łacmańska, **Katarzyna Iżykowska**, Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, Natalia Rozwadowska. *Hypoxia-Induced FAM13A Regulates the Proliferation and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells*. Int J Mol Sci. 2021 Apr 21;22(9):4302. doi: 10.3390/ijms22094302 (IF₂₀₂₁-6,208).

Poszukiwanie czynników epigenetycznych związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w cukrzycy typu 1

W ramach współpracy z dr hab. m. med. Magdaleną Żurawek z Instytutu Genetyki Człowieka oraz dr hab. n. med. Martą Fichną z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, byłam zaangażowana w badanie czynników epigenetycznych, a dokładnie cząsteczek microRNA, związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w cukrzycy typu 1 (ang. *type 1 diabetes*, T1D). Celem badań była analiza profilu ekspresji miRNA w T1D oraz wpływu rozregulowanych miRNA na geny docelowe. Globalną ekspresję miRNA oceniano przy pomocy mikromacierzy Affymetrix GeneChip miRNA 4.0, w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej pozyskanych od 15 dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1, i 3 próbek kontrolnych od osób bez cukrzycy. Analiza wykazała 24 miRNA o podwyższonej ekspresji oraz 67 miRNA o obniżonej ekspresji u chorych z T1D w porównaniu do osób zdrowych. W celu weryfikacji eksperymentu, przeprowadzono analizę RT-qPCR u 28 nowo zdiagnozowanych pacjentów z T1D i 28 zdrowych dawców dobranych pod względem wieku. Ta analiza potwierdziła nadekspresję między innymi miR-487a-3p, który wybrano do dalszych badań. W analizie in silico wytypowano następujące geny jako potencjalnie regulowane przez miR-487a-3p: *CTLA4*, *FOXO3*, *MARCH5* i *PTPN2*, z czego dla dwóch: *CTLA4* i *FOXO3* udowodniono bezpośrednie oddziaływanie w rejonie 3'UTR z badanym microRNA, z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy. Wyniki sugerują, że miR-487a-3p może obniżać ekspresję *CTLA4* i *FOXO3* poprzez wiązanie się z ich 3'UTR i przyczyniać się do rozwoju T1D, co zostało opublikowane w pracy: Żurawek M*, Dzikiewicz-Krawczyk A, **Iżykowska K**, Ziółkowska-Suchanek

I, Skowronska B, Czainska M, Podralska M, Fichna P, Przybylski G, Fichna M, Nowak J. *miR-487a-3p upregulated in type 1 diabetes targets CTLA4 and FOXO3*. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Aug;142:146-153. doi: 10.1016/j.diabres.2018.05.044 (IF₂₀₁₈-3,239).
Celem kolejnych badań było zbadanie poziomu ekspresji miR-652-5p u pacjentów z rozpoznaną cukrzycą T1D oraz wpływu jego ekspresji na potencjalne geny docelowe: *ADAR* i *MARCH5*, co opisano w pracy: M. Żurawek*, A. Dzikiewicz-Krawczyk, **K. Iżykowska**, I. Ziółkowska-Suchanek, B. Skowronska, M. Czainska, M. Kazimierska, M. Podralska, P. Fichna, G.K. Przybylski, J. Nowak, M. Fichna, N. Rozwadowska. *Overexpression of miR-652-5p in new onset type 1 diabetes*. *Clinical Diabetology*. 2018;7(4):189-195. DOI: 10.5603/DK.2018.0019. Analiza wykazała nadekspresję miR-652-5p w grupie T1D w porównaniu ze zdrowymi kontrolami, jednak test reporterowy lucyferazy nie wskazał, żeby miR-652-5p wiązał się do rejonu 3'UTR genów *ADAR* i *MARCH5*.

Identyfikacja i funkcjonalna charakterystyka długich niekodujących RNA zaangażowanych w zależną od ATM odpowiedź na uszkodzenia DNA

W kolejnym projekcie (NCN OPUS14), który jest w trakcie realizacji, współpracuję z dr hab. n. med. Agnieszką Dzikiewicz-Krawczyk oraz dr n. med. Martą Podralską. Prowadzone badania mają na celu identyfikację długich niekodujących RNA (lncRNA) indukowanych przez napromieniowanie, identyfikację lncRNA oddziałujących z białkiem ATM oraz funkcjonalną charakterystykę wybranych lncRNA w kontekście odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Wyniki zostały zaprezentowane m. in. na Sympozjum w Keystone w Stanach Zjednoczonych: Non-Coding RNAs: Biology and Applications: M Podralska, M Sajek, A Bielicka, M Żurawek, I Ziółkowska-Suchanek, **K Iżykowska**, T Kolenda, M Kazimierska, M Kasprzyk, W Sura, B Pietrucha, B Cukrowska, N Rozwadowska, A Dzikiewicz-Krawczyk. *Identification of irradiation-induced ATM-dependent lncRNAs*.

Plany

W najbliższej przyszłości pragnę skupić się przede wszystkim na kontynuacji realizacji projektu NCN SONATA15, którego jestem kierownikiem.

Moje przyszłe projekty chciałabym oprzeć na rozwijaniu zagadnień związanych z epigenetyką, zarówno w kontekście chorób nowotworowych, jak i ogólnie mechanizmów działania modulatorów epigenetycznych w komórkach. Epigenetyka to dziedzina bardzo złożona i wiele jej aspektów jest jeszcze nie do końca wyjaśnionych, stąd olbrzymie zainteresowanie naukowców tą tematyką. Mój obecny projekt dotyczy dwóch wybranych regulatorów epigenetycznych i ich mechanizmów działania, natomiast istnieje cała grupa deacetylaz histonowych, szczególnie w klasie II, które mimo swojej nazwy, często są zaangażowane w inne procesy niż regulacja transkrypcji

poprzez deacetylację histonów. Mogą lokalizować się w cytoplazmie i powodować deacetylację białek niehistonowych, wiele z nich wchodzi w skład dużych kompleksów białkowych. Niektóre z nich są transportowane pomiędzy jądrem a cytoplazmą, mechanizmy regulacji tych procesów nie są do końca znane, a mają kluczowe znaczenie dla ich funkcji. Obecnie jestem w trakcie przygotowywania projektu badawczego dotyczącego związku między wybranymi deacetylazami klasy II, a białkiem ATM. Ponadto, chciałabym kontynuować tematykę związaną z badaniem chłoniaków skórnych z komórek T w kontekście medycyny spersonalizowanej, w szczególności testowania na modelowych liniach komórkowych łączonych terapii celowanych z zastosowaniem swoistych inhibitorów deacetylaz histonowych klasy II. Równolegle będę aplikować do NCN o finansowanie powyższych badań w ramach konkursów OPUS i SONATA BIS.

Podsumowanie współpracy naukowej:

Współprace z zespołami badawczymi z następujących placówek:

Clinic for Internal Medicine C, University Greifswald, 17489 Greifswald, Niemcy
Christian A. Schmidt, Piotr Grabarczyk – współpraca w ramach projektu z konkursu 39 NCN, HARMONIA4, OPUS14

- W ramach współpracy zrealizowano 3 projekty badawcze i opublikowano 4 prace oryginalne: Iżykowska et al., J Invest Dermatol. 2013; Iżykowska et al., Eur J Haematol. 2014; Przybylski et al., Int J Mol Sci. 2022. Iżykowska et al., Oncotarget. 2017. Współpraca obejmowała wspólne badania oraz konsultacje naukowe, wsparcie merytoryczne, udział we wspólnych konferencjach i spotkaniach naukowych.

Katedra i Klinika Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569, Poznań, Polska

Monika Joks -współpraca w ramach projektu NCN OPUS14

- W ramach współpracy zrealizowano jeden grant i opublikowano dwie prace oryginalne: Iżykowska et al., J Cell Mol Med. 2020; Rassek et al., J Invest Dermatol. 2023. Współpraca polegała na otrzymywaniu z kliniki materiału do badań (krew, szpik kostny) i danych klinicznych pacjentów chorujących na nowotwory hematologiczne, przede wszystkim rzadkie chłoniaki T-komórkowe, oraz konsultacje przypadków klinicznych.

Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, Polska

Karolina Olek-Hrab – współpraca w ramach projektów NCN HARMONIA4, OPUS14, SONATA15

- W ramach współpracy zrealizowano dwa granty badawcze i opublikowano 3 prace oryginalne: Izykowska et al., *Oncotarget*. 2017; Izykowska et al., *J Cell Mol Med*. 2020; Rassek et al., *J Invest Dermatol*. 2023. Współpraca polegała na otrzymywaniu z kliniki materiału do badań (krew, biopsje skórne), wraz z opisem klinicznym, od pacjentów z chłoniakami skórnymi z komórek T, oraz konsultacje przypadków klinicznych.

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii; Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Mariana Smoluchowskiego 17, 80-214, Gdańsk, Polska

Berenika Olszewska, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Roman J. Nowicki

Katedra i Zakład Patomorfologii; Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Mariana Smoluchowskiego 17, 80-214, Gdańsk, Polska

Wojciech Biernat

-współpraca w ramach projektów NCN OPUS14, SONATA15

- W ramach współpracy zrealizowano jeden grant badawczy, a współpraca jest kontynuowana w ramach realizacji grantu NCN SONATA15. Opublikowano wspólnie jedną pracę oryginalną: Rassek et al., *J Invest Dermatol*. 2023. Współpraca polegała na dostarczeniu z kliniki materiału do badań (krew, biopsje skórne), wraz z opisem klinicznym, od pacjentów z zespołem Sézary'ego, ziarniniakiem grzybiastym oraz chorujących na erythrodermie nienowotworowe, oraz konsultacje przypadków klinicznych.

Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Institute of Hematology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Chiny

Yangqiu Li – współpraca w ramach pierwszego polsko-chiński konkursu bilateralnego NCBiR

- W ramach współpracy realizowano jeden projekt badawczy i opublikowano wspólnie jedną pracę oryginalną: Przybylski et al., *Int J Mol Sci*. 2022. Badania w projekcie po stronie chińskiej są w dalszym ciągu kontynuowane, po stronie polskiej przygotowana jest kolejna publikacja. Współpraca obejmowała również udział w konferencji: 1st Chinese-German Hematological Symposium "New aspect of molecular pathogenesis in lymphocytic malignancies".

Department of Dermatology, Leiden University Medical Center, Leiden, Holandia

Cornelis P Tensen – współpraca w ramach projektu NCN HARMONIA4

- W ramach współpracy dostarczono materiał do badań od pacjentów z zespołem Sézary'ego, oraz przeprowadzono część badań i analiz w ramach grantu HARMONIA4. Wyniki opublikowano w jednej pracy oryginalnej: Izykowska et al., Oncotarget. 2017.

Human Molecular Genetics, Institute for Human Genetics, University Medicine Greifswald, Greifswald, Niemcy

Andreas W Kuss - współpraca w ramach projektu HARMONIA4

- W ramach współpracy przeprowadzono analizę bioinformatyczną wysokoprzepustowych danych sekwencjonowanie następnego generacji co wykorzystano w dwóch publikacjach: Izykowska et al., J Invest Dermatol. 2013.; Izykowska et al., Eur J Haematol. 2014.

Department of Dermatology and Allergy, Skin Cancer Center, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Niemcy

Markus Möbs – współpraca w ramach realizacji projektu NCN (konkurs 39)

- W ramach współpracy dostarczono materiał do badań od pacjentów z zespołem Sézary'ego, wraz z opisem klinicznym. Materiał został wykorzystany do realizacji grantu pod kierownictwem profesora Przybylskiego i mojego doktoratu, a wyniki opublikowano w jednej pracy oryginalnej: Izykowska et al., J Invest Dermatol. 2013.

Department of Hematology, Oncology and Tumor Immunology, HELIOS Klinikum Berlin Buch, Berlin, Niemcy

Wolf-Dieter Ludwig - współpraca w ramach projektu PRELUDIUM1

- W ramach współpracy dostarczono materiał do badań od pacjentów z bardzo rzadką białaczką T-LGL, wraz z opisem klinicznym. Materiał został wykorzystany w realizacji mojego doktoratu i grantu PRELUDIUM1, a wyniki opublikowano w jednej pracy oryginalnej: Izykowska et al., Eur J Haematol. 2014.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne:

Obecnie pełnię funkcję promotora pomocniczego dwóch doktoratów oraz opiekuna pracy magisterskiej:

1. Mgr Karolina Rassek: data rozpoczęcia studiów doktoranckich: 02.11.2018; tematyka badawcza: Poznanie funkcji genu kodującego transbłonowe białko *TMEM244* i jego roli w rozwoju nowotworów limfoidalnych (2017/27/B/NZ5/01540); temat pracy: „Identification of mechanisms related to the expression of *TMEM244* gene and its role in cutaneous T-cell lymphoma”.
2. Mgr Monika Pieniawska: data rozpoczęcia kształcenia w PSD IPAN: 01.10.2020; tematyka badawcza: Znaczenie deacetylaz histonowych klasy II: HDAC9 i HDAC10 w Zespole Sézary’ego.
3. Bogumiła Skwara: data rozpoczęcia pracy magisterskiej: 09.2022; temat: „The role of overexpression of class II histone deacetylase HDAC10 in primary CD4+ T-cells”.

Zarówno doktorat pani Moniki Pieniawskiej, jak i praca magisterska pani Bogumiły Skwary są realizowane w ramach projektu NCN SONATA15 (2019/35/D/NZ5/00407), którego jestem kierownikiem.

Ponadto byłam opiekunem dwóch studentów podczas stażu:

1. Krzyżanowska Weronika: praktyka - 08.2019
2. Bogumiła Skwara: praktyka – 07.2021; wolontariat – 10.2021-02.2022

Wykłady naukowe na zaproszenie

- 7.07.2019 **Zakład Genetyki Molekularnej UAM**, "Function of the *TMEM244* gene in Sézary syndrome and other hematological malignancies." - wykład na zaproszenie prof. Joanny Wesoły
- 07.05.2014, Greifswald, Germany, **1st Chinese-German Hematological Symposium “New aspect of molecular pathogenesis in lymphocytic malignancies”** – "Genetic Alterations in Sézary Syndrome" – wykład na zaproszenie prof. Christiana A. Schmidta
- 25.06.2014, Poznań, **Obchody 40-lecia Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu**, "Sekwencjonowanie nowej generacji genomu i transkryptomu w poszukiwaniu uszkodzonych genów w zespole Sézary’ego” - wykład na zaproszenie prof. Jerzego Nowaka

Działalność organizacyjna:

W ramach mojej działalności w organizacji **Women for Science** zorganizowałam i prowadziłam serię spotkań pod tytułem „Inspiring Female Scientists” ze światowej sławy naukowczyniami, które otrzymały nagrodę FEBS | EMBO Women in Science: Elly Tanaka (28.04.22), Fiona Watt (12.05.22) oraz Dame Caroline Dean (13.06.22) (<http://womenforscience.pl/activities/>). W ramach naszych spotkań rozmawialiśmy o tym jak przebiegała ich kariera, jakie miały przed sobą wyzwania i jak je pokonały, oraz o tym co jest ważne w pracy naukowca i jak się motywować do działania.

Prowadzenie zajęć-wykładów o charakterze popularnonaukowym:

Od lat angażuję się w działalność **Stowarzyszenia Gen-i-już**, działającego przy Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Biorę aktywny udział w prowadzeniu warsztatów i wykładów o charakterze popularnonaukowym dla dzieci ze szkół podstawowych i ponadpodstawowych, które przyjeżdżają do instytutu w ramach cotygodniowych zajęć. W zależności od grupy wiekowej prowadzę zajęcia opisujące: podstawowe pojęcia genetyczne połączone z warsztatami badawczymi (doświadczenia kolorymetryczne, izolacja DNA), proces transformacji i profilaktykę nowotworową, oraz zagadnienia związane z technikami hodowli komórek in vitro.

Dodatkowo dwukrotnie, w okresie 05-06.2021 oraz 05-11.2022, brałam udział w realizacji grantu **Mobilna Akademia Nauki MAN**, w ramach którego prowadziłam warsztaty w różnych szkołach podstawowych na terenie miasta Poznania. W ramach realizacji programu pt. „Mobilna Akademia Nauki (MAN)– Nie taki wirus straszny – czyli co genetycy chowają w probówkach”, finansowanego z Wydziału Oświaty Miasta Poznania, odwiedziliśmy 14 szkół podstawowych w Poznaniu i przeprowadziliśmy zajęcia dla około 1200 uczniów. Zajęcia umożliwiły przybliżenie zagadnień związanych z budową DNA, RNA w odniesieniu do wirusa SARS-CoV-2 oraz poznanie mechanizmów powstawania i zasad działania testów diagnostycznych i szczepionek.

Ponadto reprezentowałam Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu oraz brałam udział w organizacji stanowisk, prowadzeniu warsztatów oraz przygotowywaniu i wygłaszaniu wykładów, w ramach następujących wydarzeń popularyzujących naukę:

- **Festyn Naukowy 30.03.2019 w Środzie WLKP.**
- **Festiwal Nauki ICHB Poznań 9.04.2019**
- **Noc Naukowców 2019**
- **Noc Naukowców 2020**
- **Poznański Festiwal Nauki i Sztuki 2022**
- **Noc Naukowców 2022**
- **Noc Biologów 2023**

Jestem również zaangażowana w realizację projektu pt. „Szczepionki, alergie i nowotwory. Jak genetycy pomagają białym krwinkom” (SONP/SP/550868/2022), finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki w ramach programu: Społeczna odpowiedzialność nauki – Popularyzacja nauki i promocja sportu (budżet projektu 131 340,00 PLN). Motywem przewodnim cyklu warsztatów będzie popularyzacja wiedzy dotyczącej funkcjonowania układu odpornościowego i mechanizmie działania szczepionek.

7. **Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

W trakcie trwania studiów magisterskich na Wydziale Biologii zdobyłam **stypendium Socrates-Erasmus**, w ramach którego spędziłam jeden semestr studiując na Uniwersytecie w Luton w Wielkiej Brytanii, w terminie 13.09.2003-31.01.2004 („Study Abroad Programme”). Studia magisterskie ukończyłam z nagrodą za wyróżniające wyniki w nauce (Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu). W trakcie trwania doktoratu zdobyłam nagrodę cytogenetyczną **„Bocian”**, przyznaną przez Polskie Towarzystwo Genetyczne za prezentację plakatową pt. „Charakterystyka cytogenetyczna i molekularna aberracji chromosomowych w białaczkę z dużych ziarnistych limfocytów T”, w trakcie trwania IV Polskiego Kongresu Genetyki (Poznań, 10-13.09.2013). W 2013 roku moja rozprawa doktorska została wyróżniona przez Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W 2014 Fundacja na rzecz Nauki Polskiej przyznała mi stypendium **START**, prestiżowe wyróżnienie dla wybitnych młodych naukowców. W 2019 zostałam laureatem Programu **PROM** (Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej z oferty Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej), w ramach którego wzięłam udział w kursie Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej EMBO „Systems approaches in cancer” (21 – 26.09.2021), odbywającego się w Chorwacji, w miejscowości Split, na terenie instytutu MEDILS (Mediterranean Institute for Life Sciences). Ponadto, w 2020 roku otrzymałam nagrodę Międzynarodowego Towarzystwa Chłoniaków Skórnych (International Society for Cutaneous Lymphoma): **ISCL Travel Scholarship Award**, która pozwoliła mi na udział w 4 Kongresie Chłoniaków Skórnych (12-14.02.2020) w Barcelonie, na którym to kongresie zaprezentowałam wyniki swoich badań w formie wystąpienia ustnego.

Odbyte kursy i szkolenia:

W trakcie mojej kariery naukowej starałam się podnosić moje kompetencje biorąc udział w różnego rodzaju kursach i szkoleniach. 25 października 2013 roku odbyłam szkolenie „Bioinformatyczne podstawy sekwencjonowania nowej generacji”, organizowane przez Ideas for Biology w Poznaniu. W dniach 24-25.02.2022, na terenie Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, wzięłam udział w szkoleniu realizowanym w ramach projektu pt. Rozwój internacjonalizacji Instytutu Genetyki Człowieka PAN poprzez wsparcie zdolności instytucjonalnej do obsługi zagranicznych doktorantów i naukowców (2INTEGRATE): „Zarządzanie zespołem międzynarodowym – trening międzykulturowy (14 godz.)”. Odbyłam również szkolenie w zakresie obowiązującym dla osób uczestniczących w procedurach przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych (3.03.2020-12.04.2021, Instytut genetyki Człowieka PAN w Poznaniu) oraz szereg szkoleń organizowanych przez Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (01-28.07.2020) w zakresie:

- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie

- Szkolenie dla osób wykonujących procedury
- Szkolenie dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach

Informacja o projektach

Byłam/jestem kierownikiem dwóch projektów grantowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN): **PRELUDIUM1 (2011/01/N/NZ2/02982)** oraz **SONATA15 (2019/35/D/NZ5/00407)**.

Grant **PRELUDIUM** został mi przyznany w trakcie trwania doktoratu, w 2011 roku, a tematem badań była „Charakterystyka cytogenetyczna i molekularna aberracji chromosomowych w białaczkach z dużych ziarnistych limfocytów T”. Grant był realizowany w okresie 06.12.2011-05.12.2013, a przyznana kwota wynosiła 91 000 PLN. W ramach grantu powstała jedna publikacja oraz trzy doniesienia zjazdowe, z czego jedno doniesienie plakatowe otrzymało wyróżnienie na IV Polskim Kongresie Genetyki, a grant uzyskał pozytywną ocenę w rozliczeniu merytorycznym.

Grant **SONATA** został mi przyznany w 2020 roku i jest w trakcie realizacji, a tematem projektu jest „Znaczenie deacetylaz histonowych klasy II: HDAC9 i HDAC10 w Zespole Sézary'ego”. Przyznana kwota to 1 161 600 PLN. W ramach grantu realizowana jest jedna praca doktorska i jedna praca magisterska. Jak dotąd powstały trzy prace, z czego dwie prace przeglądowe i jedna oryginalna, a uzyskane wyniki zaprezentowano w formie plakatu na dwóch konferencjach, krajowej i zagranicznej, oraz wykładu na Zjeździe sekcji Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego oraz „XIV Ogólnopolskiej Konferencji Postępów w Badaniach Biomedycznych”.

Ponadto byłam głównym wykonawcą w trzech projektach NCN, wykonawcą w jednym projekcie NCN i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, oraz współkierownikiem jednego projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR).

Doniesienia zjazdowe na konferencjach krajowych i zagranicznych

Wyniki swojej pracy badawczej prezentowałam na przestrzeni lat na wielu konferencjach krajowych i zagranicznych. Dwukrotnie uczestniczyłam w prestiżowym Światowym Kongresie Chłoniaków Skórnych (2nd WCCL, Berlin i 4th WCCL, Barcelona), gdzie zostałam wybrana do zaprezentowania swoich badań w formie wykładu. Wyniki prezentowałam również na Kongresach Europejskiego Towarzystwa Hematologicznego (EHA) oraz Polskich Kongresach Genetyki. W ramach IV Polskiego Kongresu Genetyki w Poznaniu zaprezentowałam wyniki swoich badań zarówno w formie wykładu jak i plakatu. Osobiście uczestniczyłam również w konferencjach międzynarodowych “From Omics to novel Therapies in Cancer” w Berlinie oraz Keystone Symposia: Cancer Epigenetics w Stanach Zjednoczonych. Łącznie jestem autorką 26 doniesień zjazdowych, z czego w 9 byłam autorem pierwszym i prezentującym, a w czterech senioralnym.

Członkostwo w organizacjach naukowych

Jestem członkinią **Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego** od grudnia 2021. W ramach działalności towarzystwa uczestniczę w spotkaniach na których prezentowane są wykłady z różnych dziedzin dermatologii, a także rozwijam nowe współprace z dermatologami. Obecnie rozwijaną współpracą jest współpraca z prof. dr hab. n. med. Aleksandrą Dańczak – Pazdrowską, przewodniczącą Poznańskiego Oddziału PT Derm, oraz dr hab. n. med. Adrianą Polańską, pełniącą funkcję sekretarza, w ramach której chcemy kontynuować badania nad chłoniakami skórnymi.

Ponadto, w styczniu 2022 przyłączyłam się do organizacji **Women in Science at Nencki**, obecnie przekształconą na **Women for Science** (womenforscience.pl). Zostałam wybrana na współprzewodniczącą do spraw rozwoju zawodowego oraz członkinię rady, którą to rolę sprawuję nadal. Celem organizacji jest promowanie interesów naukowczyń oraz walka o równość płci w środowisku akademickim. W ramach mojej działalności w WfS organizowałam i prowadziłam wspomniane już wyżej trzy spotkania pod tytułem „Inspiring Female Scientists”, ale także uczestniczyłam w wydarzeniach organizowanych przez inne członkinie WfS, takich jak spotkanie z prof. Aleksandrą Cisłak-Wójcik (Uniwersytet SWPS) i dr Ewą Krzaklewską (Uniwersytet Jagielloński) pt. „Science of gender equality in Academia” (21.09.2022) oraz spotkanie pt. „Not yet another mainly men meeting”, gdzie gośćmi w dyskusji byli prof. Jerzy Duszyński (Prezes PAN), dr Fredrick Bondestam (University of Gothenburg), oraz MSc. Stephen Blum (Yale Alumni Association). Reprezentowałam również organizację WfS na dwóch konferencjach dotyczących równości płci w nauce: „Breaking Barriers for Gender Equity Through Research”, organizowaną w formie online przez Nature Conferences w dniach 9-10 Marzec 2022, oraz konferencję „Doskonałość naukowa nie ma płci” organizowaną przez Akademię Młodych Uczonych PAN we współpracy z Narodowym Centrum Nauki, Centrum Badań nad Partycypacją Kobiet w Przestrzeni Publicznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Biurem Promocji Nauki “PolSCA” Polskiej Akademii Nauk w Brukseli, która odbyła się 10 lutego 2023 na Wydziale Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM w Poznaniu.

Aktywność recenzencka:

Byłam recenzentem 9 manuskryptów w czasopismach międzynarodowych:

- **Life** – 2 manuskrypty 2020
- **International Journal of Molecular Sciences** – 2 manuskrypty 2020, 2021
- **Cancers** – 1 manuskrypt 2021
- **Journal of Personalized Medicine** – 2 manuskrypty 2021
- **Pharmaceuticals** – 1 manuskrypt 2021
- **Biomedicines** – 1 manuskrypt 2022

Uczestnictwo w programach Europejskich

Biorę aktywny udział w wydarzeniach w ramach projektu **NEXT_LEVEL - On the road to excellence in unravelling the (epi)genetic landscape of hematologic neoplasms**. Projekt ten jest finansowany z Programu ramowego Unii Europejskiej na rzecz badań i innowacji – Horyzont 2020 w ramach umowy grantowej nr 952304, i realizowany przez międzynarodowe konsorcjum w składzie: Instytut Genetyki Człowieka PAN, Uniwersytet w Gandawie, Uniwersyteckie Centrum Medyczne Groningen i Uniwersytet w Ulm. W ramach projektu brałam udział w szkoleniu „Experiments with the use of laboratory animals – is it so difficult? Practical, ethical, and legal aspects of working with laboratory animals” (20.04.2021, Instytut Genetyki Człowieka PAN). Ponadto, byłam zaangażowana w organizację pierwszego Dnia Hematologii (28.10.2021, Instytut Genetyki Człowieka PAN) dotyczącego ostrej białaczki limfoblastycznej. W trakcie trwania tygodnia wymiany pracowników (Staff Exchange Week 28.03-1.04.2022) wygłosiłam wykład pod tytułem „The role of epigenetic modifiers, HDAC9 and HDAC10, in cutaneous T-cell lymphoma” (29.03.22 Instytut Genetyki Człowieka PAN). Ponadto wzięłam udział w rekrutacji i zostało mi przyznane stypendium na wyjazd studyjny do uczelni partnerskiej, w ramach którego spędziłam tydzień (18-24.09.2022) na uniwersytecie w Gadnawie w laboratorium profesora Pietera van Vlierberghena (Department of Biomolecular Medicine). W ramach wizyty studyjnej miałam okazję zapoznać się z technikami badań nad epigenetyką nowotworów, takich jak ATAC-seq, wzięłam udział w licznych spotkaniach naukowych, między innymi w obronie doktoratu dotyczącego zastosowania asparaginazy w leczeniu białaczki oraz cotygodniowym spotkaniu całego zespołu. Ponadto, miałam okazję zapoznać się i przedyskutować projekty naukowe z członkami zespołu, jak również podzielić się doświadczeniem z naszych badań w Instytucie Genetyki Człowieka PAN.

Przerwy w pracy naukowej:

Urlop macierzyński - 25.12.2008 - 29.07.2009 r. (31 tygodni)

Podsumowanie dorobku naukowego:

- Jestem autorką 17 prac naukowych, z czego pierwszym autorem jestem w 7, a autorem korespondencyjnym w 3.

Dane bibliometryczne (na dzień 19.04.23):

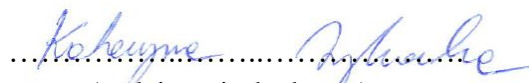
Sumaryczny Impact Factor (według IF czasopisma w roku ukazania się publikacji): 92,651

Sumaryczna liczba punktów ministerialnych (MEiN): 1485

Indeks Hirscha (wg Web of Science): 6

Liczba cytowań (wg Web of Science): 150 (136 bez autocytowań)

- Studiowałam zarówno w Polsce, jak i za granicą (Wielka Brytania, Australia) i realizowałam projekt naukowy w Woolcock Institute of Medical Research w Sydney w Australii.
- Byłam stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (START 2014), laureatem programu PROM, NEXT_LEVEL oraz nagrody Międzynarodowego Towarzystwa Chłoniaków Skórnych (ISCL).
- Byłam zaangażowana w realizację 8 projektów grantowych, z czego w dwóch byłam/jestem kierownikiem, w jednym pełniłam funkcję współkierownika, w 3 byłam głównym wykonawcą, a w 2 byłam wykonawcą.
- Współpracowałam z 6 partnerami z zagranicy oraz 4 ośrodkami w Polsce.
- Jestem autorką 26 doniesień zjazdowych, w tym 7 doniesień ustnych, z czego 3 były prezentowane przez mnie, a w 4 byłam współautorem, oraz 19 doniesień plakatowych.
- Wygłosiłam 3 wykłady na zaproszenie.
- Jestem promotorem pomocniczym dwóch doktoratów i opiekunem jednej pracy magisterskiej oraz sprawowałam opiekę nad dwoma stażystami.
- Prowadzę działalność popularyzującą naukę.
- Jestem zaangażowana w działalność organizacji Women for Science oraz członkinią Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego.
- Byłam recenzentem 9 manuskryptów w czasopiśmie międzynarodowych.


(podpis wnioskodawcy)