

# AUTOREFERAT

**dr inż. Edyta Pawlak-Adamska**

*Laboratorium Immunopatologii*

*Zakład Terapii Doświadczalnej*

*Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda*

*Polskiej Akademii Nauk*

*Wrocław*



Wrocław 2017

1. Imię i Nazwisko.

**Edyta Pawlak-Adamska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne

mgr inż. – 08.07.2002r., Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, w zakresie biotechnologia molekularna i biokataliza

dr – 14.06.2011r., Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, tytuł rozprawy doktorskiej: „*Polimorfizm genów CTLA-4 i CD28 oraz stężenie rozpuszczalnej postaci białka CTLA-4 (sCTLA-4) w surowicy krwi w chorobie Gravesa-Basedowa.*”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

01.09.2003 – 31.08.2004 – Laboratorium Immunopatologii, Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, specjalista biotechnolog

18.02.2005 – 01.01.2008 – Laboratorium Immunopatologii, Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, specjalista biotechnolog

02.01.2008 – 30.09.2011 – Laboratorium Immunopatologii, Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, asystent

od 01.10.2010 – Laboratorium Immunopatologii, Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a). Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl 5 publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 2, objęty tytułem:

**„Czynniki immunogenetyczne w podatności na rozwój i przebieg orbitopatii tarczycowej oraz stwardnienia rozsianego”**

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 prac poświęconych badaniom dotyczącym oceny wartości klinicznej czynników immunogenetycznych zaangażowanych w etiopatogenezę orbitopatii tarczycowej oraz stwardnienia rozsianego.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Pawlak-Adamska E.**, Frydecka I., Bolanowski M., Tomkiewicz A., Jonkisz A., Karabon L., Partyka A., Nowak O., Szalinski M., Daroszewski J. *CD28/CTLA-4/ICOS haplotypes confers susceptibility to Graves' disease and modulates clinical phenotype of disease. Endocrine* 2017, 55:186–199. DOI: 10.1007/s12020-016-1096-1

**IF: 3,279**

**MNiSW/KBN: 25,000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w zaplanowaniu i opracowaniu tematu badania, wykonaniu znaczącej części badań molekularnych: oznaczenie polimorfizmów zlokalizowanych w genie *CTLA-4*: g.319C>T (rs5742909), c.49A>G (rs231775), g.\*642AT(8\_33), CT60 (rs3087243, g.\*6230G>A), Jo31 (rs11571302, g.\*10223G>T), w genie *CD28*: c.17+3T>C (rs3116496, IVS3+17C/T) oraz genie *ICOS*: c.1554+4GT(8\_15) w grupie pacjentów z różnym stopniem zaawansowania klinicznego orbitopatii tarczycowej oraz osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną których wyniki zamieszczone zostały w Tabelach 2-5 oraz Tabelach 2-14 w materiałach dodatkowych (Supplementary Table 2-14), interpretacji i analizie otrzymanych wyników badań, opracowaniu statystycznym otrzymanych wyników badań zamieszczonych w Tabelach 2-5 oraz Tabelach 2-14 w materiałach dodatkowych (Supplementary Table 2-14) oraz charakterystyki pacjentów z różnym stopniem zaawansowania klinicznego orbitopatii tarczycowej zamieszczonych w Tabeli 1 w materiałach dodatkowych (Supplementary Table 1), napisaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Ponadto jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 65 %.

2. **Pawlak-Adamska E.**, Daroszewski J., Bolanowski M., Oficjalska J., Janusz P., Szalinski M., Frydecka I. *PPARG2 Ala<sup>12</sup> variant protects against Graves' orbitopathy and modulates the course of the disease. Immunogenetics.* 2013 Jul;65(7):493-500. Epub 2013 Apr 21. doi: 10.1007/s00251-013-0702-0.

**IF: 2,488**

**MNiSW/KBN: 25,000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w zaplanowaniu i opracowaniu tematu badania, wykonaniu badań molekularnych: oznaczenie polimorfizmu *PPARG2Pro<sup>12</sup>Ala* (c.34C>G, rs1805192) w grupie pacjentów z różnym stopniem zaawansowania klinicznego orbitopatii tarczycowej oraz w grupie osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną, interpretacji i analizie otrzymanych wyników badań zamieszczonych w Tabeli 2; opracowaniu statystycznym otrzymanych

wyników badań zamieszczonych w Tabeli 2 oraz charakterystyki pacjentów z różnym stopniem zaawansowania klinicznego orbitopatii tarczycowej w kontekście badanego miejsca polimorficznego zamieszczonych w Tabeli 3; interpretacji i analizie otrzymanych wyników badań, analizie statystycznej współzależności polimorfizmu *PPAR $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala* z czynnikami poza genetycznymi której wyniki zamieszczono w Tabeli 4; napisaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Ponadto jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 65 %.

3. Kuś A., Szymański K., Jurecka-Lubieniecka B., **Pawlak-Adamska E.**, Kula D., Miśkiewicz P., Bolanowski M., Płoski R., Bossowski A., Daroszewski J., Jarzab B., Bednarczuk T. Gender-dependent and age-of-onset-specific association of the rs11675434 single nucleotide polymorphism near *TPO* with susceptibility to Graves' ophthalmopathy. *Journal of Human Genetics* 2017 Mar;62(3):373-377. doi: 10.1038/jhg.2016.135.

**IF: 2,487**

**MNiSW/KBN: 20,000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu tematu badania, opracowaniu materiału badawczego w grupie pacjentów leczonych w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, współudziale w przygotowaniu i korekcie manuskryptu, oraz współudział w formułowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 15 %.

4. **Pawlak-Adamska E.**, Nowak O., Karabon L., Pokryszko-Dragan A., Partyka A., Tomkiewicz A., Ptaszkowski J., Frydecka I., Podemski R., Dybko J., Bilińska M. *PD-1* gene polymorphic variation is linked with first symptom of disease and severity of relapsing-remitting form of MS. *Journal of Neuroimmunology* 2017 Apr 15;305:115-127.  
doi:10.1016/j.jneuroim.2017.02.006. Epub 2017 Feb 9.

**IF2015: 2,536**

**MNiSW/KBN: 25,000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i opracowaniu tematu badania, wykonaniu znaczącej części badań molekularnych: wykonanie znaczącej części genotypowań wybranych polimorfizmów zlokalizowanych w genie *PDCDI*: PD-1.3 (rs11568821, c.627+189G>A, +7146G>A) zlokalizowanego w intronie 4; PD-1.5 (rs2227981, c.804T>C,+7785C>T) oraz PD-1.9 (rs2227982, c.644C>T, +7625C>T) zlokalizowanych eksonie 5 genu w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym; interpretacji i analizie otrzymanych wyników badań oraz analizie statystycznej wyników w kontekście danych klinicznych - przedstawione w Tabelach 2-4 oraz w materiałach dodatkowych (Supplementary Table 1-4); nadzorze merytorycznym nad metodyką i interpretacją wyników oraz napisaniu i opracowaniu manuskryptu oraz formułowaniu odpowiedzi na recenzje. Ponadto jestem autorem korespondencyjnym. Mój udział procentowy szacuję na 65 %.

5. Janusz P., **Pawlak-Adamska E.**, Kochanowska I.E., Daroszewski J. Udział tkanki tłuszczowej w patogenezie i obrazie klinicznym orbitopatii tarczycowej. (The role of adipose tissue in the pathogenesis and clinical manifestation of Graves' orbitopathy.) *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 2013; 67:1173-1181.

**IF: 0,633**

**MNiSW/KBN: 15,000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie dostępnej literatury dotyczącej omawianych zagadnień, udziale w przygotowaniu manuskryptu oraz współudziale w formułowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 30 %.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowiąca jednotematyczny cykl pięciu prac [sumaryczny IF:**11,423**, MNiSW/KBN:**110,000**] obejmujący 4 prace oryginalne [sumaryczny IF:**10,79**, MNiSW/KBN:**95,000**] oraz 1 pracę poglądową [IF:**0,633**, MNiSW/KBN:**15,000**] dotyczy oceny wartości klinicznej wybranych czynników molekularnych – czynników immunogenetycznych jako potencjalnych czynników ryzyka oraz jako czynników rokowniczych w chorobach autoimmunologicznych: orbitopatii tarczycowej (OT) oraz stwardnieniu rozsianym (ang. *multiple sclerosis*, SM). Udział wybranych czynników molekularnych w kształtowaniu fenotypu OT jak i MS analizowany był również w kontekście potencjalnych interakcji z pozagenetycznymi uznanymi czynnikami związanymi z ryzykiem tych chorób.

Kluczową rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych odgrywa prawidłowo działający system immunologiczny z zachowaną homeostazą sygnałów ko-stymulujących i ko-supresorowych, i zaangażowanie tych cząsteczek zostało omówione w kontekście ryzyka i przebiegu klinicznego OT i SM. Co istotne, badanie dotyczące znaczenia szlaku PD-1 w etiopatogenezie SM jest kontynuacją wcześniejszych badań analizujących zaangażowanie szlaku CD28/CTLA-4-CD80/CD86 w patomechanizm SM.

Jednakże, podobnie jak inne choroby, również etiopatogeneza chorób autoimmunologicznych stanowi skomplikowaną sieć interakcji nie w pełni opisanych czynników genetycznych, molekularnych, środowiskowych jak i endogennych, wśród których zarówno czynniki genetyczne jak i molekularne zaangażowane w regulację układu immunologicznego odgrywają istotną rolę. Tak więc w patomechanizm obu chorób poza cząsteczkami ko-stymulującymi zaangażowane mogą być również inne cząsteczki, i taka kompleksowa analiza została przedstawiona w przypadku orbitopatii tarczycowej.

W badaniach wybraliśmy strategię opartą na badaniu genu „kandydata” (ang. *candidate gene*) - polegającej na wybraniu genu/genów, teoretycznie związanych z etiologią choroby, zakładając że potencjalną przyszłą implikacją naszych badań będzie ich wykorzystanie w medycynie translacyjnej jak i spersonalizowanej. Podstawą medycyny spersonalizowanej jest określenie swoistych dla danej osoby informacji klinicznych, genetycznych, genomowych i środowiskowych, stanowiącym indywidualny i swoisty dla danej osoby „repertuar” zarówno czynników związanych z ryzykiem jak i przebiegiem klinicznym danej choroby, i w rezultacie odpowiednio dobraną do indywidualnego pacjenta terapię celowaną, co pozwala uzyskać optymalne wyniki poprzez prewencję lub interwencję we wczesnym stadium choroby oraz zastosowanie terapii najlepiej odpowiadającej profilowi genetycznemu danej osoby. Natomiast kontinuum określenia procesu przenoszenia odkryć na poziomie molekularnym z laboratorium do praktyki klinicznej łączącym w sobie odkrycia w dziedzinie nauk podstawowych, zdrowia publicznego i nauk klinicznych w celu zoptymalizowania

opieki nad pacjentem oraz działań prewencyjnych, które mogą sięgać daleko poza zwykłe świadczenie usług zdrowotnych są podstawowymi założeniami medycyny translacyjnej.

Przed opublikowaniem wyników badań własnych, koncepcja badań oraz wstępne wyniki zostały przedstawione w trakcie krajowych konferencji naukowych:

1. **Pawlak E.**, Daroszewski J., Karabon L., Frydecka I., Slowik M., Jedynek A., Jonkisz A., Lebioda A., Dobosz T., Bolanowski M. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (*CTLA-4*) gene polymorphisms and susceptibility to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy in a Lower Silesia region. *Immunology, Book of Abstracts 2008*, 33(Suppl.I):53, 4.115.  
*XIII Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Kraków, Poland, 14-17.05.2008*
2. Daroszewski J., **Pawlak E.**, Bolanowski M., Frydecka I. Udział polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR-γ* w orbitopatii endokrynej.  
*IV Konferencja „Rak tarczycy”, Zakopane, Polska 20-22.5.2010*

oraz zagranicznych konferencji naukowych:

1. **Pawlak E.**, Suwalska K., Karabon L., Daroszewski J., Jonkisz A., Tutak A., Slowik M., et al. Polymorphism of genes encoding regulator of T cell activation: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (*CTLA-4*) and *CD28* in Graves' disease in a Polish population of Lower Silesia region. *Tissue Antigens 2006*, 67, 539, P-207.  
*20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference: From gene structure to gene function: HLA – and much more., Oslo, Norway, 8-11.06.2006*
2. Frydecka I., **Pawlak E.**, Daroszewski J., Karabon L., Slowik M., Jonkisz A., Lebioda A., Dobosz T., Bolanowski M. *CTLA-4/CT-60* and *CTLA-4/JO-31* polymorphisms in Graves' disease in Polish population of Lower Silesia region.  
*31st Annual Meeting of the European Thyroid Association, Naples, Italy, 02-06.09.2006*
3. **Pawlak E.**, Daroszewski J., Karabon L., Frydecka I., Slowik M., Jonkisz A., Lebioda A., Dobosz T., Bolanowski M. *CTLA-4* gene polymorphisms and natural soluble *CTLA-4* protein in Graves' Disease (GD) in Polish population. *Tissue Antigens*, 2007, 69(5):456, P-141.  
*21th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Barcelona, Spain, 5-8.05.2007*
4. **Pawlak E.A.**, Karabon L., Bilinska M., Kosmaczewska A., Cizak L., Jedynek A., Tomkiewicz A., Pokryszko-Dragan A., Koszewicz M., Frydecka I. The association of *CTLA-4* gene polymorphisms with susceptibility to MS. *Tissue Antigens 2009*, 73:482, P178.  
*23rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI) / 17th Annual Meeting of the German Society for Immunogenetics (DGI), Ulm, Niemcy 09–12.05.2009*
5. Daroszewski J., **Pawlak E.**, Bolanowski M., Frydecka I. Association of Pro12Ala *PPAR-γ* gene polymorphism with Graves' orbitopathy. *Endocrine Abstracts (2010) 22:P813*.  
*European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic, 24-28.04.2010*
6. **Pawlak E.A.**, Daroszewski J., Bolanowski M., Frydecka I. Association of the 12ALA variant of the *PPAR-gamma2* gene with protection from Graves' orbitopathy in the population of Lower Silesia. Abstract 333; *Tissue antigens – Immune response genetics*, vol. 75, No 5, 2010, 627.  
*24th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Florence, Italy, 15-18.05.2010*
7. Daroszewski J., **Pawlak E.**, Bolanowski M., Frydecka I. Ochronna rola polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR-γ* w orbitopatii tarczycowej.

*Międzynarodowe Forum Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Metabolicznych, Karków, Polska, 25-27.11.2010*

8. Daroszewski J., **Pawlak E.**, Bolanowski M., Frydecka I. Pro12Ala *PPAR-γ* gene polymorphism is associated with Graves' orbitopathy. P-0405.  
*14th International Thyroid Congress, Paris, France, 11-16.09.2010*
9. Daroszewski J., **Pawlak-Adamska E.**, Bolanowski M., Frydecka I. Polymorphism of the *PPAR-γ2* gene and Graves' orbitopathy: the Ala variant confers decreased risk of eye symptoms. *Endocrine Abstracts 2012, 29:P1590.*  
*CE/ECE 2012 European Society of Endocrinology, Florence, Italy 05-09.05.2012*
10. **Pawlak-Adamska E.**, Daroszewski J., Frydecka I., Karabon L., Jonkisz A., Tomkiewicz A., Partyka A., Lebioda A., Bolanowski M. The contribution of polymorphisms within genes encoding co-stimulatory molecules to the susceptibility to Graves' disease and orbitopathy. P95.  
*European Thyroid Association, 37th Annual Meeting in Leiden, The Netherlands 7-11.09.2013*
11. Janusz P., **Pawlak-Adamska E.**, Bolanowski M., Daroszewski J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  polymorphisms in Graves' disease and orbitopathy. *Endocr. Abstr. 2014 Vol.35; poz.P1028.*  
*16th European Congress of Endocrinology. Wrocław, Poland, 03-07.05.2014*
12. Daroszewski J., **Pawlak-Adamska E.**, Janusz P., Frydecka I., Karabon L., Jonkisz A., Tomkiewicz A., Partyka A., Lebioda A., Bolanowski M. Polymorphisms within genes encoding co-stimulatory molecules modulate the susceptibility to Graves' disease and orbitopathy. *Endocr. Abstr. 2014 Vol.35; P986.*  
*16th European Congress of Endocrinology. Wrocław, Poland, 03-07.05.2014*

#### 1. Znaczenie wybranych czynników molekularnych w etiopatogenezie orbitopatii tarczycowej

##### **Wstęp**

W przebiegu orbitopatii tarczycowej, autoimmunologicznej zapalnej choroby tkanki łącznej oczodołu o samoograniczającym się przebiegu, obserwuje się infiltrację tkanki łącznej, tłuszczowej oraz mięśni zewnątrzgałkowych przez komórki immunokompetentne (limfocyty T, B, makrofagi) oraz śródtkankowe nagromadzenie glikozaminoglikanów (ang. *glycosaminoglycans*, GAG) – głównie kwasu hialuronowego. Dostępne dane literaturowe wskazują znaczącą rolę zaburzeń limfocytów Th1/Th2, cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz cząsteczek adhezyjnych kontrolujących czynność śródbłonna naczyń w patomechanizmie orbitopatii tarczycowej stanowiącej odrębny fenotyp choroby Gravesa i Basedowa.

Skutkiem zmian naciekowo-obrzękowych (zapalnych) obecnych w okołogałkowej tkance łącznej/tłuszczowej oraz w mięśniach okoruchowych są wytrzeszcz gałek ocznych, obrzęk tkanek oczodołu, retrakcja powiek, ból, dysfunkcja i zwłóknienie mięśni zewnątrzgałkowych oraz neuropatia nerwu wzrokowego, będące objawami klinicznymi OT.

Pomimo licznych badań patomechanizm OT nadal pozostaje nie w pełni poznany. Szereg dowodów wskazuje, iż antygenem przeciwko któremu skierowana jest odpowiedź komórkowa może być wspólny dla komórek nabłonka pęcherzykowego tarczycy i fibroblastów oczodołu receptor

tyreotropiny (ang. *thyroid stimulating hormone receptor*, TSHR). Równocześnie antygen tkanki łącznej - receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (ang. *insulin-like growth factor-1 receptor*, IGF1-R), wskazywany jest także jako istotny czynnik zaangażowany w patomechanizm OT. Potwierdzeniem krytycznej roli obu antygenów są obserwacje wskazujące, iż pobudzenie TSHR na fibrocytach i fibroblastach, przy współdziałaniu IGF1-R indukuje uwolnienie cytokin prozapalnych i tym samym inicjuje proces zapalny. Zaangażowanie i znaczenie obu antygenów szczegółowo przedyskutowane zostało w pracy poglądowej 6, wchodzącej w skład cyklu publikacji przewodu habilitacyjnego.

Aktywowane limfocyty typu Th1 uczestniczące w reakcji komórkowej wydzielając cytokiny prozapalne: czynnik martwicy nowotworu (TNF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, nasilają proliferację fibroblastów i wytwarzanie przez nie hydrofilnych glikozaminoglikanów (GAG), których akumulacja w macierzy pozakomórkowej tkanek oczodołowych powoduje zmianę ich struktury, a silna hydrofilność tych związków prowadzi do zwiększenia objętości tkanek oczodołu. Wzrost wydzielania cytokin prozapalnych prowadzi do obrzęku mięśni okoruchowych i upośledzenia ich funkcji. Zwiększone ciśnienie w ograniczonej kostnymi ścianami oczodołu przestrzeni pozagałkowej jest odpowiedzialne za większość objawów klinicznych OT: wypchnięcie gałki ocznej poza kostne brzożki oczodołu, obrzęk tkanek miękkich, a nawet uszkodzenie nerwu wzrokowego na skutek jego ucisku i zaburzeń ukrwienia.

W aktywnej fazie choroby w przestrzeni oczodołowej stwierdzono obecność TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 oraz czynników wzrostu (IGF-1, TGF- $\beta$ , PDGF), zwiększony udział makrofagów (CD14+ i RFD7+). Dodatkowo, 27% subpopulacji lokalnie występujących limfocytów CD45+ cechuje ekspresja receptora  $\gamma\delta$  TCR (TCR- $\gamma\delta$  +/CD4+).

Skutkiem konwersji odpowiedzi komórkowej w humoralną jest sekrecja cytokin Th2: IL-4, IL-10, IL-13 wywołująca stłuszczenie fibroblastów tkanki oczodołowej, co z kolei utrwała jej zwiększoną objętość, związany z tym wzrost ciśnienia pozagałkowego oraz włóknienie mięśni głokoruchowych trwale upośledzając ich funkcję. Czynniki odpowiedzialne za konwersję reakcji immunologicznej nie są w pełni znane.

Dzięki badaniom prowadzonym w ostatnich latach zgromadzono wiele informacji na temat złożonej etiopatogenezy OT, jednakże wiele pytań dotyczących patomechanizmu tej choroby jak i możliwości jej przyczynowego leczenia w dalszym ciągu pozostaje otwartych.

Kontrowersyjny nadal pozostaje wpływ czynników genetycznych na rozwój OT, jednak poza częstszym występowaniem genów zwiększających ryzyko ujawnienia się choroby Gravesa i Basedowa (ang. *Graves' disease*, ChGB) dotychczas nie stwierdzono układu genów typowego dla wystąpienia OT. W literaturze znaleźć można szereg doniesień opisujących wyniki badań asocjacji pomiędzy polimorfizmami wielu genów, jednakże do tej pory nie udało się wytypować jednoznacznego markera choroby, a wyniki tych badań są niejednoznaczne.



Ponieważ rozwój i przebieg OT uwarunkowany jest wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, a w podłożu genetycznym wyróżnić należy czynniki warunkujące predyspozycję do choroby oraz czynniki modyfikujące jej przebieg kliniczny (postać o najcięższym przebiegu wymagającą leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT)), określenie tych czynników może przynieść istotny postęp w diagnostyce i profilaktyce choroby.

W poszukiwaniu czynników genetycznych zaangażowanych w patomechanizm OT zastosowano metodę analizy asocjacji z genami "kandydującymi", które mogą potencjalnie brać udział w patogenezie tej choroby.

#### **Cel:**

Dlatego też, w cyklu prac będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego ocenie poddano wartość kliniczną wybranych polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w następujących genach:

- bezpośrednio zaangażowanych w regulację aktywacji limfocytów T:

*CTLA-4*: g.319C>T (rs5742909), c.49A>G (rs231775), *CT60* (g.\*6230G>A, rs3087243),  
Jo31 (g.\*10223G>T, rs11571302), g.\*642AT(8\_33)

*CD28*: c.17+3T>C (rs3116496)

*ICOS*: c.1554+4GT(8\_15)

- proces adipogenezy, immunoregulacji i kontroli reakcji zapalnej - polimorfizm *PPAR $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala* (c.34C>G, rs1805192),
- proces biosyntezy hormonów tarczycy - polimorfizm rs11675434 (g.1404043) zlokalizowany w pobliżu genu kodującego peroksydazę tarczycową (*TPO*, NC\_000002.12)

jako potencjalnych markerów molekularnych orbitopatii tarczycowej (OT) oraz jako czynników prognostycznych.

Udział wybranych parametrów molekularnych w kształtowaniu fenotypu OT analizowany był również w kontekście potencjalnych interakcji z pozagenetycznymi uznanymi czynnikami związanymi z ryzykiem tej choroby: picią, nikotynizmem oraz rodzinnym występowaniem chorób tarczycy.

#### **Wyniki**

##### **1. Związek polimorfizmów genów kodujących cząsteczki regulujące aktywację limfocytów T oraz czynników pozagenetycznych z ryzykiem i przebiegiem klinicznym orbitopatii tarczycowej**

Obserwowane w przebiegu choroby upośledzenie nadzoru immunologicznego zarówno w zakresie odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej oraz oczywiste zaangażowanie limfocytów T i komórek prezentujących antygen (APC) w efektywną odpowiedź immunologiczną przeciwko wspólnemu dla komórek nabłonka pęcherzykowego tarczycy i fibroblastów oczodołu antygenowi – TSHR, wskazuje molekuly zaangażowane w proces aktywacji limfocytów T jako potencjalne, krytyczne dla wystąpienia choroby i kształtowania jej fenotypu markery molekularne.

Zgodnie z koncepcją „dwusygnałowej” aktywacji limfocytów optymalna aktywacja antygenowo-swoistych limfocytów T wymaga sygnału indukowanego interakcją kompleksu antygen–MHC z receptorem limfocytów T oraz synergistycznego, kluczowego w aktywacji limfocytów T, supresji tolerancji immunologicznej oraz efektywnej odpowiedzi immunologicznej, sygnału ko-stymulującego indukowanego przez interakcję receptorów obecnych na limfocytach T oraz ich ligandów obecnych na powierzchni komórek APC. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych szlaków ko-stymulacji limfocytów T jest szlak CD80/CD86–CD28/CTLA-4.

Aktywacja antygenem CD28 indukuje sekrecję cytokin prozapalnych (IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), GM-CSF, jak również ekspresję receptorów IL-2  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz ligandu CD40, co wpływa na przejście komórek z fazy G0 do G1 cyklu komórkowego, oraz stymuluje proliferację komórek. Ponadto zwiększa ekspresję czynnika hamującego apoptozę Bcl-xL. W warunkach prawidłowych ekspresja molekuly CD28 wraca do poziomu wyjściowego po 72 godzinach. W przebiegu aktywacji limfocytów T pojawia się na ich powierzchni antygen supresorowy CTLA-4 (ang. *cytotoxic T lymphocytes associated antigen-4*), którego ligandami są wspólne dla antygenu CD28 cząsteczki CD80/CD86 ulegające ekspresji na powierzchni komórek APC. Klonalna ekspansja limfocytów T zwiększająca liczbę reaktywnych limfocytów T oraz ukierunkowanie różnicowania się komórek efektorowych (typu Th1 lub Th2) ligandem CD80 indukuje powstanie odpowiedzi immunologicznej typu Th1, natomiast z CD86 – odpowiedzi typu Th2. Poziom transkrypcji genu *CTLA-4* oraz akumulację powstałych transkryptów reguluje synergistycznie TCR i CD28.

Sygnał ko-stymulujący mediowany jest również poprzez molekulę ICOS (ang. *Inducible co-stimulator*), którego ekspresja indukowana jest w wyniku aktywacji na powierzchni limfocytów CD4+ w subpopulacjach limfocytów Th0, Th1, Th2, Th17 i Treg. Stymulacja limfocyty Th przez ICOS faworyzuje odpowiedź typu Th2, oraz moduluje także aktywność limfocytów Th1. ICOS zwiększa wydzielanie IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  oraz molekuly CD154, ale nie ma wpływu na wydzielanie IL-2 przez aktywowane limfocyty.

Dostępne dane literaturowe wskazują na zaburzoną ekspresję molekuł ko-stymulujących CTLA-4 i CD28 w ChGB. Jest to szczególnie istotne w warunkach suboptymalnej stymulacji, często obserwowanej w reakcjach autoimmunologicznych. CTLA-4 hamując sygnały dostarczane przez receptory TCR i CD28 może indukować tolerancję obwodową, tak więc obniżona ekspresja CTLA-4 może zatem prowadzić do mniej efektywnej supresji proliferacji aktywowanych limfocytów T oraz zaburzeń procesu apoptozy tych komórek. Natomiast wyższa ekspresja receptora CD28 indukować może nasiloną reakcję limfocytów T w odpowiedzi na kontakt z antygenem indukując procesy autoimmunologiczne. Zaburzenia ekspresji i funkcji białek sygnałowych odgrywają kluczową rolę w dysregulacji układu odpornościowego, a jako jedną z przyczyn tych zaburzeń podaje się polimorfizmy genów kodujących te białka.

Pomimo, iż początkowe badania nad genetycznie uwarunkowaną skłonnością do chorób autoimmunologicznych skupiły się na obszarze kodującym białka układu HLA, to dalsze badania

uwzględniające zjawisko LD oraz prowadzone na grupach spokrewnionych chorych sugerowały, iż równie istotnym obszarem genomu odpowiedzialnym za zwiększone ryzyko niektórych chorób autoimmunologicznych jest region q33 chromosomu 2. W obszarze tym zlokalizowane są geny *CD28*, *CTLA-4* oraz *ICOS* i uważany jest za istotny w warunkowaniu ogólnej podatności na choroby autoimmunologiczne, niezależnie od specyficzności narządowej, jednakże w przypadku choroby Gravesa i Basedowa gen *CTLA-4* uważany jest za jeden z najważniejszych genetycznych czynników ryzyka choroby.

Ponieważ 1). wyniki uprzednio przez nas opublikowanych międzynarodowych badań asocjacyjnych analizujących zmienność polimorficzną genu *CTLA-4* wskazały region 3'UTR jako region genu najistotniej związany z ryzykiem choroby Gravesa i Basedowa, 2). OT traktowana jest jako odrębny fenotyp choroby Gravesa i Basedowa oraz 3). obserwowana jest zaburzona ekspresja molekuł ko-stymulujących w ChGB, dlatego też postawiliśmy hipotezę iż cząsteczki te mogą być prawdopodobnymi istotnymi czynnikami molekularnymi zarówno w predyspozycji jak i w kształtowaniu fenotypu OT.

W pracy 1 [IF:3,279; MNiSW/KBN:25,000] analizowano zmienność polimorficzną genów bezpośrednio zaangażowanych w regulację aktywacji limfocytów T: *CTLA-4*, *CD28*, *ICOS* jako potencjalnych markerów OT oraz czynników modulujących przebieg kliniczny choroby.

Dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na zidentyfikowanie i opisanie szeregu miejsc polimorficznych występujących w genach kodujących cząsteczki: supresorową *CTLA-4* oraz ko-stymulujące *CD28* i *ICOS*. Dokładna i wnikliwa analiza dostępnych danych literaturowych pozwoliła na wybór polimorfizmów o znaczeniu funkcjonalnym, których obecność wiąże się z różną transkrypcją, translacją lub funkcją białka:

- *CTLA-4*g.319C>T (rs5742909) zlokalizowany w proksymalnym, wysoce konserwatywnym, regionie promotorowym genu *CTLA-4* - będący częścią konsensusowego miejsca transkrypcji czynnika-1 modulującego limfocyt (LEF-1) wpływa na aktywność promotora. Ponadto polimorficzny allel [T] związany jest z wyższą aktywnością promotora i ze znacząco wyższą ekspresją zarówno mRNA dla *CTLA-4* jak i wyższą ekspresją *CTLA-4* na powierzchni stymulowanych i niestymulowanych limfocytów T.
- *CTLA-4*c.49A>G (rs231775) związany z substytucją nukleotydu adeniny (A) na guaninę (G) w pozycji +49 w eksonie 1 genu, której konsekwencją jest zmiana aminokwasu treoniny na alaninę w peptydzie liderowym, skutkująca obniżeniem efektywności hamowania aktywacji limfocytów T przez cząsteczkę *CTLA-4*
- polimorfizm mikrosatelitarny *CTLA-4*g.\*642AT(8\_33) zlokalizowany w 3' nietranslacyjnym regionie (3'UTR) związany z poziomem transkrypcji i stabilnością mRNA
- CT60 (*CTLA-4*g.\*6230G>A, rs3087243) zlokalizowany w regionie 3'UTR genu - moduluje alternatywne składanie mRNA i wpływa na stosunek powstających izoform *CTLA-4*/s*CTLA-4* (pełnej - występującej w cytoplazmie komórki lub na jej powierzchni / izoformy

rozpuszczalnej, pozbawionej części przez błonowej, przez co krążącej w surowicy). Ponadto opublikowane przez nas wyniki badań wskazują, iż obecność polimorficznego wariantu [G] (genotypu [GG]+[GA]) wiązała się z wyższym stężeniem sCTLA-4

- Jo31 (*CTLA-4g.\*10223G>T*, rs11571302) zlokalizowany w regionie 3'UTR genu - biologiczne znaczenie omawianego miejsca polimorficznego nie jest udokumentowane, pozostaje w silnym niezrównoważeniu sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD) z CT60. Ponadto opublikowane przez nas wyniki badań wskazują iż polimorficzny wariant [G] (genotypu [GG]+[GT]) związany był z wyższym stężeniem sCTLA-4
- *CD28c.17+3T>C* (rs3116496) - wymiana tymidyny na cytozynę w 3 intronie genu w pozycji 17 – zlokalizowane jest w pobliżu miejsca akceptorowego dla czynników białkowych, składających mRNA, przeprowadzających proces wycinania intronów i składania transkryptu dla genu *CD28*, i w związku z tym może wpływać na efektywność składania transkryptu i ekspresji białka
- polimorfizm mikrosatelitarny *ICOSc.1554+4GT(8\_15)* - usytuowany w pobliżu miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1, dlatego też obecność tego polimorfizmu zmienia aktywność transkrypcyjną tego czynnika

Tak więc, do badań wyselekcjonowano funkcjonalne polimorfizmy: *CD28c.17+3T>C* (rs3116496), *CTLA-4g.319C>T* (rs5742909), *CTLA-4c.49A>G* (rs231775), *CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*, CT60 (*CTLA-4g.\*6230G>A*, rs3087243), Jo31 (*CTLA-4g.\*10223G>T*, rs11571302), *ICOSc.1554+4GT(8\_15)*.

Ponadto, raz pierwszy opisaliśmy kompleksową analizę interakcji międzygenowych pomiędzy genami *CD28/CTLA-4/ICOS* zlokalizowanymi w bliskim sąsiedztwie względem siebie w regionie chromosomu 2q33, traktowanymi jako *locus* i analizowanymi na poziomie haplotypów, zarówno pod kątem związku z ryzykiem jak i przebiegiem klinicznym OT. Podejście nasze oparliśmy o hipotezę zakładającą potencjalne implikacje funkcjonalne polimorfizmów zlokalizowanych w poszczególnych genach bezpośrednio na kodowane przez nie molekule, jak i wzajemną interakcję zmienności genetycznej genów zlokalizowanych w jednym *locus* na kodowane przez te geny cząsteczki. Założenie nasze oparliśmy na dostępnych dowodach literaturowych, które wskazywały iż zmienność polimorficzna genu *ICOS* wywiera funkcjonalny wpływ nie tylko na poziom ekspresji mRNA *ICOS* ale także na poziom ekspresji sąsiadującego bezpośrednio z nim w jednym *locus* *CTLA-4*.

Analizując region chromosomu 2q33 jako *locus* wykazaliśmy istotne zależności pomiędzy poszczególnymi haplotypami a wystąpieniem OT oraz przebiegiem klinicznym choroby.

Haplotyp *CD28c.17+3T>C*[T]/*CTLA-4g.319C>T*[C]/*CTLA-4c.49A>G*[G]/*CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*[AT<sub>16-21</sub>]/CT60[G]/Jo31[G]/*ICOSc.1554+4GT(8\_15)*(m) jest nie tylko związany z ryzykiem OT, ale też z przebiegiem klinicznym. Ponadto, wystąpienie OT o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT) związane było z haplotypami TCA[AT<sub><16</sub>]GT(m), oraz TCA[AT<sub>>21</sub>]AT(m), natomiast OT o łagodniejszym przebiegu (OT łagodna i umiarkowana) związane

było z haplotypami: CCG[AT<sub>16-21</sub>]GG(m), TCG[AT<sub>>21</sub>]GG(m), TCG[AT<sub><16</sub>]GG(l), TCA[AT<sub><16</sub>]GG(m), TCA[AT<sub><16</sub>]GT(l), oraz TCA[AT<sub>16-21</sub>]GG(m).

Co istotne, wyróżniliśmy również swoiste haplotypy mogące być markerami dobrego rokowania: TCA[AT<sub>>21</sub>]GG(m) oraz TCG[AT<sub><16</sub>]GG(m) występujące w grupie pacjentów bez klinicznie jawnych symptomów OT.

Natomiast podejście zakładające analizę jednoczynnikową wskazało dwa polimorfizmy zlokalizowane w regionie 3'UTR genu *CTLA-4*: CT60 (*CTLA-4*g.\*6230G>A, rs3087243) oraz *CTLA-4*g.\*642AT(8\_33) jako potencjalne markery molekularne OT oraz jako czynniki rokownicze.

Osoby będące homozygotami *CTLA-4*g.\*642AT(8\_33)[AT<sub>16-21</sub>] 2,42-krotnie bardziej narażone są na ryzyko wystąpienia orbitopatii tarczycowej. Ponadto genotyp ten może być użytecznym markerem rokowniczym. Obecność tego genotypu związana była ze złym rokowaniem – 4,55-krotnie zwiększała ryzyko progresji choroby do postaci o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT). Co ciekawe, genotyp ten istotnie częściej występował w nieaktywnej fazie OT (CAS<4).

Podobnie polimorfizm CT60 rozpatrywany może być jako potencjalny marker OT oraz czynnik rokowniczy. Wykazaliśmy bowiem, iż obecność polimorficznego genotypu [AA] istotnie statystycznie zmniejszała ryzyko wystąpienia OT jak i był on markerem dobrego rokowania: związany był z łagodnym przebiegiem OT.

Jakkolwiek związek pomiędzy ryzykiem OT a polimorfizmem zlokalizowanym w regionie promotorowym genu *CTLA-4*: g.319C>T (rs5742909) obserwowany był jedynie na poziomie alleli, to polimorfizm ten rozpatrywany może być jako potencjalny czynnik rokowniczy. Polimorficzny wariant [T] związany był z aktywną fazą OT (CAS≥4).

Natomiast pozostałe polimorfizmy zlokalizowane w genie *CTLA-4*: c.49A>G (rs231775) oraz Jo31 (*CTLA-4*g.\*10223G>T, rs11571302) związane były jedynie z przebiegiem OT. Obecność polimorficznego wariantu c.49A>G [G] (genotyp [GG]+[AG]) związana była z progresją OT. Z kolei polimorficzny wariant Jo31[T] (genotyp [TT]+[GT]) był markerem dobrego rokowania.

Ze względu na fakt, iż najistotniejszym czynnikiem środowiskowym wpływającym na rozwój i przebieg OT jest palenie papierosów, i co ciekawe silniejszą zależność pomiędzy ryzykiem wystąpienia OT a natężeniem palenia papierosów obserwowano już po rozpoznaniu ChGB niż z łącznym obciążeniem paleniem w ciągu całego życia, ten czynnik środowiskowy uwzględniony został jako istotny parametr w analizie interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi w kontekście wpływu na wystąpienie i przebieg kliniczny OT. Dostępne dane literaturowe potwierdziły zwiększone ryzyko rozwinięcia i progresji OT z paleniem tytoniu. Ponadto, opisana w literaturze analiza retrospektywna wykazała zmniejszone ryzyko rozwoju OT oraz lepszą odpowiedź na leczenie zarówno radioizotopowe jak i glikokortykosteroidami u chorych nie palących papierosów w porównaniu z palaczami. Jakkolwiek mechanizm szkodliwego wpływu palenia papierosów w OT

pozostaje nieznany, zaprzestanie palenia tytoniu poprawia zarówno odpowiedź na leczenie jak i zmniejsza ryzyko rozwoju OT *de novo*.

Ponadto zaobserwowaliśmy iż w grupie mężczyzn częściej występowała orbitopatia o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT) [1, 2], dlatego też parametr ten uwzględniony został jako istotny czynnik pozagenetyczny endogenny w analizie interakcji z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi.

Analiza wieloczynnikowa oparta na metodzie regresji logistycznej mająca na celu ocenę wpływu analizowanych polimorfizmów, które w analizach jednoczynnikowych uznane zostały za czynniki ryzyka wystąpienia choroby o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT): obecność allelu c.49A>G[G] (genotyp [GG]+[AG]), CT60[G] (genotyp [GG]+[GA]), Jo31[G] (genotyp [GG]+[GT]), oraz allelu g.\*642AT(8\_33)[(AT<sub>16-21</sub>)] (genotypy [(AT<sub><16</sub>)(AT<sub>16-21</sub>)]+[(AT<sub>16-21</sub>)(AT<sub>16-21</sub>)]+[(AT<sub>16-21</sub>)(AT<sub>>21</sub>)]]) oraz czynników środowiskowych i endogennych: płci męskiej i palenia papierosów wykazała, iż polimorfizm g.\*642AT(8\_33) i płeć męska są niezależnymi czynnikami różnicującymi wystąpienie OT o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT).

## **2. Ocena wartości klinicznej polimorfizmu Pro<sup>12</sup>Ala zlokalizowanego w genie *PPAR $\gamma$ 2*, istotnego w procesie adipogenezy, immunoregulacji i kontroli reakcji zapalnej, jako użytecznego markera molekularnego orbitopatii tarczycowej (OT) oraz jako czynnika rokowniczego**

Badania nad udziałem tkanki tłuszczowej w patogenezie OT wzięły początek z klinicznej obserwacji wzrostu objętości ciała tłuszczowego oczodołu u części pacjentów z ChGB. Znacząca rola PPAR $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors- $\gamma$* ) nie tylko w utrzymaniu homeostazy lipidowo-węglowodanowej, ale także w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy, a zwłaszcza w immunoregulacji i kontroli reakcji zapalnej oraz w adipogenezie zdecydowała o włączeniu PPAR $\gamma$  w strategię poszukiwania czynników genetycznych zarówno ryzyka jak i przebiegu klinicznego OT opartą na genach “kandydatach”. Wybór został również oparty na opublikowanych badaniach *in vitro* wskazujących na stymulację oczodołowej adipogenezy przez agonistów PPAR $\gamma$  oraz zwiększenie ekspresji genu *PPAR $\gamma$*  we wczesnym stadium różnicowania preadipocytów. Hipotezę o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym jak i rokowniczym PPAR $\gamma$  w OT potwierdza opisana zwiększona ekspresja tego genu w tkance tłuszczowej oczodołu pacjentów z ChGB w porównaniu do osób zdrowych jak i wzmożona aktywacja genu w aktywnej fazie OT w porównaniu do fazy nieaktywnej. Natomiast wybór polimorfizmu Pro<sup>12</sup>Ala (c.34C>G, rs1805192) zlokalizowanego w swoistym jedynie dla izoformy PPAR $\gamma$ 2, której ekspresja z kolei jest swoista głównie dla adipocytów, eksonie B podyktowany był po pierwsze swoistością ekspresji izoformy PPAR $\gamma$ 2, po drugie - funkcjonalnością tego miejsca polimorficznego: polimorfizm ten moduluje ekspresję i/lub funkcję cząsteczki kodowanej

przez ten gen. Związek polimorfizmu *PPAR* $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala z wystąpieniem oraz przebiegiem klinicznym OT przedyskutowany został w publikacji 2 [IF:2,488; MNiSW/KBN:25,000].

W badaniach naszych obejmujących 276 pacjentów wykazaliśmy, iż polimorficzny wariant <sup>12</sup>Ala nie tylko istotnie statystycznie zmniejszał ryzyko wystąpienia OT, lecz także związany był z lepszym rokowaniem. Co istotne, w grupie pacjentów genotyp Ala<sup>12</sup>Ala obserwowany był jedynie wśród tych bez klinicznie jawnej OT. Ponadto, u pacjentów posiadających polimorficzny wariant <sup>12</sup>Ala (genotyp Ala<sup>12</sup>Ala+Pro<sup>12</sup>Ala) nasilenie i stopień aktywności OT były mniejsze w porównaniu do pacjentów, u których nie obserwowano tego polimorfizmu (o genotypie Pro<sup>12</sup>Pro).

Wykazaliśmy także, iż polimorficzny allel <sup>12</sup>Ala (genotyp Ala<sup>12</sup>Ala+Pro<sup>12</sup>Ala) jest czynnikiem chroniącym pacjentki przed wystąpieniem OT, natomiast nie jest czynnikiem rokowniczym w tej grupie pacjentów.

Z kolei równoczesna analiza związku tego polimorfizmu z rodzinnym występowaniem chorób tarczycy oraz ryzykiem wystąpienia OT wskazuje, iż polimorficzny wariant <sup>12</sup>Ala jest czynnikiem chroniącym przed OT niezależnie od rodzinnych dysfunkcji tarczycy.

Obserwowaliśmy również wyraźną zależność pomiędzy polimorfizmem *PPAR* $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala, paleniem papierosów oraz ryzykiem OT. Co ważne, palacze będący nosicielami polimorficznego wariantu <sup>12</sup>Ala chronieni byli przed wystąpieniem OT.

Zwraca uwagę, że analiza wieloczynnikowa uwzględniająca wszystkie omawiane parametry wykazała niezależny związek polimorfizmu *PPAR* $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala z wystąpieniem OT ( $p=0,0001$ ), wskazując iż obecność genotypu „dzikiego” Pro<sup>12</sup>Pro 3,24-krotnie zwiększała ryzyko wystąpienia orbitopatii tarczycowej.

### **3. Związek polimorfizmu rs11675434, zlokalizowanego w pobliżu genu kodującego peroksydazę tarczycową (*TPO*), z ryzykiem i przebiegiem klinicznym OT oraz analiza potencjalnych interakcji z pozagenetycznymi uznanymi czynnikami związanymi z ryzykiem tej choroby: płcią, nikotynizmem oraz rodzinnym występowaniem chorób tarczycy.**

Ponieważ peroksydaza tarczycowa (*TPO*), uważana za główny autoantygen w autoimmunologicznych chorobach tarczycy, oraz kluczowy enzym uczestniczący w biosyntezie hormonów tarczycy katalizujący utlenianie jodków w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i jodowanie tyrozyn, które są następnie sprzęgane do trijodotyroniny (T<sub>3</sub>) i tetrajodotyroniny (T<sub>4</sub>), jest bezpośrednio związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, oraz pośrednio z orbitopatią tarczycową, dlatego też gen *TPO* włączony został w strategię analizy asocjacji z genami “kandydującymi”.

Ponadto, wybór miejsca polimorficznego rs11675434 oparty został także na dostępnych danych literaturowych wskazujących związek polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) zlokalizowanych w pobliżu genu *TPO* z poziomem w surowicy przeciwciała przeciwko *TPO* w dwóch niezależnych analizach w populacjach kaukaskich jak i

azjatyckich, oraz o wyniki badań asocjacyjnych całego genomu (ang. *genome-wide association study*, GWAS) wskazujących na związek tego polimorfizmu z ryzykiem ChGB oraz fenotypem choroby – orbitopatią tarczycową. Wykazano bowiem, iż polimorficzny wariant [T] obecny w tym miejscu polimorficznym związany był z istotnie wyższymi stężeniami TPOAb.

Ponieważ udokumentowany jest zależny od płci związek pomiędzy zmiennością polimorficzną a regulacją funkcji tarczycy, dlatego też celem badań opublikowanych w pracy 3 [IF:2,487; MNiSW/KBN:20,000] było określenie znaczenia polimorfizmu rs11675434 w kształtowaniu fenotypu OT analizowanego w kontekście interakcji z czynnikami środowiskowymi i endogennymi w dużej, reprezentatywnej i jednorodnej pod względem rozpoznania grupie 1231 pacjentów.

W badaniach naszych polimorficzny allel [T] istotnie zwiększał ryzyko wystąpienia OT, a ryzyko to zależne było od wieku i płci pacjentów - allel ten istotnie zwiększał ryzyko OT w grupie pacjentów powyżej 45 r.ż. oraz wśród mężczyzn.

Nie wykazaliśmy natomiast znaczenia rokowniczego badanego miejsca polimorficznego.

#### ***Podsumowanie, wnioski oraz możliwa implikacja kliniczna***

Z uwagi na fakt, iż orbitopatia tarczycowa jest chorobą o złożonej etiopatogenezie, której rozwój jak i kształtowanie fenotypu zależec może od złożonych interakcji międzygenowych jak i interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i endogennymi, określenie potencjalnych molekularnych markerów diagnostycznych oraz czynników rokowniczych może przynieść istotny postęp w diagnostyce, profilaktyce i terapii tej choroby.

Opisane wyniki wskazują, iż markerem o największym prawdopodobnym znaczeniu zarówno diagnostycznym jak i prognostycznym może być polimorfizm *PPAR* $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala. Równie atrakcyjnym markerem może być wysoce zróżnicowany polimorfizm mikrosatelitarny *CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*, CT60 oraz polimorfizm rs11675434 zlokalizowany w pobliżu genu *TPO*.

Implikacją kliniczną naszych obserwacji może być uwzględnienie wskazanych przez nas miejsc polimorficznych *PPAR* $\gamma$ 2Pro<sup>12</sup>Ala, *CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*, CT60 oraz rs11675434 w medycynie spersonalizowanej jak i translacyjnej. Informacje wskazane w niniejszych pracach wykorzystane bowiem mogą być przy konstruowaniu testów diagnostycznych mogących znaleźć zastosowanie w medycynie spersonalizowanej. Indywidualny profil genetyczny pacjenta umożliwi precyzyjną diagnozę i prognozę kliniczną oraz umożliwić może dobór odpowiedniej spersonalizowanej terapii o potencjalnie wyższej skuteczności i minimalnych efektach ubocznych.

W kontekście polimorfizmu Pro<sup>12</sup>Ala zlokalizowanego w swoistym dla *PPAR* $\gamma$ 2 eksonie B, określenie profilu genetycznego w zakresie tego miejsca polimorficznego może mieć istotne znaczenie w strategii poszukiwania nowych leków działających przez receptory PPAR. Polega ona na projektowaniu zupełnie nowych tkankowo-specyficznych cząsteczek, selektywnie modulujących aktywność wybranych receptorów, tzw. selektywnych modulatorów aktywności (SNuRMs), które



dzięki dużej wybiórczości nie będą powodowały działań niepożądanych charakterystycznych dla tzw. pełnych agonistów.

Funkcjonalne badania *in vitro* wskazujące, iż obecność polimorficznego wariantu Ala<sup>12</sup> skutkuje niższym powinowactwem do elementu wiążącego PPRE (ang. *PPAR-response element*) co w konsekwencji prowadzić może do zaburzeń aktywacji konkretnych genów oraz wskazany w licznych badaniach asocjacyjnych związek tego wariantu polimorficznego z niższym ryzykiem wystąpienia otyłości jak i wyniki naszych badań sugerują, iż profilowanie genetyczne tego miejsca polimorficznego może być niezwykle istotne przy projektowaniu SNUiMs oraz w prognozowaniu progresji OT.

Natomiast, profil zmienności genetycznej regionu 3'UTR genu *CTLA-4*, gdzie zlokalizowany jest polimorfizm CT60, wykorzystany może zostać do przewidywania poziomu ekspresji sCTLA-4, w a konsekwencji może być użyteczne w personalizacji celowanej immunoterapii oraz prognozowaniu progresji choroby.

Podobnie, określenie genetycznego wariantu miejsca polimorficznego rs11675434 zlokalizowanego w pobliżu genu *TPO* może być wykorzystane do przewidywania poziomu ekspresji TPOAb oraz do prognozowania progresji choroby.

## 2. Znaczenie wybranych czynników molekularnych: genu kodującego immunologiczny punkt kontroli odpowiedzi odpornościowej w etiopatogenezie stwardnienia rozsianego

Stwardnienie rozsiane jest chroniczną chorobą zapalną ośrodkowego układu nerwowego (CNS), gdzie zapalenie i demielinizacja są konsekwencją reakcji autoimmunologicznej, a heterogenna etiopatogeneza tej choroby zakłada interakcję czynników genetycznych i środowiskowych. Istotną rolę odgrywają zaburzenia odporności komórkowej, przy czym obwodowa aktywacja autoreaktywnych wobec antygenów mielinowych limfocytów T wymaga 2 sygnałów: pierwszego swoistego, który wobec braku antygeny mielinowy może być realizowany w procesie molekularnej mimikry i/lub reakcji z superantygenem oraz drugiego antygenowo nieswoistego. Dotychczasowa wiedza dotycząca biologii, ekspresji, oraz funkcji receptora PD-1 jak i jego ligandów, wskazuje i potwierdza istotność szlaku PD-1/PD-L w regulacji odpowiedzi immunologicznej, ze szczególnym znaczeniem w zapobieganiu rozwoju zaburzeń autoimmunologicznych poprzez negatywną regulację autoreaktywnych limfocytów. Pobudzenie receptora PD-1 ogranicza aktywację i ekspansję autoreaktywnych limfocytów T oraz upośledza ich funkcję efektorową, a co za tym idzie negatywne zmiany w poszczególnych tkankach. Szlak ten może również zapobiegać nabyciu przez autoreaktywne dziewicze limfocyty T cech efektorowych. Ponadto, zaburzenia ekspresji PD-1 na limfocytach T skutkują wzmożonym napływem do tkanek, produkcją cytokin i proliferacją oraz obniżeniem gęstości antygeny wymaganym do aktywacji tych limfocytów, co może prowadzić do reakcji autoimmunologicznej.

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że *knock-out* genu *pd-1* powoduje rozwinięcie poważnych zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym, a w zwierzęcym modelu

stwardnienia rozsianego, doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniu opon mózgowych i mózgu (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE), receptor PD-1 oraz jego ligand zaangażowane są w supresję EAE. Ponadto podanie anti-PD-1 w trakcie indukcji EAE przyspiesza początek oraz nasila ciężkość choroby. Badania te dowodzące roli szlaku PD-1 w patogenezie SM dały podstawę do włączenia genu *PDCDI* kodującego tę cząsteczkę w strategię genów „kandydatów”, którego zmienność polimorficzna nie tylko wiąże się z nieprawidłową ekspresją i/lub funkcją cząsteczki ale także związkiem konkretnych wariantów polimorficznych z predyspozycją do chorób autoimmunologicznych jak również ich przebiegiem klinicznym. Ponadto, dowodem potwierdzającym słuszność naszej hipotezy mówiącej o istotnej roli PD-1 w etiopatogenezie SM oraz o włączeniu genu *PD-1* w strategię opartą na genach „kandydatach” są dostępne dane literaturowe wskazujące na związek zmienności polimorficznej genu *PDCDI*, kodującego cząsteczkę PD-1 (ang. *Programmed death-1*, CD279), z postacią PPSM (ang. *primary progressive*) SM. Wykazano bowiem, iż polimorfizm PD-1.3 (rs11568821, +7146G>A), zlokalizowany w intronie 4, może być istotnym czynnikiem molekularnym związanym z tą postacią SM.

Dlatego też, ocenie poddano wartość kliniczną zmienności polimorficznej genu kodującego cząsteczkę PD-1 zaangażowaną w regulację zarówno centralnej, jak i obwodowej tolerancji w etiopatogenezie SM. Zaangażowanie polimorfizmów *PDCDI* w kształtowaniu fenotypu MS analizowane było również w kontekście potencjalnych interakcji z czynnikami pozagenetycznymi związanymi z ryzykiem tej choroby jak i symptomatologią SM [4, IF: **2,536**; MNiSW/KBN:**25,000**]. Ostatecznie przeprowadziliśmy kompleksową analizę wartości klinicznej poszczególnych wyselekcjonowanych polimorfizmów genetycznych:

- PD-1.3 (rs11568821, c.627+189G>A, +7146G>A) zlokalizowany w intronie 4 – polimorficzny allel [A] związany jest ze słabszą supresją aktywacji limfocytów T oraz sekrecją cytokin
- PD-1.5 (rs2227981, c.804T>C, +7785C>T) zlokalizowany w eksonie 5 – związany z ryzykiem chorób autoimmunologicznych (RZS oraz T1D)
- PD-1.9 (rs2227982, c.644C>T, +7625C>T) zlokalizowany w eksonie 5, w wyniku którego następuje wymiana aminokwasu alaniny na walinę (Ala → Val) w kodonie 215 (polimorfizm nonsynonymous), allel [T] związany z ryzykiem zachorowania na choroby autoimmunologiczne, badania *in silico* wskazują możliwy związek z procesem alternatywnego składania mRNA

jako potencjalnych markerów molekularnych SM oraz jako czynników prognostycznych.

Wykazaliśmy zależny od płci związek pomiędzy polimorfizmem PD-1.3 a ryzykiem wystąpienia SM – polimorficzny allel [A] istotnie chronił kobiety przed wystąpieniem SM. Natomiast żaden z badanych polimorfizmów genetycznych nie był bezpośrednio związany z progresją choroby -

przejściem z RRSM do SPSM zarówno w analizie jednoczynnikowej jak i haplotypowej uwzględniającej potencjalne interakcje pomiędzy tymi miejscami polimorficznymi.

Z kolei, polimorfizm PD-1.5 był bezpośrednio związany z symptomatologią SM. Polimorficzny wariant [T] (genotyp [TT]+[CT]) zmniejszał ryzyko wystąpienia diplopii, natomiast faworyzował parestezję jako pierwszy symptom SM. Związek pomiędzy diplopią a badanymi polimorfizmami obserwowany był także na poziomie haplotypów – po raz pierwszy wykazaliśmy 2 haplotypy: predysponujący i chroniący przed tym pierwszym symptomem choroby SM. Co znaczące związek z symptomatologią determinowany był obecnością konkretnego wariantu w miejscu polimorficznym PD-1.5. Haplotyp w którym obecny był polimorficzny allel [T] istotnie zmniejszał ryzyko diplopii, natomiast haplotyp zawierający allel typu „dzikiego” faworyzował diplopię jako pierwszy symptom SM, co zgodne było z obserwacjami na poziomie analizy asocjacji jednoczynnikowych. Postawiliśmy więc hipotezę, iż polimorfizm PD-1.5 może być prawdopodobnym czynnikiem modulującym przebieg kliniczny SM. Niezbędne są jednak dalsze badania w celu potwierdzenia naszej obserwacji.

Analiza badanych czynników molekularnych (polimorfizmów genetycznych) w kontekście potencjalnych interakcji z czynnikami pozagenetycznymi jak i z symptomatologią choroby wskazała objawy mózdkowe, wiek i oraz wiek zachorowania jako czynniki predykcyjne progresji choroby (określane jako przejście z RRSM na SPSM). Natomiast analiza mająca na celu oszacowanie modelowanego prawdopodobieństwa progresji do SPSM (wielowymiarowa regresja logistyczna), wskazała marker genetyczny PD-1.5 jako statystycznie istotny czynnik ryzyka niezależnie od wieku i wieku zachorowania, eliminując znaczenie obecności objawów mózdkowych.

Istotną obserwację uzyskaliśmy stosując po raz pierwszy nowe podejście, uwzględniające ciężkość RRSM (w oparciu o czas trwania remisji między I i II rzutem). Wykazaliśmy, iż jedynie wśród pacjentów z lżejszym przebiegiem RRSM (dłuższym czasem trwania remisji między I i II rzutem) występuje haplotyp PD-1.3[A]/PD-1.5[T]/PD-1.9[C].

**Podsumowując, istotnym osiągnięciem jest wykazanie znaczenia zmienności polimorficznej genu *PD-1* w etiopatogenezie SM.**

**Ponadto, ważną informacją jest obserwacja wskazująca, iż polimorfizm PD-1.3 predysponuje do SM zależnie od płci, a polimorfizm PD-1.5 może być prawdopodobnym czynnikiem prognostycznym.**

Jako że nasze badanie jest największym i najbardziej kompleksowym dotychczas opublikowanym w reprezentatywnej i jednorodnej pod względem rozpoznania grupie pacjentów niezbędne są dalsze badania mające na celu ostateczne określenie związku PD-1 w patomechanizmie SM.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Po wyłączeniu prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego mój dorobek naukowy stanowi **28 pełnotekstowych prac naukowych**, w tym 26 prac oryginalnych (w tym 1 list do redakcji oraz 3 prace w suplementach czasopism (prace podlegały ocenie recenzentów)) oraz 2 prace poglądowe oraz **1 rozdział w książce** „*Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements*” (wydanej przez Springer International Publishing AG w 2017r.).

Natomiast dotychczasowy całkowity dorobek naukowy stanowią **34 pełnotekstowe prace naukowe** (31 prac oryginalnych, w tym 1 list do redakcji i 3 prace w suplementach czasopism (prace podlegały ocenie recenzentów); oraz 3 publikacje poglądowe). Co istotne 28 prac opublikowano w czasopismach z listy filadelfijskiej wg. *ISI Journal Citation Reports*®*Ranking*.

W 7 publikacjach jestem pierwszym oraz korespondencyjnym autorem, w 1 jestem równorzędnym pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, natomiast w 7 jestem drugim autorem. 17 prac opublikowałam po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

- Sumaryczna punktacja cyklu publikacji przedłożona w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **IF:11,423; MNiSW/KBN: 110,000**.
- Sumaryczna punktacja za prace oryginalne, poglądowe z wyłączeniem prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego wynosi: **IF: 46,069; MNiSW/KBN: 408,00**
- Sumaryczna punktacja za prace oryginalne, poglądowe całkowitego dorobku naukowego wynosi: **57,492 IF; 536 KBN/MIN**
- Sumaryczna punktacja całkowitego dorobku naukowego stanowiącego prace oryginalne, poglądowe i listy do redakcji oraz opublikowane w suplementach czasopism (prace podlegały ocenie recenzentów) wynosi: **66,435 IF; 636,000 MNiSW/KBN**; za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora – **41,970 IF; 417,000 MNiSW/KBN**.
- Aktualna liczba cytowań (wg. *Web of Science, WoS*): **361**; natomiast bez autocytoowań **266**
- Index Hirscha (wg. *Web of Science, WoS*): **10**; bez autocytoowań: **9**
- Jestem współautorem **73** doniesień konferencyjnych, w tym **56** prezentowane były na wiodących konferencjach międzynarodowych, natomiast **17** – na wiodących konferencjach krajowych. Aktywnie (jako autor prezentujący) prezentowałam **17** doniesień konferencyjnych w formie posterowej oraz **3** jako wystąpienie ustne.
- Aktywnie uczestniczyłam w przygotowaniu 1 konferencji krajowej oraz 1 międzynarodowej (*10<sup>th</sup> East-West Immunogenetics Conference, EWIC*), podczas której byłam organizatorem i przewodniczyłam sesji tematycznej *MultiGenBank Workshop*.
- Byłam kierownikiem i głównym wykonawcą 1 projektu badawczego (źródło finansowania NCN) oraz uczestniczyłam w 14 projektach badawczych (źródło finansowania NCN), byłam głównym wykonawcą 4 projektów finansowanych przez Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz głównym wykonawcą 1 projektu dla młodych naukowców (źródło finansowania Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu).

- Uczestniczyłam również w projekcie finansowanym z Funduszy Europejskich 2007-2013, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka (POIG) mającym na celu utworzenie bazy danych immunogenetycznych polskiej populacji MultiGenBank.
- Uczestniczę obecnie w międzynarodowym projekcie *międzynarodowej sieci doskonałości dla badań nad predyspozycją do rozwoju chorób układu krążenia i zaburzeń metabolicznych uwarunkowaną polimorfizmami genu UCPI* finansowanym w ramach w ramach 7. PR UE PEOPLE Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) Research Executive Agency.
- Jestem **promotorem pomocniczym 2 przewodów doktorskich** (jeden w toku) prowadzonych na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz **promotorem 3 prac magisterskich** (Politechnika Wrocławska).
- Byłam **opiekunem naukowym 3 prac badawczych** (Politechnika Wrocławska), **11 praktyk studenckich** (7 - Politechnika Wrocławska, 3 - Uniwersytet Wrocławski, oraz 1 - Uniwersytet Jagielloński).
- Zrecenzowałam 19 publikacji w 11 prestiżowych czasopismach naukowych (z listy filadelfijskiej wg. *ISI Journal Citation Reports*® Ranking).

#### *Omówienie głównych kierunków badawczych nie związanych z tematem cyklu habilitacyjnego*

Moje zainteresowania naukowe związane są z zagadnieniami genetyczno-molekularnych uwarunkowań chorób człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów oraz chorób autoimmunizacyjnych, jak i z dziedziny psychiatrii. Tematyka ta była przedmiotem licznych projektów badawczych w których uczestniczyłam, a wyniki tych badań opublikowane zostały zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, dlatego też poniższe omówienie dotyczące moich głównych kierunków badawczych, poza tematem cyklu habilitacyjnego, ujęte zostało tematycznie i podzielone na następujące zagadnienia:

#### **5.1. Znaczenie molekuł ko-stymulujących w chorobach autoimmunologicznych i nowotworach**

Wyniki badań dotyczące tematyki objętej punktem 5.1. opublikowane zostały w cyklu 15 publikacji naukowych o sumarycznym IF:**33,008**; MNiSW/KBN:**301,000**:

**5.1.1.** Bilinska M., Gruszka E., Kosmaczewska A., Ciszak L., **Pawlak E.** Ekspresja receptora CD28 na limfocytach CD4+ krwi obwodowej u chorych na zwalniającą i wtórnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2004, 13(6):955-960.

**MNiSW/KBN: 5,000**

**5.1.2.** **Pawlak E.**, Bilińska M., Suwalska K., Tutak A., Kosmaczewska A., Ciszak L., Frydecka I. Serum soluble CTLA-4 (sCTLA-4) levels in patients with multiple sclerosis. *Polish Journal of Environmental Studies* 2005, 14(Suppl. II):665-668.

**IF: 0,461****MNiSW/KBN:15,000**

- 5.1.3.** Kosmaczewska A., Bilinska M., Ciszak L., Noga L., **Pawlak E.**, Szteblich A., Podemski R., Frydecka I. Dysregulation of cell-surface and cytoplasmic CTLA-4 (CD152) expression in peripheral blood CD4+ T cells from patients with multiple sclerosis (MS). *Journal of Neuroimmunology* 2007, 189:137-146.

**IF: 2,88****MNiSW/KBN:25,000**

- 5.1.4.** Karabon L., Kosmaczewska A., Bilinska M., **Pawlak E.**, Ciszak L., Jedynek A., Jonkisz A., Noga L., Pokryszko-Dragan A., Koszewicz M., Frydecka I. The *CTLA-4* gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology* 2009, 128(1 Suppl):e787-796. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03083.x.

**IF: 3,276****MNiSW/KBN: 27,000**

- 5.1.5.** Wagner M., Sobczyński M., Karabon L., Bilinska M., Pokryszko-Dragan A., **Pawlak-Adamska E.**, Cyrul M., Kusnierczyk P., Jasek M. Polymorphisms in CD28, CTLA-4, CD80 and CD86 genes may influence the risk of multiple sclerosis and its age of onset. *Journal of Neuroimmunology* 2015, 15:288:79-86. Epub 2015 Sep 18. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.09.004.

**IF: 2,536****MNiSW/KBN: 25,000**

- 5.1.6.** Kavvoura F.K., Akamizu T., Awata T., Ban Y., Chistiakov D.A., Frydecka I., Ghaderi A., Hiromatsu Y., Ploski R., Walker N., Wang P.W., Ban Y., Bednarczuk T., Chistiakova E.I., Chojm M., Hiratami H., Hank Joo S.H., Karabon L., Katayama S., Kurihara S., Liu R.T., **Pawlak E.**, Taniyama M., Tomita M., Tozaki T., Ioannidis J.P.A. *CTLA-4* gene polymorphisms and autoimmune thyroid diseases: meta-analyses of published data and individual-level data. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007 Aug;92(8):3162-3170. Epub 2007 May 15. DOI: 10.1210/jc.2007-0147

**IF: 5,493****MNiSW/KBN: 24,000**

- 5.1.7.** Daroszewski J.\*, **Pawlak E.\***, Karabon L., Frydecka I., Jonkisz A., Slowik M., Bolanowski M. Soluble CTLA-4 receptor an immunological marker of Graves' disease and severity of ophthalmopathy is associated with *CTLA-4* JO31 and CT60 gene polymorphisms. *European Journal of Endocrinology* 2009 Nov;161(5):787-793. Epub 2009 Sep 4. doi: 10.1530/EJE-09-0600.

\* – these authors equally participated to this work

**IF: 3,539****MNiSW/KBN: 27,000**

- 5.1.8.** Suwalska K., **Pawlak E.**, Karabon L., Tomkiewicz A., Dobosz T., Urbaniak-Kujda D., Kuliczowski K., Wolowiec D., Jedynek A., Frydecka I. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. *Human Immunology* 2008, 69(3):193-201.

**IF: 3,061****MNiSW/KBN: 20,000**

- 5.1.9.** Karabon L., Partyka A., Jasek M., Lech-Maranda E., Grzybowska-Izydorczyk O., Bojarska-Junak A., **Pawlak-Adamska E.**, Tomkiewicz A., Robak T., Rolinski J., Frydecka I. Intragenic Variations in BTLA Gene Influence mRNA Expression of BTLA Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients and Confer Susceptibility to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2016, Dec 8. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00005-016-0430-x

**IF: 2,464****MNiSW/KBN: 25,000**

- 5.1.10.** Karabon L., **Pawlak E.**, Tomkiewicz A., Kielbiński M., Potoczek S., Woszczyk D., Jonkisz A., Kuliczkowski K., Frydecka I. Lack of association between *CD28* gene polymorphism and multiple myeloma in a polish population. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2009, 18(2):129-133.

**IF: 0,094****MNiSW/KBN: 9,000**

- 5.1.11.** Karabon L., **Pawlak-Adamska E.**, Tomkiewicz A., Jedynek A., Kielbinski M., Woszczyk D., Potoczek S., Jonkisz A., Kuliczkowski K., Frydecka I. Variations in Suppressor Molecule CTLA-4 Gene Are Related to Susceptibility to Multiple Myeloma in a Polish Population. *Pathology & Oncology Research* 2012, 18(2):219-226. Epub 2011 Jul 9. DOI 10.1007/s12253-011-9431-6

**IF: 1,555****MNiSW/KBN: 20,000**

- 5.1.12.** Karabon L., **Pawlak E.**, Tomkiewicz A., Jedynek A., Passowicz-Muszynska E., Zajda K., Jonkisz A., Jankowska R., Krzakowski M., Frydecka I. *CTLA-4*, *CD28*, and *ICOS* gene polymorphisms associations with susceptibility to non-small cell lung cancer (NSCLC). *Human Immunology* 2011, 72(10):947-954. DOI 10.1016/j.humimm.2011.05.010

**IF: 2,837****MNiSW/KBN: 27,000**

- 5.1.13.** **Pawlak E.**, Karabon L., Włodarska-Polińska I., Jedynek A., Jonkisz A., Tomkiewicz A., Kornafel J., Stępień M., Ignatowicz A., Lebioda A., Dobosz T., Frydecka I. Influence of *CTLA-4/CD28/ICOS* gene polymorphisms on the susceptibility to cervical squamous cell carcinoma and stage of differentiation in the Polish population. *Human Immunology* 2010, 71(2):195-200. Epub 2009 Nov 12. doi: 10.1016/j.humimm.2009.11.006.

**IF: 2,872****MNiSW/KBN: 27,000**

- 5.1.14.** Włodarska-Polińska I., **Pawlak E.**, Suwalska K., Dobosz T., Potoczek S., Kornafel J., Frydecka I. Lack of association between *CD28* gene polymorphism and cervical cancer in Lower Silesian population. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2006, 15(4):595-598.

**MNiSW/KBN: 5,000**

- 5.1.15.** Karabon L., Tupikowski K., Tomkiewicz A., Partyka A., **Pawlak-Adamska E.**, Wojciechowski A., Kolodziej A., Dembowski J., Zdrojowy R., Frydecka I. Is the Genetic

Background of Co-Stimulatory CD28/CTLA-4 Pathway the Risk Factor for Prostate Cancer?  
*Pathology & Oncology Research* 2017, Jan 18 DOI 10.1007/s12253-016-0180-4

**IF: 1,940**

**MNiSW/KBN: 20,000**

**5.2. Czynniki immunogenetyczne w odniesieniu do ryzyka zachorowania, przebiegu i symptomatologii schizofrenii**

Wyniki badań dotyczące tematyki objętej punktem 5.2. opublikowane zostały w cyklu 5 publikacji naukowych o sumarycznym IF:**12,383**; MNiSW/KBN:**130,000**:

**5.2.1.** Frydecka D., Misiak B., Beszlej J.A., Karabon L., Pawlak-Adamska E., Tomkiewicz A., Partyka A., Jonkisz A., Kiejna A. Genetic variants in transforming growth factor- $\beta$  gene (TGFB1) affect susceptibility to schizophrenia. *Molecular Biology Reports* 2013, 40(10): 5607-5614. Epub 2013 Sep 25. doi: 10.1007/s11033-013-2662-8.

**IF: 1,958**

**MNiSW/KBN: 20,000**

**5.2.2.** Frydecka D., Beszlej A., Karabon L., Pawlak-Adamska E., Tomkiewicz A., Partyka A., Jonkisz A., Monika S.B., Kiejna A. The role of genetic variations of immune system regulatory molecules CD28 and CTLA-4 in schizophrenia. *Psychiatry Research* 2013, 208(2):197-198. Epub 2013 Feb 11. [letter to the editor] doi: 10.1016/j.psychres.2012.11.035.

**IF: 2,682**

**MNiSW/KBN: 30,000**

**5.2.3.** Frydecka D., Misiak B., Pawlak-Adamska E., Karabon L., Tomkiewicz A., Sedlaczek P., Kiejna A., Beszlej J.A. Sex differences in TGFB- $\beta$  signaling with respect to age of onset and cognitive functioning in schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015, 11:575-584. doi: 10.2147/NDT.S74672.

**IF: 1,867**

**MNiSW/KBN: 25,000**

**5.2.4.** Frydecka D., Misiak B., Pawlak-Adamska E., Karabon L., Tomkiewicz A., Sedlaczek P., Kiejna A., Beszlej J.A. Interleukin-6: the missing element of the neurocognitive deterioration in schizophrenia? The focus on genetic underpinnings, cognitive impairment and clinical manifestation. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2015, 265(6):449-459. doi: 10.1007/s00406-014-0533-5.

**IF: 4,113**

**MNiSW/KBN: 30,000**

**5.2.5.** Frydecka D., Beszlej J.A., Pawlak-Adamska E., Misiak B., Karabon L., Tomkiewicz A., Partyka A., Jonkisz A., Szewczuk-Bogusławska M., Zawadzki M., Kiejna A. CTLA4 and CD28 Gene Polymorphisms with Respect to Affective Symptom Domain in Schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2015, 71(3):158-167. Epub 2015 May 13. doi: 10.1159/000379751.

**IF: 1,763**

**MNiSW/KBN: 25,000**



**5.3. Związek zmienności polimorficznej genów HLA-G, LILRB1 i KIR2DL4, poziomu ekspresji cząsteczek kodowanych przez te geny z ryzykiem oraz przebiegiem klinicznym NSCLC**

- 5.3.1. Wisniewski A., Kowal A., Wyrodek E., Nowak I., Majorczyk E., Wagner M., **Pawlak-Adamska E.**, Jankowska R., Slesak B., Frydecka I., Kusnierczyk P. Genetic polymorphisms and expression of HLA-G and its receptors, KIR2DL4 and LILRB1, in non-small cell lung cancer. *Tissue Antigens* 2015, 85(6):466-475. Epub 2015 Apr 9. doi: 10.1111/tan.12561.

**IF: 2,046**

**MNiSW/KBN: 20,000**

**5.4. Zmienność polimorficzna genu naprawy DNA ERCC4 w płaskonabłonkowym raku szyjki macicy**

- 5.4.1. **Pawlak-Adamska E.**, Bartosinska M., Włodarska-Polinska I., Ignatowicz-Pacyna A., Kornafel J., Stepien M., Kochanowska I.E., Frydecka I. Tagging SNPs in the excision repair cross-complementing group 4 (*ERCC4*) gene increased risk of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) and modulate the disease outcome. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 2014, 5:172. doi: 10.4172/2157-2518.1000172

**5.5. Zmienność polimorficzna genu kodującego cząsteczkę supresorową CTLA-4 w allogenicznym transplatacjach komórek krwiotwórczych (HSCT) oraz wpływ polimorfizmów genu CTLA-4 na poziom mRNA i ekspresję białka u pacjentów po HSCT**

Wyniki badań dotyczące tematyki objętej punktem 5.5. opublikowane zostały w cyklu 2 publikacji naukowych o sumarycznym IF:**4,786**; MNiSW/KBN:**40,000**:

- 5.5.1. Karabon L., Markiewicz M., Partyka A., **Pawlak-Adamska E.**, Tomkiewicz A., Dzierzak-Mietla M., Kyrzcz-Krzemien S., Frydecka I. A CT60G>A polymorphism in the CTLA-4 gene of the recipient may confer susceptibility to acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics* 2015, 67(5-6):295-304. Epub 2015 May 5. doi: 10.1007/s00251-015-0840-7.

**IF: 2,303**

**MNiSW/KBN: 20,000**

- 5.5.2. Karabon L., Markiewicz M., Kosmaczewska A., Partyka A., **Pawlak-Adamska E.**, Tomkiewicz A., Ciszak L., Jagoda K., Dzierzak-Mietla M., Kyrzcz-Krzemien S., Frydecka I. Pretransplant donor and recipient CTLA-4 mRNA and protein levels as a prognostic marker for aGvHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology Letter* 2015, 165(1):52-59. doi: 10.1016/j.imlet.2015.03.011.

**IF: 2,483**

**MNiSW/KBN: 20,000**

**Ad. 5.1. Znaczenie molekuł ko-sygnalowych w chorobach autoimmunologicznych i nowotworach**

Zarówno w chorobach autoimmunologicznych jak i nowotworach nieprawidłowa ekspresja cząsteczek ko-sygnalowych, zarówno ko-stymulujących i supresorowych, może być następstwem zmienności polimorficznej genów kodujących te molekuly. Obecność konkretnych wariantów genetycznych może wpływać na poziom transkrypcji, translacji lub na zmienione właściwości białka i w ich następstwie zmianę funkcji białka, co konsekwencji może różnicować podatność poszczególnych osób na choroby, w rozwoju których zaburzenia immunologiczne odgrywają zasadniczą rolę.

Ponieważ efektywna aktywacja limfocytów T wymaga dwóch różnych sygnałów: sygnału indukowanego interakcją receptora limfocytów T (TCR/CD3) ze swoistym antygenem prezentowanym przez komórki APC w połączeniu z własną cząsteczką MHC, ko-stymulującego generowanych w na drodze niezależnej od antygeny, który działając synergistycznie do sygnału płynącego z receptora TCR/CD3, nie tylko wzmacnia, ale wręcz umożliwia ten proces wywołując efektywną odpowiedź w postaci proliferacji, różnicowania, klonalnej ekspansji komórek T, umożliwiającej pełnienie funkcji efektorowych związanych z produkcją cytokin i cytotoksycznością. Istotny związek zmienności polimorficznej genów kodujących te molekuly z prawidłowym funkcjonowaniem jak i ekspresją tych cząsteczek, jak również związek z predyspozycją do zachorowania zarówno na choroby autoimmunologiczne jak i nowotwory wskazuje ich istotne znaczenie we wczesnym wykrywaniu, monitorowaniu oraz określaniu grup ryzyka rozwoju chorób.

Znaczenie immunologicznych punktów kontrolnych w patomechanizmie schorzeń autoimmunologicznych: stwardnienia rozsianego oraz choroby Gravesa i Basedowa (ang. *Graves' disease*, GD) opisane zostało odpowiednio w cyklu 5 (5.1.1.-5.1.5., sumaryczny IF:**9,153**) oraz 3 publikacji (5.1.6.-5.1.7., sumaryczny IF:**12,311**). Natomiast znaczenie cząsteczek ko-sygnalowych w nowotworach dyskutowane było w cyklu 8 prac dotyczących nowotworów hematologicznych: przewlekłej białaczki limfocytowej (ang. *B-cell chronic lymphocytic leukemia*, B-CLL) [5.1.8., 5.1.9.; IF:**5,525**; MNiSW/KBN:**45,000**] i szpiczaka mnogiego (ang. *multiple myeloma*, MM) [5.1.10. i 5.1.11., sumaryczny IF:**1,649**; MNiSW/KBN:**29,000**], oraz nie-hematologicznych: niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) [5.1.12., IF:**2,046**; MNiSW/KBN:**20,000**], raka szyjki macicy (ang. *cervical cancer*) [5.1.13., 5.1.14, sumaryczny IF:**2,046**; MNiSW/KBN:**32,000**], i raka stercza (ang. *prostate cancer*, PCa) [5.1.15., IF:**1,940**; MNiSW/KBN:**20,000**].

Z kolei znaczenie rozpuszczalnej izoformy cząsteczki CTLA-4 (sCTLA-4) w chorobach autoimmunologicznych: MS oraz ChGB dyskutowane było w cyklu 3 publikacji [5.1.2., 5.1.3., 5.1.7.]. Jakkolwiek udział sCTLA-4 w szlaku sygnałowym CD80/CD86/CD28/CTLA-4 nie jest do końca poznany, to jednakże jego konstytutywna ekspresja wskazywać może na immunoregulującą funkcję tego białka. Tak więc sCTLA-4 stanowić więc może użyteczny biomarker diagnostyczny jak i prognostyczny, oraz stanowić może potencjalny cel terapeutyczny w personalizowanej celowanej immunoterapii.

Immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej w stwardnieniu rozsianym

Heterogenna etiopatogeneza stwardnienia rozsianego zakładająca interakcję czynników genetycznych i środowiskowych. Kluczowa rola autoreaktywnych limfocytów T w procesie demielinizacji oraz zaangażowanie szlaku CD28/CTLA-4-CD80/CD86 w utrzymanie obwodowej tolerancji autoreaktywnych limfocytów T unikających selekcji w grasicy, jak i zaburzenia równowagi kompetycyjnej pomiędzy CTLA-4 a CD28 na powierzchni limfocytu T, były podstawą do podjęcia badań mających na celu zbadanie roli tego szlaku w tej chorobie autoimmunologicznej. Obserwowana dysregulacja ekspresji tych molekuł w szeregu schorzeń autoimmunologicznych, która może być efektem funkcjonalnym polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w genach kodujących te cząsteczki, dała podstawę do uznania genów kodujących te białka jako genów „kandydujących”, które mogą potencjalnie brać udział w patogenezie SM. Podjęliśmy więc badania mające na celu ocenę wartości klinicznej wybranych polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w genie *CTLA-4*, kodującego kluczowe białko supresorowe szlaku CD28/CTLA-4-CD80/CD86, jako potencjalnych markerów molekularnych SM oraz jako czynników wpływających na przebieg kliniczny choroby. Udział wybranych parametrów molekularnych w kształtowaniu fenotypu MS analizowany był również w kontekście potencjalnych interakcji z czynnikami pozagenetycznymi związanymi z ryzykiem tej choroby. Ponadto w serii trzech publikacji [5.1.1-5.1.3] przeanalizowaliśmy również ekspresję cząsteczek: ko-stymulującej CD28 i supresorowej CTLA-4, oraz wpływ ich poziomu zarówno na ryzyko jak i przebieg kliniczny MS.

Wykazaliśmy, iż przewlekła aktywacja *in vivo* w postaci SM wtórnie postępującej (ang. *secondary progressive*, SP) wynikać może ze zwiększonej proporcji komórek CD4+/CD28 oraz może reprezentować zwiększoną subpopulację komórek pamięci opisaną w zaburzeniach autoagresji. Natomiast w przypadku postaci remisyjno-nawracającej (ang. *relapsing-remitting*, RR) obserwowana była wyższa wartość mediany odsetka subpopulacji limfocytów T CD4+/CTLA-4+. Pomimo, iż dokładny mechanizm ekspresji CTLA-4 *in vivo* na limfocytach T CD4+ w tej chorobie jest wciąż nieznanym, to jednak na podstawie faktu, iż ekspresja CTLA-4 na komórkach T indukowana jest w trakcie stymulacji, sugerujemy, że jego podwyższona ekspresja na limfocytach PB T CD4+ może odzwierciedlać stan ogólnoustrojowej aktywacji limfocytów T pomimo braku klinicznych objawów aktywności choroby. Aktywność systemową komórek T w SM potwierdza znacznie podwyższona ekspresją indukowalnego CD40L i CD69 na świeżo izolowanych limfocytach T CD4+ w obu postaciach SM. Tak więc, pomimo iż w długotrwałej klinicznie fazy stacjonarnej układ immunologiczny w obu postaciach choroby podlega ciągłej aktywacji, to poziom ekspresji antygeny supresorowego może być niewystarczający do efektywnego hamowania aktywacji limfocytów. Zaburzona ekspresja rozpuszczalnej izoformy CTLA-4 może mieć związek z nieefektywną supresją aktywacji limfocytów T przez antygen CTLA-4 ulegający ekspresji na powierzchni tych komórek. Stężenie sCTLA-4 w surowicy RRSM było wyższe niż w SPSM, ale stymulacja *ex vivo* i spontaniczna synteza sCTLA-4 w obu grupach SM była prawie podobna. Wyszliśmy więc hipotezę, iż

obserwowana ekspresja sCTLA-4 w SPSM, w kontekście opisywanej przez innych badaczy wyższej ekspresji cząsteczki CD86 w SPSM oraz udokumentowanego wyższego powinowactwa CTLA-4 do CD86, może być prawdopodobnym wyjaśnieniem zaobserwowanego zjawiska wynikającego z wiązania sCTLA-4 do CD86 na komórkach APC u pacjentów z tą postacią SM [5.1.2]. Niezbędne są dalsze badania mające na celu potwierdzenie naszej hipotezy.

Analizując aspekt potencjalnego związku zmienności polimorficznej genów kodujących cząsteczki zaangażowane w aktywację limfocytów T łącznie zbadaliśmy możliwe powiązanie 13 polimorfizmów zlokalizowanych w genach *CTLA-4*, *CD28*, *CD80* i *CD86* z podatnością i/lub przebiegiem klinicznym SM a wyniki opublikowane zostały w serii dwóch artykułów [5.1.4, 5.1.5].

Po pierwsze, w grupie dwustu trzydziestu niespokrewnionych pacjentów zbadano związek pomiędzy polimorfizmami zlokalizowanymi w genie *CTLA-4*: 4 SNP: g.319C>T (rs5742909), c.49A>G (rs231775), CT60 (g. 6230G>A, rs3087243) i Jo31 (g. \* 10223G>T, rs11571302) oraz jednym STR: g.\*642AT(8\_33) i podatnością na MS [5.1.4]. W tym kontekście polimorfizm Jo31 analizowany był po raz pierwszy.

W naszych badaniach wykazano, iż obecność alleli Jo31[G] i CT60[G] predysponuje do SM, a ich obecność w haplocybie: c.49A>G[A]/g.319C>T[C]/g.\*642[(AT)<sub>8</sub>]/CT60[G]/Jo31[G] zwiększała ryzyko choroby 10-krotnie. Analiza tych czynników molekularnych w kontekście potencjalnych interakcji międzygenowych jak i z czynnikami pozagenetycznymi oraz symptomatologia choroby wykazała, iż obecność allelu c.49A>G[A] lub allelu CT60[A] (oba allele znamienne zmniejszają ryzyko chorób autoimmunologicznych) zmniejszyła ryzyko wystąpienia diplopii jako pierwszego objawu choroby. Natomiast allel CT60[A] faworyzował parestezję jako pierwszy symptom SM. Z kolei obecność wariantów polimorficznych CT60[A] i Jo31[T] związana była z pojawieniem się objawów piramidalnych, które opisano jako czynnik predykcyjny złego rokowania, jak i związane były z szybszą progresją choroby (krótszy czas przejścia w SPSM). Podobnie szybsza progresja choroby obserwowana była wśród nosicieli allelu c.49A>G[A]. Podsumowując, niepredysponujące do SM warianty polimorficzne wydają się być markerami złego rokowania - bardziej agresywnego przebiegu choroby [5.1.4]. Wyniki te stanowiły podstawę do bardziej szczegółowej analizy obserwowanych związków w większej grupie pacjentów i w liczniejszej grupie polimorfizmów zlokalizowanych w genach kodujących wszystkie cztery główne cząsteczki szlaku CD28/CTLA-4-CD80/CD86: (*CD28*rs35593994G>A, *CD28*rs3116496T>C, *CTLA-4*g.319C>T (rs5742909C>T), *CTLA-4*c.49A>G (rs231775A>G), Jo31 (*CTLA-4*g.\*10223G>T, rs11571302G>T), *CD80*rs6641T>G, *CD80*rs1599795T>A, *CD80*rs16829980T>C, *CD86*rs2715267T>G, *CD86*rs1129055G>A oraz *CD86*rs17281995G>C), oraz z uwzględnieniem wcześniejszych wyników typowania HLA [5.1.5]. Badania wykazały istotność allelu HLA-DRB1\*15:01. Obserwowano bowiem interakcje tego allelu z polimorfizmem *CTLA-4*c.49A>G - allel [G] występujący w tym miejscu polimorficznym zlokalizowanym w eksonie 1 genu *CTLA-4*, zwiększał ryzyko wystąpienia SM jedynie w grupie pacjentów u których występował allel HLA-DRB1\*15:01. Natomiast w obecnych badaniach nie

potwierdziliśmy wcześniej zaobserwowanych zależności pomiędzy Jo31 i SM. Analiza związku między polimorfizmami zlokalizowanymi w genach kodujących ligandy dla CD28 i CTLA-4, wykazała, że tylko jeden spośród trzech SNP zlokalizowanych w genie *CD80* i jednego z trzech SNP w genie *CD86* wiązały się z ryzykiem SM. Ponadto, zauważone przez nas ryzyko dotyczące polimorfizmu zlokalizowanego w genie *CD80* było niezależne od obecności allelu HLA-DRB1\*15:01. Po przeprowadzeniu analizy na poziomie haplotypowym, haplotyp składający się z wariantu [T] na wszystkich trzech badanych SNPach *CD80* był prawie o 10% częstszy wśród pacjentów, natomiast w przypadku haplotypu zawierającego wariant [T] na wszystkich trzech badanych SNPach *CD86* obserwowano odwrotną zależność.

Analiza interakcji badanych SNP z parametrami klinicznymi SM, takimi jak płeć, wiek zachorowania, czas trwania RRSM, EDSS i MSSS nie wykazały zależności między badanymi parametrami, z wyjątkiem istniejącego oddziaływania trzech SNP: *CD28rs3116496T>C*, *CD80rs6641T>G* i *CD86rs17281995G>C* z wiekiem zachorowania.

Biologiczna funkcja badanego przez nas po raz pierwszy w SM polimorfizmu *CD80rs1599795T>A* nie jest udokumentowana, jednakże badania *in silico* wykazały jego możliwy wpływ na poziom ekspresji genu, ze względu na jego lokalizację w przypuszczalnym miejscu wiązania miRNA. Konieczne jest określenie czynników transkrypcyjnych, które wiążą się z *locus*, gdzie znajduje się *CD86rs2715267T>G*, i aby ustalić, czy ten polimorfizm przyczynia się do zwiększenia lub zmniejszenia ekspresji *CD86*. Podsumowując wyniki nasze wskazują, iż zmienność genetyczna w obrębie genów kodujących cząsteczki należące do szlaku *CD28/CTLA-4-CD80/CD86* może wpływać nie tylko na ryzyko SM, ale także na wiek zachorowania. Jednakże, dalsze badania dotyczące mechanizmu, w którym te polimorfizmy mogą wiązać się z podatnością i wiekiem zachorowania na MS jak również ustalenie ostatecznej roli allelu HLA-DRB1\*15:01 są niezbędne.

Poddaliśmy również ocenie funkcjonalny aspekt badanych polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w CTLA-4 w kontekście patomechanizmu SM [5.1.4.]. Ponieważ obecność wariantów genetycznych Jo31[T] i CT60[A] wiąże się z istotnie wyższym poziomem całkowitej ekspresji CTLA-4 (wyrażonej przez MFI) w porównaniu do genotypów typu „dzikiego” [GG], wydaje się, że to nie predysponujące do SM allele wykazywać mogą większą aktywność hamowania. Warto jednak zauważyć, że szybsza progresja SM (przejście z RR do SP) u pacjentów z allelami Jo31[T] i CT60[A] towarzyszyła stopniowo zmniejszająca się subpopulacja limfocytów T CTLA-4+/CD4+ posiadających potencjał do zakończenia bieżącej odpowiedzi immunologicznej. Wydaje się więc prawdopodobne, że allele CT60[A] i Jo31[T], mimo że nie są predysponujące do SM, predysponują do bardziej agresywnego przebiegu choroby. Ponadto, może się wydawać, że dynamika SM zależy od wielkości populacji komórek T CD4+ ekspresjonujących CTLA-4, a nie jej gęstości w pojedynczej komórce. Ponadto predysponujące do wcześniejszej progresji allele zawierające 8 powtórzeń AT w miejscu polimorficznym g.\*642AT(8\_33) wiązały się jedynie z mniejszymi proporcjami komórek mCTLA-4+/CD4+ i cCTLA-4+/CD4+. Tak więc przypuszczamy, że różnice w MFI wywołane

cechami polimorficznymi są związane z predyspozycją do choroby, a różnice w liczbie komórek są związane z postępowaniem choroby.

Dlatego też, ponieważ polimorfizmy zlokalizowane w regionie 3'UTR genu *CTLA-4* wpływają na populację komórek ekspresjonujących *CTLA-4* w trakcie progresji choroby (wyrażonej przejściem w SPSM), prawdopodobny związek zmienności polimorficznej *CTLA-4* z jego zaburzoną ekspresją, a tym samym z upośledzeniem funkcji limfocytów T może zachodzić w SM. Niedostateczna supresja odpowiedzi limfocytów T u pacjentów z SPSM, przynajmniej u osób posiadających niepredysponujące do SM allele, a w konsekwencji do wcześniejszego progresji choroby, może być ważnym elementem w patomechanizmie SM, jednakże na tym etapie naszych badań niezbędna jest dalsza ich kontynuacja mająca na celu dokładne zbadanie natury naszych obserwacji.

#### Immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej w chorobie Gravesa i Basedowa

Choroba Gravesa i Basedowa (ChGB), podobnie jak inne schorzenia autoimmunologiczne, należy do chorób złożonych, których etiologia wiąże się z interakcją czynników genetycznych i środowiskowych, przy czym szacowany wpływ uwarunkowań genetycznych na rozwój choroby wynosi około 80%. Tak więc zidentyfikowanie czynników związanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia tej choroby może zwiększyć szansę na opracowanie nowych paneli diagnostycznych oraz może posłużyć do opracowania nowych strategii terapeutycznych. Podstawą badań, był fakt, iż w przebiegu ChGB obserwuje się upośledzenie nadzoru immunologicznego przejawiające się obniżeniem liczby i aktywności limfocytów supresorowych, które w warunkach fizjologicznych zdolne są do identyfikacji i niszczenia autoreaktywnych klonów limfocytów T pomocniczych, skierowanych przeciwko strukturom antygenowym komórek pęcherzykowych tarczycy.

Wyniki badań uwzględniające analizę polimorfizmów zlokalizowanych w genie *CTLA-4*: g.319C>T (rs5742909), c.49A>G (rs231775), CT60 (*CTLA-4*g.\*6230G>A, rs3087243), Jo31 (*CTLA-4*g.\*10223G>T, rs11571302) oraz g.\*642AT(8\_33), wskazały region 3'UTR genu, gdzie zlokalizowany jest polimorfizm CT60, jako potencjalny marker choroby [5.1.6.]. Badania nasze wykazały, że zmienność polimorficzna genów *CD28*, *CTLA-4* oraz *ICOS* związana jest nie tylko z ryzykiem, ale i przebiegiem klinicznym choroby Gravesa i Basedowa (ChGB) lecz również z odpowiedzią na leczenie tyreostatyczne [5.1.6., 5.1.7.]. Co istotne, zaobserwowano różną predyspozycję genetyczną w zależności od płci pacjentów oraz rodzinnego obciążenia chorobami tarczycy. Ponadto wykazano związek pomiędzy badanymi czynnikami genetycznymi a odpowiedzią na leczenie, co wskazuje na istotną rolę personalizacji terapii, uwzględniającej profil genetyczny pacjenta, co wpłynąć może na podniesienie skuteczności terapii ChGB.

Ponadto, wykazaliśmy potencjalne znaczenie sCTLA-4 jako potencjalnego biochemicznego parametru korelując jego stężenia w surowicy pacjentów z różnym nasileniem OT z ciężkością orbitopatii tarczycowej [5.1.6.], i wykazaliśmy iż zarówno poziom jak i odsetek pacjentów u których obserwowano podwyższone stężenie sCTLA-4 był najwyższy w grupie o najcięższym przebiegu wymagającym leczenia immunosupresyjnego (ciężka OT). Nie obserwowaliśmy natomiast związku

sCTLA-4 z parametrami funkcji tarczycy, obwodowym stężeniem hormonów tarczycy fT3 i fT4, TSH, przeciwciałami tarczycowymi: anty-TPO i anty-Tg jak i nikotynizmem ani płcią pacjentów.

Co istotne, wykazaliśmy ścisłą zależność pomiędzy polimorfizmami CT60 oraz Jo31, zlokalizowanymi w regionie 3'UTR genu *CTLA-4*, a stężeniem sCTLA-4, wskazując, iż zdolność do produkcji sCTLA-4 w przebiegu ChGB zależy może od uposażenia genetycznego [5.1.7.].

Podsumowując, z uwagi na fakt iż podwyższone stężenie powstającej w procesie alternatywnego składania mRNA *CTLA-4* rozpuszczalnej izoformy w surowicach pacjentów ze schorzeniami autoimmunizacyjnymi wydaje się być konstytutywne, wskazać może na immunoregulującą funkcję tego białka, co zostało szczegółowo omówione w opublikowanej przez nas pracy poglądowej. Tak więc, nieprawidłowa, podwyższona ekspresja rozpuszczalnej izoformy CTLA-4, który konkurując o ligandy z izoformą zakotwiczoną w błonie limfocytów T powodować może zaburzenia w homeostazie - nieefektywną supresją aktywacji limfocytów T przez antygen CTLA-4 ulegający ekspresji na powierzchni tych komórek.

Podsumowując można postawić hipotezę, że poziom sCTLA-4 pozostaje pod kontrolą nadzoru genetycznego, a osoby predysponowane genetycznie (będące nosicielami wariantów genetycznych związanych z chorobami autoimmunologicznymi) są większymi producentami sCTLA-4. Tak więc, sCTLA-4 może być rozważany jako potencjalny biomarker o znaczeniu diagnostycznym oraz rokowniczym. Ponadto potencjalną istotną implikacją kliniczną może być wykorzystanie poziomu sCTLA-4 w połączeniu z profilem genetycznym w zakresie polimorfizmów CT60 oraz Jo31 zlokalizowanych w regionie 3'UTR genu *CTLA-4*, w personalizowanej celowanej immunoterapii.

#### Immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej w chorobach nowotworowych

Badania dotyczące asocjacji zmienności genetycznej w chorobach nowotworowych oparliśmy na hipotezie współdziedziczenia wielu wariantów niskiego ryzyka (ang. *low-risk variants*), gdyż pomimo dynamicznych badań w zakresie molekularnego podłoża tych chorób dotychczas nie zidentyfikowano regionu chromosomu/genu bezpośrednio predysponującego do choroby (ang. *major disease-causing locus*). Hipotezę tę potwierdzają wyniki licznych badań genetycznych przeprowadzonych wśród niespokrewnionych chorych, które wskazały na poligeniczność chorób nowotworowych.

Upośledzony nadzór immunologiczny prowadzący do rozwoju procesów nowotworowych powodowany może być zaburzoną ekspresją cząsteczek zaangażowanych w aktywację i regulację aktywacji limfocytów. Z kolei liczne doniesienia literaturowe wskazują, iż nieprawidłowości ekspresji powodowane mogą być przez polimorfizm w genach kodujących te cząsteczki.

#### Immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej w nowotworach hematologicznych

Polimorficzne warianty *CTLA-4g.319C>T[T]* oraz *CD28c.17+3T>C[C]* zwiększały ryzyko wystąpienia B-CLL [5.1.8.], ale nie MM [5.1.10., 5.1.11.]. Z kolei nie związany z B-CLL dziki wariant *CTLA-4c.49A>G[G]* zwiększał ryzyko wystąpienia szpiczaka mnogiego. Ponadto obecność allelu [G] w miejscach polimorficznych CT60 oraz Jo31, zlokalizowanych w regionie 3'UTR genu

*CTLA-4*, również zwiększała ryzyko wystąpienia szpiczaka mnogiego. Biorąc pod uwagę wszystkie badane polimorfizmy zlokalizowane w genie *CTLA-4*, analiza na poziomie haplotypów, uwzględniająca interakcję pomiędzy analizowanymi polimorfizmami genu *CTLA-4*, wskazała iż haplotyp c.49A>G[G]/g.319C>T[C]/ g.\*642AT(8\_33)[(AT)<sub>8</sub>]/CT60[G]/Jo31[G] prawie 4-krotnie zwiększał ryzyko MM.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazały również, iż polimorfizm c.1554+4GT(8\_15) zlokalizowany w genie *ICOS*, istotnie związany był z ryzykiem wystąpienia B-CLL [5.1.8.]. Ponadto polimorficzny wariant *CTLA-4*g.319C>T[T], którego obecność związana jest z wyższą aktywnością promotora i z wyższą ekspresją powierzchniową cząsteczki *CTLA-4*, oraz *CD28*c.17+3T>C[C], wskazane jako markery B-CLL, mogą również być rozpatrywane jako markery progresji choroby wyrażonej przejściem do wyższego stadium zaawansowania klinicznego w/g Rai w czasie 24 miesięcznej obserwacji [5.1.8.]. Obserwacje te potwierdzone również zostały w analizie wieloczynnikowej.

Z uwagi na fakt, iż podobnie jak *CTLA-4*, również *BTLA* (ang. *B and T lymphocyte attenuator*) jest istotnym supresorowym immunologicznym punktem kontrolnym analizowaliśmy zaangażowanie tej cząsteczki w patomechanizm B-CLL [5.1.9.]. W oparciu o dane literaturowe, analizę *in silico* oraz kalkulację dla populacji środkowoeuropejskiej w kierunku określenia polimorfizmów tagSNP (etykietowych, flagowych) spośród finalnie wyselekcjonowanych do badań 10 polimorfizmów 3: rs1982809, rs2705511 i rs9288953 związane były z ryzykiem wystąpienia B-CLL.

Obecność wariantów polimorficznych rs1982809A>G[G] oraz rs2705511A>C[C] zwiększała ryzyko B-CLL, natomiast w przypadku polimorfizmu rs9288953C>T związek ten zależny był od „dawki” allelu. Żaden z analizowanych 10 polimorfizmów nie był związany z przebiegiem klinicznym choroby.

Wykazaliśmy ponadto, iż warianty polimorficzne związane z ryzykiem B-CLL: rs1982809A>G[G] oraz rs2705511A>C[C] związane były z poziomem ekspresji mRNA *BTLA* jedynie w limfocytach T. Jednoczesna obecność obu predysponujących do choroby wariantów polimorficznych związana była z niższą ekspresją mRNA *BTLA* obserwowaną w limfocytach T pacjentów [5.1.9.]. Podsumowując obserwacje nasze wskazują, iż zarówno *CTLA-4* jak i *BTLA*, mogą być potencjalnymi użytecznymi markerami molekularnymi B-CLL.

*Immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej w nowotworach nie-hematologicznych*

Rak płuca jest najpowszechniej występującym nowotworem złośliwym na świecie, a standardowymi metodami terapeutycznymi są zabiegi chirurgiczne, radioterapia, klasyczne chemioterapeutyki oraz terapie celowane, natomiast immunoterapia mająca na celu indukcję celowanej odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko konkretnym molekułom, dotychczas stosowana jest dopiero w zaawansowanych stanach choroby.



Ponieważ rak płuc jest jednym z nowotworów o najwyższym odsetku umieralności zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn na całym świecie, w związku z tym, określenie czynników genetycznych, które mają wpływ na podatność na ten nowotwór, zwłaszcza najczęściej występujący niedrobnokomórkowy rak płuca jest niezmiernie istotne dla wczesnego wykrywania, monitorowania i określania grup ryzyka rozwoju choroby. Podobnie jak w innych nowotworach, etiopatogeneza NSCLC opiera się na złożonej sieci interakcji czynników genetycznych i środowiskowych, a wśród czynników genetycznych geny kodujące cząsteczki immunologicznych punktów kontrolnych odpowiedzialne za aktywację i regulację odpowiedzi immunologicznej są idealnymi genami „kandydującymi”. Dlatego podjęliśmy badania mające na celu określenie związku nie tylko czynników genetycznych: zmienności polimorficznej regionu chromosomu 2q33, gdzie zlokalizowane są geny *CD28/CTLA-4/ICOS* ale także środowiskowych, oraz ich interakcji z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem klinicznym NSCLC [5.1.12.].

Związek zmienności polimorficznej genów *CD28/CTLA-4/ICOS* z NSCLC zaobserwowano jedynie wśród kobiet, gdzie zarówno *CTLA-4c.49A>G[A]* allel jak i genotyp [AA], jak również obecność rzadkiego wariantu *CTLA-4g.319C>T[T]* predysponowały kobiety do choroby.

Analizując region chromosomu 2q33, gdzie zlokalizowane są trzy analizowane geny jako *locus*, wykazaliśmy istotne zależności pomiędzy poszczególnymi haplotypami. Haplotyp *CTLA-4c.49A>G[A]/Jo31[G]/CD28c.17+3T>C[T]/ICOSc.1554+4GT(8\_15)[>10]* istotnie zwiększał ryzyko choroby. Ponadto allele te wraz z płcią męską były niezależnymi czynnikami ryzyka NSCLC, a obecność ich wraz z wariantem *CTLA-4g.319C>T[T]* oraz paleniem tytoniu związana była z mniejszym całkowitym przeżyciem.

Znaczenie zmienności polimorficznej genów kodujących immunologiczne punkty kontrolne odpowiedzi immunologicznej analizowana była również w przypadku nowotworów swoicie związanych z płcią: rakiem szyjki macicy i rakiem stercza, i opublikowane zostało w serii 3 publikacji [5.1.12.-5.1.15.].

Ponieważ w dalszym ciągu rak szyjki macicy, w tym najczęstszy typ histologiczny - płaskonabłonkowy (*ang. cervical squamous cell carcinoma, CSCC*), stanowi poważny problem zdrowotny i społeczny, a w Polsce jest on drugim pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet do 45 roku życia, określenie użytecznych markerów diagnostycznych jak i rokowniczych jest niezwykle istotne dla wczesnego wykrywania oraz monitorowania jak i personalizacji terapii.

Jakkolwiek podstawowym czynnikiem etiologicznym rozwoju raka szyjki macicy jest przetrwała infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego (*ang. human papilloma virus, HPV*), to jednakże jest to czynnik niewystarczający do wystąpienia nowotworu i inne dodatkowe czynniki mogą również wpływać na ryzyko zachorowania na ten nowotwór, w tym czynniki odpowiedzialne za regulację odpowiedzi immunologicznej. Ze względu na kluczową rolę cząsteczek CD28, CTLA-4 i ICOS w aktywacji i regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz fakt iż zaburzenia ich ekspresji i/lub funkcji

wynikać mogą z obecności konkretnych polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w genach kodujących te cząsteczki, tak więc polimorfizmy zlokalizowane w tych 3 kluczowych dla procesu aktywacji limfocytów T genach, analizowane były jako potencjalne czynniki związane z ryzykiem i przebiegiem klinicznym CSCC [5.1.13, 5.1.14.].

Nasze badania wykazały, iż jedynie zmienność polimorficzna genu *CTLA-4* może być czynnikiem ryzyka CSCC, podczas gdy poza polimorfizmem *CTLA-4g.319C>T* również polimorfizm *CD28c.17+3T>C* związany był z przebiegiem klinicznym choroby.

Wykazaliśmy, iż obecność polimorficznego allelu *CTLA-4g.319C>T[T]* związanego z wyższą ekspresją białka CTLA-4 i zwiększonym hamowaniem aktywacji limfocytów T, istotnie zwiększał ryzyko wystąpienia CSCC. Co więcej, ten wariant genetyczny korelował ze stopniem zróżnicowania CSCC wprost proporcjonalnie do stopnia zróżnicowania. Również polimorfizm mikrosatelitarny *CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*, w szczególności allele zawierające 8 powtórzeń AT, opisywane w literaturze jako związane z większą stabilnością mRNA i większą ekspresją cząsteczki CTLA-4, zwiększały jedynie ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy.

Jakkolwiek polimorfizm *CD28c.17+3T>C* nie był związany z ryzykiem wystąpienia CSCC, jednak analiza związku w zależności od stopnia histopatologicznego guza wykazała, że allel C (genotyp [CC]+[CT]) występuje znamiennej częściej u chorych z dobrze zróżnicowanym rakiem.

Reasumując, zmienność polimorficzna w regionie promotorowym i 3'UTR genu *CTLA-4* może być genetycznym czynnikiem zwiększającym ryzyko CSCC, nowotworów wysoko zróżnicowanych, natomiast związek między polimorfizmem *CD28c.17+3T>C* jest ograniczony tylko do wysoko zróżnicowanych CSCC.

Z kolei wśród mężczyzn na całym świecie rak gruczołu krokowego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów, zwłaszcza w krajach zachodnich i azjatyckich, i jest jedną z najczęstszych przyczyn śmiertelności i zachorowalności. Podobnie jak w innych nowotworach, pomimo iż patomechanizm PCa nadal nie jest w pełni zbadany, zakłada się zaangażowanie zarówno czynników genetycznych jak i środowiskowych. Liczne badania epidemiologiczne wykazały rolę genów niskiego ryzyka, identyfikując 77 loci związanych z podatnością na PCa, co z kolei wyjaśnia około 30% rodzinne występowanie tego nowotworu. Pomimo znaczącej liczby badań dotyczących określenia genetycznych czynników ryzyka PCa, liczba zidentyfikowanych genów predysponujących jest ograniczona i obejmuje, między innymi, geny zaangażowane w aktywację i regulację odpowiedzi immunologicznej. Analizowaliśmy więc związek funkcjonalnych polimorfizmów zlokalizowanych w genach *CTLA-4* oraz *CD28* z ryzykiem i przebiegiem klinicznym PCa.

Pomimo, iż zarówno analiza jednoczynnikowa jak i haplotypowa, nie wykazały istotnego związku badanych polimorfizmów zlokalizowanych w genach *CTLA-4* oraz *CD28* z ryzykiem i przebiegiem klinicznym PCa, to jednakże allel *CTLA-4c.49A>G[A]* i *CTLA-4g.319C>T[T]* występował częściej w grupie pacjentów [5.1.15.].

Podsumowując, obserwacje nasze nie wykluczają roli funkcjonalnych polimorfizmów zlokalizowanych w genie *CTLA-4* związanych w poziomem ekspresji białka na powierzchni komórki, i w konsekwencji pogorszeniem jej funkcji, w patomechanizmie PCa i wskazują potrzebę dalszych badań w innych populacjach i większych grupach pacjentów do ostatecznego wyjaśnienia ich roli w patogenezie PCa.

***Ad. 5.2. Czynniki immunogenetyczne w odniesieniu do ryzyka zachorowania, przebiegu i symptomatologii schizofrenii***

Patomechanizm schizofrenii, przewlekłego zaburzenia psychicznego o zróżnicowanym przebiegu klinicznym i obrazie psychopatologicznym, nie został w pełni poznany. Wskazuje się jednakże na udział czynników genetycznych i środowiskowych w ryzyku zachorowania oraz kształtowaniu fenotypu tej choroby, a w szczególności na istotną rolę dysregulacji układu odpornościowego w rozwoju tego zaburzenia psychicznego. Krytyczną rolę w procesie aktywacji limfocytów T przypisuje się cząsteczkom ko-sygnalowym: ko-stymulującej CD28 oraz supresorowej CTLA-4. Związanie się cząsteczki ko-stymulującej CD28 z ligandem prowadzi do pełnej aktywacji, proliferacji limfocytów T i wydzielania cytokin tj.: interleukin (m.in. IL-2, IL-4, IL-8, IL-13) oraz interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). W wyniku aktywacji limfocytów T pojawia się na ich powierzchni cząsteczka supresorowa CTLA-4 hamująca odpowiedź immunologiczną poprzez zmniejszenie wydzielania cytokin, oraz hamowanie proliferacji limfocytów T.

Cytokiny, białka regulujące reakcję odpornościową organizmu, mogą zarówno przedostawać się przez barierę krew-mózg, jak i

mogą być produkowane wewnątrztekalnie przez komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Cytokiny biorą udział w rozwoju OUN, pełnią funkcję neurotransmiterów, oraz warunkują prawidłowy przebieg funkcji poznawczych. Działania te mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na ryzyko zachorowania na schizofrenię lub jej przebieg kliniczny.

W naszych badaniach przeprowadziliśmy analizę polimorfizmów wybranych genów kodujących cząsteczki zaangażowane w regulację i przebieg odpowiedzi immunologicznej oraz ich wpływ na ryzyko i symptomatologię schizofrenii.

*Związek między polimorfizmami genów cytokin i genów kodujących cząsteczki zaangażowane w regulację aktywności limfocytów T i objawami psychopatologicznymi*

Do badań wybrano polimorfizmy funkcjonalne zlokalizowane w genach kodujących cytokiny: *IL2-330T>G* (rs2069756), *IL6-174G>C* (rs1800795), *IFNG+874T>A* (rs2430561) oraz po raz pierwszy *TGFBI+916G>C* (rs1800471) [5.2.1.], jak również polimorfizmy w genach kodujących ko-receptory CD28 (*CD28c.17+3T>C*, rs3116496) i CTLA-4 (*CTLA-4g.\*642AT(8\_33)*, *CTLA-4c.49A>G* (rs231775), *CTLA-4g.319C>T* (rs5742909) i CT60 (*CTLA-4g.\*6230G>A*, rs3087243) [5.2.2.]

Spośród wyselekcjonowanych do badań miejsc polimorficznych, dwa *TGFBI+869T>C* (rs1800470, c.29C>T) [5.2.1.] oraz *CD28c.17+3T>C* (rs3116496) [5.2.2.] istotnie zwiększały ryzyko wystąpienia schizofrenii, co wykazane zostało przez nas po raz pierwszy. Analiza związku

polimorfizmów genów kodujących cytokiny (*IL6* i *TGFBI*) oraz genów kodujących cząsteczki ko-sygnalowe (*CD28* i *CTLA4*) z wiekiem zachorowania, przebiegiem i profilem objawów klinicznych schizofrenii [5.2.3.-5.2.5.] wykazała brak związku pomiędzy nasileniem objawów klinicznych schizofrenii w ciągu życia a polimorfizmami *IL6-174G>C* (rs1800795) [5.2.4.], *TGFBI: +869T>C* oraz *+916G>C* (rs1800471) [5.2.3.]. Natomiast u kobiet polimorfizm *TGFBI+869T>C* związany był z wiekiem zachorowania. Ponadto współwystępowanie objawów afektywnych i psychotycznych w przebiegu schizofrenii związane było z polimorfizmami *CTLA-4c.49A>G* (rs231775) oraz *CTLA-4g.319C>T* (rs5742909) oraz *CD28c.17+3T>C*, rs3116496) [5.2.5.].

Co istotne wykazaliśmy związek polimorfizmów zlokalizowanych w genach kodujących cytokiny na zaburzenia funkcji poznawczych [5.2.3., 5.2.4.]. Obecność allelu T (genotypy [TT] i [CT]) w miejscu polimorficznym *+869T>C* genu *TGFBI* była związana z mniejszą szybkością psycho-motoryczną i fluencją słowną w porównaniu do chorych z genotypem [CC]. Natomiast, polimorfizm *IL6-174G>C* nie był związany z poziomem funkcjonowania poznawczego u chorych na schizofrenię.

Ponadto, wykazaliśmy iż polimorfizm *TGFBI+869T>C* może być rozważany jako predyktor wystąpienia psychozy u kobiet [5.2.3.].

#### *Związek pomiędzy poziomem cytokin w surowicach a objawami psychopatologicznymi*

Analiza wpływu stężenia cytokin: TGF- $\beta$  [5.2.3.] ani IL-6 [5.2.4.] oraz białka C-reaktywnego (CRP) na profil objawów klinicznych obserwowanych w obecnym epizodzie choroby (ang. *current symptomatology*) nie wykazała ich związku z nasileniem objawów psychopatologicznych. Natomiast wyższe stężenie IL-6 w surowicy krwi związane było z dłuższym czasem trwania choroby oraz powolnym narastaniem objawów przy zachorowaniu i przewlekłym przebiegiem choroby ze stopniową deterioracją - negatywnymi czynnikami prognostycznymi [5.2.4.].

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wydają się potwierdzać neuroimmunologiczną hipotezę rozwoju schizofrenii, tak więc użytecznymi biomarkerami złego rokowania mogą być parametry układu odpornościowego.

#### ***Ad. 5.3. Związek zmienności polimorficznej genów HLA-G, LILRB1 i KIR2DL4, poziomu ekspresji cząsteczek kodowanych przez te geny z ryzykiem oraz przebiegiem klinicznym NSCLC***

Spośród wielu cząsteczek zaangażowanych w mechanizm ucieczki nowotworu spod nadzoru gospodarza szczególną rolę odgrywa nieklasyczna cząsteczka głównego układu zgodności tkankowej (MHC) – HLA-G odgrywająca kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu tolerancji immunologicznej dzięki hamowaniu limfocytów T i B, komórek naturalnie zabijających (ang. *natural killers*, NK) oraz komórek APC w wyniku bezpośredniego wiązania HLA-G (ligandu) do receptorów hamujących: LILRB1 (ILT2/CD85j, występujący na komórkach limfoidalnych i mieloidalnych), LILRB2 (ILT4/CD85d, obecny na komórkach dendrytycznych, makrofagach i monocytach), oraz KIR2DL4 (p49/CD158d, na komórkach NK i subpopulacji limfocytów T). LILRB1 wywiera dwojaki efekt: zarówno hamujący (w większości układów doświadczalnych) jak i aktywujący.

Geny kodujące HLA-G, LILRB1 i KIR2DL4 są polimorficzne (choć w znacznie mniejszym stopniu niż klasyczne geny HLA) i zmienność ta związana jest z różnym poziomem ekspresji tych cząsteczek na powierzchni komórek i w osoczu, co w konsekwencji może być związane z podatnością na wiele chorób, w tym raka płuca.

Podstawą naszych badań była zaobserwowana przez innych badaczy nieprawidłowa ekspresja HLA-G w NSCLC umożliwiającą komórkom nowotworowym ucieczkę spod nadzoru immunologicznego. Bezpośrednim celem pracy 5.3.1. [IF:2,046; MNiSW/KBN:20,000] było: 1) zbadanie związku polimorfizmów zlokalizowanych w genach *HLA-G*, *LILRB1* i *KIR2DL4* z ryzykiem i, przebiegiem klinicznym NSCLC oraz odpowiedzią na leczenie; 2) porównanie ekspresji błonowego HLA-G, LILRB1 i KIR2DL4 w preparatach NSCLC i zdrowej tkanki płucnej oraz 3) zbadanie wpływu polimorfizmu genu *HLA-G* na poziom ekspresji białka zakotwiczonego w błonie komórkowej.

Spośród wyselekcjonowanych do badań polimorfizmów zlokalizowanych w genach: *HLA-G*: - 964A>G (rs1632947), -725C>G>T (rs1233334), -716T>G (rs2249863) w regionie promotorowym genu i polimorfizmu ins/del (14 bp) w regionie 3'UTR, *LILRB1*: - 5651G>A (rs41308748) w intronie 14, 5717C>T (L622L, rs1061684), 5724G>A (E625K, rs16985478), 5774C>A (P641P, rs41548213) w eksonie 15 oraz *KIR2DL4*: 5806C>T (rs8101240) w 3'UTR - jak również 9620 9A/10A (rs11410751) w eksonie 7 jedynie polimorfizmy *HLA-G*-964A>G oraz *LILRB1*5724G>A związane były z ryzykiem NSCLC. Wykazaliśmy, iż polimorficzny wariant *HLA-G*-964A>G[GG] predysponował do wystąpienia choroby, natomiast obecność polimorficznego allelu *LILRB1*5724G>A[A] (genotyp [AA]+[GA]) było czynnikiem chroniącym przed NSCLC. Natomiast obserwowana słaba zależność polimorfizmu *HLA-G*-716T>G wynika prawdopodobnie z silnej zależności LD względem *HLA-G*-964A>G.

Co ciekawe, *LILRB1*5724G>A, w przeciwieństwie do pozostałych badanych polimorfizmów istotnie związany był z naciekaniem regionalnych węzłów chłonnych przez komórki nowotworowe: szansa znalezienia komórek nowotworowych w węzłach chłonnych zmniejszyła się czterokrotnie z zależności od „dawki” allelu *LILRB1*5724G>A[A]. Obserwacja ta była niezależna od wieku pacjenta, płci, palenia tytoniu jak i rozmiaru guza pierwotnego.

Ekspresję HLA-G obserwowano u 60,8%, natomiast LILRB1 u 51,5% pacjentów. Ko-ekspresję HLA-G i LILRB1 obserwowano u 31,5% pacjentów, przy czym 18,0% próbek były negatywne dla obu antygenów; u 25,8% pacjentów odnotowano ekspresję antygenów HLA-G, ale nie LILRB1 w guzie, a u 24,7% w przeliczeniu na LILRB1 ale nie HLA-G. Ponadto, poziom ekspresji HLA-G i LILRB1 był wprost proporcjonalny do stopnia złośliwości guza.

Jakkolwiek warianty polimorficzne *HLA-G*-964A>G[A] i *HLA-G*-716T>G[G], będące w silnym LD, związane były z nieco wyższą ekspresją HLA-G w tkance nowotworowej, to jednakże obserwacja ta była nieistotna statystycznie.

Podsumowując, nasze wyniki sugerują, że podatność na NSCLC może zależeć od polimorfizmu *HLA-G*-964A>G oraz *LILRB1*5724G>A. Ponadto, po raz pierwszy wykazaliśmy, że

ekspresja zarówno HLA-G jak i LILRB1 w NSCLC jest niezależna od kontroli genetycznej. Nasze dane potwierdzają tezę, że poziom ekspresji HLA-G w mikrośrodowisku nowotworowym może być użytecznym biomarkerem diagnostycznym i/lub prognostycznym w NSCLC, a LILRB1 może być dodatkowym markerem. W świetle powyższych informacji, wysunięto hipotezę, że te cząsteczki mogą być użytecznymi celami terapeutycznymi w leczeniu NSCLC.

#### ***Ad. 5.4. Zmienność polimorficzna genu naprawy DNA ERCC4 w płaskonabłonkowym raku szyjki macicy***

Udokumentowano, iż proces karcinogenezy jest zależny m.in. od poprawnego działania mechanizmów regulacji cyklu komórkowego, którego błędna regulacja powodowana może być mutacjami bądź polimorfizmami w genach naprawy DNA, co z kolei prowadzić może do nieprawidłowego odczytu błędów w genomie, a tym samym do nagromadzenia się takich nieprawidłowości i w konsekwencji do rozwoju nowotworu. Ponadto, mechanizmy naprawcze, oprócz naprawy DNA mogą także wywołać odpowiedź komórkową – odpowiedź na uszkodzenia DNA. Wysoka polimorficzność genów kodujących molekuły systemu naprawy uszkodzeń DNA wpływać może na ich funkcję i/lub ekspresję, co w konsekwencji prowadzić może do zaburzeń naprawy DNA, a akumulacja powstałych uszkodzeń w konsekwencji zwiększać może ryzyko wystąpienia procesów karcynogennych. Mimo, iż w genach zaangażowanych w utrzymanie integralności genomu zostało zidentyfikowanych wiele miejsc polimorficznych, dla wielu spośród nich nadal nie został określony związek z ryzykiem wystąpienia nowotworów lub innych chorób oraz ich wpływ na ekspresję i funkcję białek kodowanych przez geny w których zlokalizowane są te polimorfizmy. Z szeregu cząsteczek zaangażowanych w procesy naprawy DNA skupiliśmy naszą uwagę na cząsteczce XPF, kodowanej przez gen *ERCC4*, która wraz z molekułą *ERCC1* tworzy *ERCC1-XPF* 5'endonukleazę, która w mechanizmie naprawy DNA – NER jest odpowiedzialna za przecięcie nici DNA po obu stronach uszkodzenia. Ponadto odpowiedzialne jest za usuwanie fotoproduktów powstałych w wyniku promieniowania UV-C.

W badaniach przeprowadzonych pracy 5.4.1. dyskutowany był związek dwóch polimorfizmów genu *ERCC4*: rs3136176 oraz rs1799798 z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem klinicznym CSCC. Do badań wybrano reprezentatywne polimorfizmy „tagSNP”, zwane etykietowymi, bądź flagowymi, których wybór minimalizuje zestaw badanych SNP niezbędnych do scharakteryzowania najczęściej występujących haplotypów. Pozwala to na zmniejszenie liczby genotypowań poprzez eliminację SNP będących w silnym LD w danej populacji. Wyselekcjonowane polimorfizmy były nie tylko czynnikami ryzyka CSCC, ale także czynnikami modulującymi przebieg kliniczny choroby. Obecność adeniny w miejscu polimorficznym rs3136176 zlokalizowanym w intronie 9 genu jest nie tylko czynnikiem protekcyjnym przeciwko CSCC i może być markerem dobrego rokowania. Słabszą zależność obserwowano w przypadku polimorfizmu rs1799798. Uzyskane wyniki wskazują potrzebę dalszych badań zmienności polimorficznej genu *ERCC4*, która pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie ich klinicznej wartości jako czynników ryzyka i przebiegu klinicznego CSCC. Podobnie

niezbędne są badania mające na celu określenie biologicznej funkcji analizowanych miejsc polimorficznych. Zlokalizowane są w intronie 9 (rs3136176) oraz intronie 1 (rs1799798), i związane mogą być z efektywnością transkrypcji lub/i procesem alternatywnego składania mRNA.

***Ad. 5.5. Zmienność polimorficzna genu kodującego cząsteczkę supresorową CTLA-4 w allogenicznych transplantacjach komórek krwiotwórczych (HSCT) oraz wpływ polimorfizmów genu CTLA-4 na poziom mRNA i ekspresję białka u pacjentów po HSCT***

Przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), stanowiące ważną metodę leczenia pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego, niewydolnością szpiku i wadami komórek krwiotwórczych, umożliwia stosowanie leczenia w dawkach mieloablacyjnych (kilkakrotnie większych niż stosowane rutynowo), co pozwala na znaczną intensyfikację terapii. Procedura HSCT zróżnicowana jest od szeregu kryteriów, między innymi od typu dawcy, źródła wykorzystywanych komórek macierzystych oraz rodzaju postępowania przygotowawczego, i związana jest z licznymi powikłaniami, przy czym do najgroźniejszych należy choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (GvH).

Wystąpieniu choroby, związanej z rozpoznaniem alloantygenów gospodarza przez dojrzałe immunokompetentne limfocyty T dawcy, towarzyszy ekspansja limfocytów cytotoksycznych oraz komórek NK, zwiększona produkcja cytokin, zwiększona ekspresja molekuł adhezyjnych i cząsteczek ko-stymulujących odpowiedź immunologiczną. Etap aktywacji limfocytów T jest elementem kluczowym dla rozwoju i hamowania reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi, a supresorowa cząsteczka CTLA-4, hamująca proliferację komórek Th1 i Th2, zwiększająca odsetek aktywowanych limfocytów T wchodzących na drogę apoptozy, zaangażowana jest w utrzymanie tolerancji w stosunku do alloantygenów. Tak więc, etap aktywacji limfocytów T jest elementem kluczowym dla rozwoju i hamowania reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi, ponieważ homeostaza sygnałów stymulujących i hamujących aktywację limfocytów T, ma zasadnicze znaczenie dla maksymalizacji ochronnej odpowiedzi immunologicznej przy jednoczesnym zachowaniu tolerancji immunologicznej zapobiega autoimmunizacji. CTLA-4 jest zaangażowane w utrzymanie tolerancji w stosunku do alloantygenów. Wybór CTLA-4 jako celu naszych badań oparliśmy na licznych dostępnych dowodach potwierdzających istotność CTLA-4 dla losów przeszczepów narządowych i HSCT, jak i na informacjach dotyczących wykorzystania CTLA-4-Ig (opierając się na zjawisku wyższego powinowactwa do cząsteczki B7 w porównaniu do CD28) jako czynnika immunosupresyjnego hamującego ko-stymulację szlakiem CD28/B7 i w konsekwencji indukującego tolerancję i zapobiegającego odrzucaniu przeszczepu.


Tak więc celem badań opublikowanych w cyklu 2 prac [5.5.1., 5.5.2., sumaryczny IF:**4,786**; MNiSW/KBN:**40,000**] badań była ocena wpływu poszczególnych wariantów polimorficznych genu *CTLA-4* u dawcy na ryzyko wystąpienia GVHD. Badania nasze w połączeniu z dostępnymi danymi literaturowymi mogą wnieść istotny wkład w opracowanie nowych protokołów mających na celu

optymalizację doboru dawcy oraz procedury alloHSCT poprzez opracowanie indywidualnych protokołów immunosupresji, uwzględniających obecność wariantów polimorficznych *CTLA-4* u dawcy (leczenie takie może mieć charakter „celowany” i obejmować stosowanie białka fuzyjnego CTLA-4-Ig w przypadku spodziewanej obniżonej ekspresji CTLA-4).

Jakkolwiek żaden z badanych polimorfizmów zlokalizowanych w genie *CTLA-4* oznaczony u dawcy nie wiązał się z ryzykiem aGvHD, to jednakże niższe ryzyko wystąpienia choroby obserwowano u biorców przeszczepianych od dawców posiadających genotyp CT60[AA]. Z kolei dla biorców marker ten może być potencjalnym istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko aGvHD, ponieważ wariant CT60[A] w sposób zależny od „dawki” allelu zmniejszał ryzyko aGvHD [5.5.1.]. Ponadto, analiza interakcji polimorfizmu CT60 biorcy z innymi czynnikami uwzględniającymi: zgodność HLA, schemat kondycjonowania (MAC, RTMAC lub RIC), źródło przeszczepu (BM lub PBPC), stopień pokrewieństwa (RD, URD) diagnozę, wiek biorcy, płeć dawcy oraz płeć biorcy wykazała model uwzględniający rzeczywisty wpływ na wystąpienie aGvHD, wskazując iż ryzyko choroby wzrasta 2,68-krotnie dla sytuacji RIC → RTMAC oraz terapii RTMAC → MAC, natomiast ryzyko wystąpienia aGvHD przy RD HSCT wynosiło 1,87 [5.5.1.]. U biorców posiadających predysponujący genotyp CT60[GG], poddanych HSCT od niespokrewnionych dawców oraz poddanych kondycjonowaniu MAC ryzyko aGvHD wynosiło 32,46. Jednakże żaden z polimorfizmów genetycznych dawcy i biorcy oraz parametrów klinicznych nie wywierał wpływu na nawrót, jak również na całkowite przeżycie. Ponadto obecność allelu [A] zarówno w miejscu polimorficznym c.49A>G jak i CT60 zmniejszała ryzyko wystąpienia aGvHD [5.5.1].

Wykazaliśmy również, iż wysoki poziom ekspresji mRNA *CTLA-4* przed przeszczepem zarówno u biorców jak i dawców zwiększa ryzyko aGvHD, przy czym związek ten jest bardziej znamieny w dawców. Ponadto, zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem komórek CD3<sup>+</sup> ekspresjonujących *CTLA-4* na powierzchni komórek u biorców przed przeszczepem a ryzykiem aGvHD [5.5.2.], co potwierdziła przeprowadzona analiza ROC. Postawiliśmy więc hipotezę, iż wysoka ekspresja *CTLA-4* odzwierciedla raczej poziom aktywacji układu odpornościowego dawcy i/lub biorcy przed transplantacją niż potencjał do hamowania odpowiedzi immunologicznej.

Podsumowując, obecność genotypu typu „dzikiego” CT60[GG] biorcy, kondycjonowanie mieloablacyjne jak i HSCT URD uznać można jako niezależne czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia aGvHD, natomiast poziom ekspresji mRNA *CTLA-4* zarówno u biorcy jak i dawcy oraz poziom *CTLA-4* ulegającego ekspresji na powierzchni komórki biorcy przed przeszczepem może być rozważany jako potencjalny czynnik prognostyczny.

  
dr inż. Edyta Pawlak-Adamska