

Identyfikacja i charakterystyka genetycznych czynników ryzyka u dzieci z przewlekłym zapaleniem trzustki

Dr n. med. Agnieszka Magdalena Rygiel

Autoreferat

Warszawa 2018

1. Imię Nazwisko: Agnieszka Magdalena Rygiel

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2008, Amsterdam, Holandia - tytuł doktora nauk medycznych; Uniwersytet Amsterdamski (Uva), Wydział lekarski, tytuł rozprawy doktorskiej: Genetic markers in malignant progression of Barrett's esophagus.

2002, Warszawa, Polska - studia magisterskie, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, tytuł pracy magisterskiej: Rola białka OmpR w wirulencji bakterii *Yersinia enterocolitica* O9

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2012.09 - obecnie: Instytut Matki i Dziecka, Warszawa; Zakład Genetyki Medycznej; adiunkt

2011.05 - 2011.12: Agnedia NV, Amsterdam, Holandia; naukowiec

2008.02 - 2010.04: Uniwersytet Amsterdamski (UvA), Amsterdam, Holandia, Akademiczne Centrum Medyczne (AMC), Zakład Gastroenterologii i Hepatologii; staż podoktorski

2003.05 - 2008.01: Uniwersytet Amsterdamski (UvA), Amsterdam, Holandia, Akademiczne Centrum Medyczne (AMC), Centrum Eksperymentalnej Medycyny Molekularnej; studia doktoranckie.

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.

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Identyfikacja i charakterystyka genetycznych czynników ryzyka u dzieci z przewlekłym zapaleniem trzustki.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Rygiel AM***, Beer S*, Simon P, Wertheim-Tysarowska K, Oracz G, Kucharzik T, Tysarowski A, Niepokój K, Kierkus J, Jurek M, Gawliński P, Poznański J, Bal J, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Weiss FU. Gene conversion between cationic trypsinogen (PRSS1) and the pseudogene trypsinogen 6 (PRSS3P2) in patients with chronic pancreatitis.

Hum Mutat. 2015 Mar; 36(3):350-6;

IF= 5,089; pkt MNiSW=35

*- pierwsze autorstwo współdzielone

Mój wkład polegał na sformułowaniu koncepcji pracy i wysunięciu hipotezy na temat mechanizmu powstania allelu *PRSS1-PRSS3P2* w drodze konwersji genowej, wykonaniu analizy dopasowania (*alignmentu*) genu *PRSS1* i *PRSS3P2*, przygotowaniu ryciny nr 1, podsumowaniu i interpretacji wszystkich danych, opracowaniu i napisaniu wstępnej wersji

manuskryptu i współdziałale w zredagowaniu ostatecznej jego wersji. **Mój wkład szacuję na 50%.**

2. Oracz G, Kolodziejczyk E, Sobczynska-Tomaszewska A, Wejnarska K, Dadalski M, Grabarczyk AM, Kierkus J, Woynarowski M, Wertheim-Tysarowska K, Ryzko J, Bal J, **Rygiel AM**. The clinical course of hereditary pancreatitis in children - A comprehensive analysis of 41 cases. *Pancreatology*. 2016 Jul-Aug;16(4):535-41.
IF= 2,580; pkt MNiSW=25
- ostatnie autorstwo

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji pracy i nadzorze nad projektem, wykonaniu analizy wyników sekwencjonowania genu *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR* u części pacjentów, podsumowaniu wyników analizy molekularnej badanych genów umieszczonych w Tabeli 2 i 3, współdziałale w pisaniu wstępnej wersji i redagowaniu ostatecznej manuskryptu. **Mój wkład szacuję na 60%.**

3. Wejnarska K, Kolodziejczyk E, Wertheim-Tysarowska K, Dadalski M, Sobczynska-Tomaszewska A, Kierkus J, Bal J, **Rygiel AM**, Oracz G. The Etiology and Clinical Course of Chronic Pancreatitis in Children With Early Onset of the Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 Dec;63(6):665-670.
IF= 2,799; pkt MNiSW=30
- współautorstwo, przedostatni autor

Mój wkład polegał na współdziałale w tworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu analizy wyników sekwencjonowania genu *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR* u części pacjentów, podsumowaniu wyników analizy molekularnej badanych genów umieszczonych w Tabeli 1, współdziałale w pisaniu wstępnej wersji i redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. **Mój wkład szacuję na 35%.**

4. Kujko AA, Berki DM, Oracz G, Wejnarska K, Antoniuk J, Wertheim-Tysarowska K, Kolodziejczyk E, Bal J, Sahin-Tóth M*, **Rygiel AM*#**. A novel p.Ser282Pro CPA1 variant is associated with autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2017 Sep;66(9):1728-1730
IF=17,016; pkt MNiSW=45
*- ostatnie autorstwo współdzielone, #autor korespondencyjny

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji pracy i nadzorze nad całym projektem, współdziałale w analizowaniu wyników sekwencjonowania genu *CPA1* i innych badanych genów, wykonaniu analizy segregacji mutacji p.Ser282Pro *CPA1* z fenotypem w rodzinach (rycina nr 1), interpretacji danych i opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. **Mój wkład szacuję na 60%.**

5. Grabarczyk AM, Oracz G, Wertheim-Tysarowska K, Kujko AA, Wejnarska K, Kolodziejczyk E, Bal J, Koziel D, Kowalik A, Gluszek S, **Rygiel AM#**. CTRC Genetic Variants, Including c.180TT, are Strongly Associated With Chronic Pancreatitis in Paediatric Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Sep 29.
IF= 2,752; pkt MNiSW=30
- ostatnie autorstwo,# autor korespondencyjny

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji pracy i nadzorze nad całym projektem, wykonaniu części analizy molekularnej genu *CTRC* metodą RFLP i metodą sekwencjonowania, podsumowaniu danych molekularnych, wykonaniu analizy statystycznej i umieszczeniu wyników w Tabeli 2, 3 i 4, współdziałale w pisaniu wstępnej wersji oraz opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. **Mój wkład szacuję na 70%.**

Dane bibliometryczne *prac wchodzących w skład doniesienia naukowego:

IF = 30,236

Punktacja MNISW = 165

* wg analizy bibliometrycznej sporządzonej przez Bibliotekę Naukową Instytutu Matki i Dziecka dnia 1.08.2018.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) to długotrwały proces zapalny toczący się w mięszu trzustki, prowadzący do nieodwracalnych zmian morfologicznych oraz niewydolności zewnętrznej i wewnętrzwydzielniczej tego narządu (1). Trzustka jest organem, który się nie regeneruje, a każde kolejne zaostrzenie coraz bardziej upośledza funkcję tego narządu. PZT może rozwijać się w wyniku oddziaływania wielu czynników zarówno środowiskowych jak i genetycznych. Częstość PZT u dorosłych w Europie Zachodniej szacuje się na 27/100 000 osób, natomiast u dzieci częstość tej choroby nie jest dokładnie znana. Przyczyny PZT u dzieci różnią się od tych opisanych wśród dorosłych a najczęstsze obejmują czynniki genetyczne, następnie wady anatomiczne przewodu trzustkowego, zaburzenia lipidowe oraz choroby dróg żółciowych (2-4).

Heterozygotyczne mutacje w genie *PRSSI* (ang. cationic trypsinogen) kodującym kationowy tripsynogen, prekursor enzymu trawiennego - tripsyny 1, uważane są za przyczynę dziedzicznego PZT (ang. hereditary pancreatitis, HP)(5). Rozpoznanie dziedzicznego PZT opiera się na obecności mutacji w genie *PRSSI* lub dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku PZT lub ostrego zapalenia trzustki (OZT) u dwóch krewnych pierwszego stopnia lub co najmniej trzech krewnych drugiego stopnia w co najmniej dwóch pokoleniach oraz wykluczeniu innych przyczyn. Mutacje *PRSSI* są mutacjami typu nabycia funkcji, które bezpośrednio lub pośrednio stymulują auto-aktywację tripsynogenu do tripsyny. Przedwczesna auto-aktywacja tripsynogenu prowadzi do uszkodzenia trzustki przez jej autostrawienie powodując odpowiedź zapalną i nawracające ostre zapalenie trzustki (OZT) ostatecznie prowadzące do przewlekłego stanu zapalnego (5,6). Dodatkowo, niektóre mutacje w *PRSSI* mogą powodować nieprawidłowe zwijanie białka prowadząc do przewlekłego stresu i zapalenia poprzez aktywację odpowiedzi na nieprawidłowe

zwijanie białka (ang. unfolded protein response, UPR) (7). Intensywny okres badań genetycznych u pacjentów z PZT zapoczątkowany odkryciem mutacji w genie *PRSSI* doprowadził do identyfikacji mutacji również w innych genach, takich jak *SPINK1* (ang. serum protease inhibitor Kazal type 1) *CFTR* (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), *CTRC* (ang. chymotrypsin C) i *CPA1* (ang. carboxypeptidase A1) (8-11). Podczas gdy heterozygotyczne mutacje w genie *PRSSI* dziedziczą się autosomalnie dominująco i uważa się je za przyczynę PZT, mutacje w innych genach, takich jak *SPINK1*, *CFTR* i *CTRC* o autosomalnym recesywnym toku dziedziczenia, raczej tylko zwiększają podatność na chorobę i najczęściej obserwowane są u pacjentów ze sporadyczną postacią choroby.

Pomimo postępów w identyfikacji nowych genetycznych czynników ryzyka, wciąż u około 30-40% dzieci po rozpoznaniu klinicznym PZT nie udaje się ustalić molekularnej przyczyny choroby. Dalego też celem naukowym badań będących podstawą niniejszego autoreferatu była **identyfikacja i charakterystyka genetycznych czynników ryzyka u dzieci z przewlekłym zapaleniem trzustki.**

Wiele doczasowych prac skupiało się na określeniu etiologii oraz przebiegu klinicznego dziedzicznego PZT u dorosłych co może nie odzwierciedlać w pełni etiologii i obrazu klinicznego u dzieci. (12-14). W artykule nr 2 (Oracz G i wsp., *Pancreatology*, 2016) prezentowany w moim autoreferacie, kompleksowo scharakteryzowaliśmy przebieg kliniczny oraz etiologię w tym czynniki genetyczne u dzieci z rozpoznaniem dziedzicznego PZT (n = 41) w porównaniu do grupy dzieci niespełniających kryteriów dziedzicznego PZT (n = 224). Analiza molekularna wykazała, że częstość mutacji w genie *PRSSI* w naszej kohorcie dzieci z dziedzicznym PZT to 80%, a najczęściej występującą mutacją jest p.Arg122His (34%), co jest zgodne z danymi literaturowymi (12-14). Zaskakującą obserwacją jest to, że drugą co do częstości występowania jest mutacja p.Arg122Cys (27%), której częstość w innych grupach europejskich jest dużo niższa i waha się od 0-1.5%. Mutację p.Asn29Ile, drugą co do częstości na świecie, zaobserwowaliśmy tylko w 12% przypadków, a bardzo rzadko występującą mutację p.Glu79Lys aż u 7% przypadków (12-15). Wyniki te wskazują, że polska grupa dzieci z dziedzicznym PZT ma odmienną dystrybucję poszczególnych mutacji w *PRSSI* w porównaniu do innych kohort europejskich. W grupie dzieci ze sporadyczną postacią choroby najczęstszymi identyfikowanymi czynnikami genetycznymi są mutacje w genie *SPINK1* (26%) i *CFTR* (17%). Ważną obserwacją jest to, że przebieg kliniczny choroby u dzieci z dziedzicznym PZT jest znacznie ostrzejszy niż u dzieci z drugiej grupy, pomimo

tego samego wieku wystąpienia PZT (około 8,5 lat). Przebadana grupa pacjentów rozpoznaniem dziedzicznego PZT jest do tej pory największą jednośrodkową tego typu grupą na świecie.

PRSSI należy do rodziny ludzkich trypsynogenów, która składa się z dziewięciu wysoce homologicznych genów, z których osiem znajduje się w *locus TCR-beta* (ang. T cell receptor beta) na chromosomie 7, w powtórzeniach tandemowych. *Locus TCR-beta* stanowi *hot spot* dla konwersji genowej prowadzącej do powstania różnych genów *TCR-beta*, która jest niewzajemną wymianą informacji genetycznej między homologicznymi sekwencjami DNA. Przypuszcza się, że wysoki stopień homologii między genami z rodziny trypsynogenów sprzyja powstawaniu nowych, patogennych mutacji *PRSSI* w drodze konwersji. Do tej pory jednakże opisano jedynie dwa zdarzenia konwersji genowej (pomiędzy genem *PRSSI* i *PRSS2*), w wyniku których doszło do wprowadzenia mutacji patogennej p.Asn29Ile i niepatogennego wariantu p.Asn54Ser w genie *PRSSI* (16,17). W artykule nr 1 (Rygiel AM i wsp., *Hum Mutat.*, 2015), opisujemy pierwszy patogenny allel powstały w wyniku nowej konwersji genowej pomiędzy genem *PRSSI* i jego pseudogenem - *PRSS3P2*. Nowy *PRSSI-PRSS3P2* allel został zidentyfikowany jednocześnie u dwóch niespokrewnionych pacjentów w Polsce i Niemczech. U naszego polskiego pacjenta allel powstał *de novo*, natomiast u niemieckiego pacjenta został odziedziczony po ojcu. Zmieniony region (od 24-71 nukleotydów) zlokalizowany jest między trzecim eksonem genu *PRSSI* i *PRSS3P2* i zawiera trzy niesynonimiczne zmiany aminokwasowe: p.Ser115Thr, p.Arg116Pro i p.Arg122His. Podczas gdy p.Arg122His jest dobrze znaną patogenną mutacją, warianty p.Ser115Thr, p.Arg116Pro były dotąd nieopisane. Analiza funkcjonalna potrójnego mutantu wykazała znacznie zwiększoną aktywację trypsynogenu w obecności chymotrypsyny C, która była identyczna z fenotypem aktywacji wywołanym obecnością samej mutacji p.Arg122His. Równolegle zaobserwowaliśmy, że sekrecja komórkowa potrójnego mutantu z transfekowanych komórek HEK 293T została zwiększona około dwukrotnie a efekt ten można przypisać nowej mutacji p.Arg116Pro. Wynika z tego, że patogenny efekt nowego allelu *PRSSI-PRSS3P2* jest wypadkową unikalnego podłączenia zwiększonej aktywacji i sekrecji trypsynogenu będących wynikiem obecności mutacji p.Arg122His i p.Arg116Pro. Dane te potwierdzają również, że rekombinacja pomiędzy genami z rodziny trypsynogenów jest ważnym mechanizmem generującym nowe allele *PRSSI* związane z wysokim ryzykiem PZT.

Trawienne karboksypeptydazy są metaloproteazami trzustki, które hydrolizują C-końcowe wiązania peptydowe w łańcuchach polipeptydowych. W 2013 r. Witt i wsp. wykazali, że warianty

genu *CPAI* (ang. carboxypeptidase A1) są silnie związane z występowaniem sporadycznego PZT o wczesnym początku (11). Dowiedziono, że warianty genu *CPAI* korelują ze zwiększonym ryzykiem PZT poprzez indukcję stresu retikulum endoplazmatycznego (ER), a nie ze względu na wpływ na aktywność trypsyny. Jednak jak dotąd nie udowodniono związku wariantów w genie *CPAI* z dziedzicznym PZT. W artykule nr 4 (Kujko AA i wsp., Gut, 2017), opisaliśmy dwie rodziny z klinicznym rozpoznaniem dziedzicznego PZT, u których wykryliśmy nieopisany dotąd wariant p.Ser282Pro (c.844T> C) w genie *CPAI*. Wiek wystąpienia PZT u probantów w tych rodzinach wynosił odpowiednio 17 i 12 lat. Co ważne, wykluczono u nich obecność mutacji w genie *PRSSI* i innych ważnych genach związanych z PZT, a także czynniki ryzyka takie jak nadużywanie alkoholu, palenie tytoniu, obrażenia, wady anatomiczne, zaburzenia metaboliczne i wady dróg żółciowych. W obu rodzinach wykazaliśmy, że wariant p.Ser282Pro *CPAI* segreguje z chorobą wykazując autosomalny dominujący tok dziedziczenia. Należy podkreślić, że do tej pory jedynie warianty w genie *PRSSI* korelowane były z autosomalnie dominującym PZT. W celu określenia wpływu wariantu p.Ser282Pro na funkcję białka CPA1, przeprowadziliśmy testy *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej HEK293T. Efekt wariantu p.Ser282Pro *CPAI* został porównany do efektu znanego patogennego wariantu p.Asn256Lys *CPAI*, powodującego niewłaściwe fałdowanie białka i stres ER. Pokazaliśmy, że w przypadku obydwu badanych wariantów doszło do retencji i degradacji białka w komórce (wskazujących na nieprawidłowe fałdowanie) oraz indukcji stresu ER w porównywalnym stopniu. Podsumowując, wykazaliśmy, że nowy wariant p.Ser282Pro *CPAI* powoduje dziedziczne PZT poprzez indukcję stresu ER. Co ważne ten sam mechanizm został uprzednio opisany również dla wariantu p.Leu104Pro w genie *PRSSI* (18). Nasze wyniki pokazują więc, że warianty w genie *CPAI*, podobnie do wariantów *PRSSI*, mogą być przyczyną PZT dziedziczącego się autosomalnie dominująco, a nieprawidłowe fałdowanie i indukcja stresu ER jest bardzo ważnym mechanizmem w patogenezie PZT tak jak to wcześniej sugerował Németh i wsp. oraz Witt i wsp. (11,18).

Podczas gdy patogenne mutacje w genie *PRSSI* i *CPAI* są przyczyną PZT, mutacje w innych genach takich jak *SPINK1* i *CTRC* korelują jedynie ze zwiększonym ryzykiem PZT. Dwa niezależne badania europejskie wykazały, że mutacje w genie *CTRC*, kodującym enzym kontrolujący i redukujący aktywność trypsyny w komórkach trzustki, są czynnikami ryzyka PZT u dorosłych i nastolatków (19- 21). Jednakże, z uwagi na fakt, że częstość patogennych mutacji w genie *CTRC* jest stosunkowo niska uzyskane wyniki są trudne do powtórzenia. Niejasny jest także

związek synonimicznego wariantu Gly60Gly (c.180 C>T) w genie *CTRC* z ryzykiem PZT. Niektóre doniesienia sugerują, że wariant Gly60Gly koreluje ze zwiększonym ryzykiem PZT, szczególnie u palaczy i osób nadużywających alkoholu, ale związek ten nie został potwierdzony w kolejnych badaniach (22). Ponadto, do chwili obecnej nie przeprowadzono badań oceniających związek wariantów w genie *CTRC* z ryzykiem PZT u pacjentów pediatrycznych. Dlatego też, celem badania zaprezentowanego w artykule nr 5 (Grabarczyk i wsp. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017) było oszacowanie ryzyka PZT związanego z wariantami *CTRC* u dzieci chorych na PZT (n = 136, mediana wieku w momencie rozpoznania 8 lat) w porównaniu do grupy kontrolnej (n = 401, mediana wieku 45 lat). Wykazaliśmy, że mutacje p.Lys247_Arg254del i p.Arg254Trp w genie *CTRC* w naszej grupie dzieci występują z wyższą częstością (5,3% i 4,6%, odpowiednio) w porównaniu do częstości raportowanych w grupie dorosłych (0,1%-1,5% i 1,2%-2%, odpowiednio) (20, 21). Po raz pierwszy udowodniliśmy, że wariant Gly60Gly w układzie homozygotycznym (genotyp c.180TT) jest silnym czynnikiem ryzyka PZT (OR=23; 95% CI 7.7-70; $P<0.001$), a ryzyko w naszej grupie badanej jest porównywalne z tym związanym z mutacją p.Arg254Trp w genie *CTRC*. Dodatkową nową obserwacją jest to, że wariant c.493 + 51C> A o nieznanym znaczeniu klinicznym, znacząco rzadziej występuje w naszej grupie z PZT, co sugeruje jego protekcyjną rolę w rozwoju choroby. Podsumowując, przeprowadzone przez nas badanie dostarcza dowodów na to, że patogenne mutacje genu *CTRC* oraz wariant Gly60Gly w układzie homozygotycznym (c.180TT) są silnymi czynnikami ryzyka PZT, a badanie ich obecności powinno być zawsze częścią diagnostyki molekularnej u pacjentów z PZT o wczesnym początku zachorowania.

Stosunkowo niewiele wiadomo na temat etiologii i klinicznego przebiegu PZT u najmłodszych pacjentów pediatrycznych. Dlatego też w artykule nr 3 (Wejnarska i wsp. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016) porównaliśmy czynniki etiologiczne i przebieg kliniczny choroby pomiędzy grupą najmłodszych dzieci (n=51; początek choroby przed 5 rokiem życia) a grupą o późniejszym początku zachorowania (n=225; początek choroby między 6-18 rokiem życia). Ogólnie najczęstszymi czynnikami ryzyka były mutacje w badanych genach związanych z PZT. W obydwu grupach, największy odsetek mutacji zidentyfikowaliśmy w genie *SPINK1* (łączna częstość 25,4%), następnie w *PRSSI* (13,1%) i *CFTR* (7,7%). Nie zaobserwowaliśmy jednakże znaczącej różnicy w częstości występowania mutacji w tych genach pomiędzy badanymi grupami pacjentów. Inne czynniki ryzyka, takie jak wady anatomiczne, choroby dróg żółciowych

i zaburzenia lipidowe występowały rzadziej niż mutacje w badanych genach i również bez różnic w ich częstości pomiędzy analizowanymi grupami. Podsumowując, PZT u dzieci o bardzo wczesnym i późniejszym początku charakteryzuje się podobnymi czynnikami etiologicznymi z przewagą mutacji w genach związanych z PZT. Praca ta jest pierwszą pracą oceniającą etiologię genetyczną i obraz kliniczny PZT w najmłodszej grupie dzieci, dlatego też uzyskane wyniki wymagają weryfikacji w kolejnych, najlepiej wieloośrodkowych badaniach.

Postawienie diagnozy PZT na wczesnym etapie jest trudne, ponieważ etiologia PZT jest bardzo złożona, a czasami na subtelne objawy choroby mogą nakładać się objawy innych schorzeń. Badania opisane w prezentowanych artykułach stanowiących bazę mojego autoreferatu poszerzają wiedzę z zakresu podłoża genetycznego PZT u dzieci. Głównymi osiągnięciami moich badań są: 1) charakterystyka podłoża genetycznego choroby w grupie polskich dzieci z dziedzicznym i sporadycznym PZT, 2) identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna nowego, patogenego allelu *PRSS1-PRSS3P2* powstałego w drodze konwersji genowej zwiększającego aktywację i sekrecję trypsynogenu, 3) identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna nowej, patogennej mutacji p.Ser282Pro w genie *CPA1* o autosomalnym dominującym toku dziedziczenia powodującej indukcję stresu ER, 4) wykazanie silnego związku między obecnością mutacji w genie *CTRC* i homozygotycznego wariantu Gly60Gly (c.180TT) a ryzykiem PZT u dzieci, 5) wykazanie, że PZT o bardzo wczesnym i późniejszym początku u dzieci charakteryzuje się podobnymi czynnikami etiologicznymi a do najczęstszych należą mutacje w genach związanych z PZT.

Obecnie kontynuuję badania z zakresu genetyki PZT jako kierownik projektu naukowego pt. "Identyfikacja nowych wariantów genetycznych związanych z ryzykiem przewlekłego zapalenia trzustki za pomocą sekwencjonowania całogzomowego" finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Głównym celem tego projektu jest identyfikacja defektów w genach dotąd niepowiązanych z PZT, co może doprowadzić do odkrycia nowych mechanizmów zaangażowanych w rozwój choroby. W przyszłości wiedza ta może mieć dużą wartość przy opracowaniu strategii terapeutycznych w zależności od rodzaju defektu oraz skuteczniejszego algorytmu diagnostyki molekularnej. Ta ostatnia jest niezbędna do zapewnienia kompleksowego doradztwa genetycznego, specjalnej opieki medycznej nad pacjentami i być może wdrożenia środków zapobiegawczych (np. modyfikacji stylu życia) u osób z wysokim ryzykiem.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moja aktywność naukowo-badawcza związana była z zagadnieniami z zakresu szeroko pojętej genetyki bakterii i człowieka. Większość tejsze aktywności skoncentrowała się na wykorzystaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej i cytogenetyki w celu poprawy diagnostyki onkologicznej i chorób dziedzicznych człowieka.

Moje pierwsze badania naukowe przeprowadzone w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Uniwersytetu Warszawskiego dotyczyły roli białka OmpR w wirulencji *Yersinia enterocolitica* O9 (YeO9), a ich efektem była praca magisterska obroniona z wyróżnieniem w roku 2002. W pracy tej dowiodłam, że białko OmpR bierze udział w regulacji ekspresji białek Yop YeO9. W następnym roku zaczęłam studia doktoranckie w renomowanym Akademycznym Centrum Medycznym w Amsterdamie (AMC) w Holandii wchodzącym w skład Uniwersytetu Amsterdamskiego. W projekcie tym skupiałam się na identyfikacji i walidacji markerów cytogenetycznych oznaczanych głównie metodą FISH (ang. *Fluorescent in situ hybridization*) w celu ich wykorzystania do oceny stopnia progresji nowotworowej u pacjentów z przełykiem Baretta (projekt finansowany przez Holenderskie Towarzystwo Onkologiczne, hol. KWF). Moje badania zaowocowały kilkoma publikacjami naukowymi opisującymi wyselekcjonowane przeze mnie markery genetyczne jako obiecujące narzędzie w poprawie diagnostyki i prognozy raka przełyku (Rygiel AM et al. 2008, *Cancer Epidemiol Biomarkers*; Rygiel AM et al. 2008 *Genes Chromosomes Cancer*; Rygiel AM et al., *Cancer* 2007, patrz załącznik nr 3, Pkt IIA,9,11,18). Dodatkowo wszystkie wyniki i publikacje z tego okresu zostały wydane w formie książkowej rozprawy doktorskiej pt "Genetic markers in malignant progression of Barrett's esophagus" a stopień doktora nauk medycznych został mi przyznany przez Rektora Uniwersytetu w Amsterdamie w roku 2008. Co istotne, wartość prognostyczna markerów genetycznych opisanych przeze mnie w pracy doktorskiej, została ostatecznie potwierdzona przez prospektywną, długofalową obserwację pacjentów z przełykiem Barretta a wyniki opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Gut* (Timmer MR et al., 2016; patrz załącznik nr 3, Pkt II,A,3). W pracy tej wykazaliśmy, że stosując model predykcyjny oparty na kombinacji markerów genetycznych (zmiany liczby kopii genów *p16*, *c-Myc*, aneusomia) oraz markerów klinicznych (wiek zachorowania, długość przełyku Barretta) można określić ryzyko progresji pacjentów z przełykiem Barretta. Kolejnym etapem mojej ścieżki naukowej był dwuletni staż podoktorski (w latach 2008-2010) odbyty w Zakładzie Gastroenterologii i Hepatologii, AMC w Amsterdamie gdzie zainicjowałam projekt badawczy na temat roli białka SATB1 w

przerzutowaniu raka jelita grubego. Podczas swojej pracy w AMC byłam także odpowiedzialna za planowanie i koordynację pracy doktoranta i stażystki (załącznik nr 3, Pkt III J i K). W roku 2011 podjęłam pracę jako naukowiec w nowatorskiej firmie diagnostycznej *Agendia NV*, specjalizującej się w produkcji diagnostycznych testów molekularnych (mikromacierzy RNA) raka piersi. Podczas tego okresu odpowiedzialna byłam za doskonalenie jednego z testów diagnostycznych (TheraPrint) używanego do przewidywania odpowiedzi pacjentów na chemioterapię i terapie celowane.

Aktualnie pracuję jako adiunkt w Zakładzie Genetyki Medycznej w Instytucie Matki i Dziecka gdzie zajmuję się tematyką związaną z genetycznymi aspektami chorób rzadkich. Tak jak wspominałam w moim autoreferacie jestem kierownikiem projektu naukowego mającego na celu identyfikację nowych wariantów genetycznych związanych z ryzykiem przewlekłego zapalenia trzustki za pomocą sekwencjonowania egzomowego (projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki). Wyniki tego projektu będą częścią prac na stopnie naukowe. Poza tym wśród innych moich aktywności i osiągnięć spoza tematyki związanej z zapaleniem trzustki wymienić mogę prace dotyczące identyfikacji podłoża genetycznego niedosłuchu (Niepokój N et al. 2017; załącznik nr 3, Pkt II A) oraz chorób skóry takich jak Epidermolysis bullosa i rybia łuska (Wertheim-Tysarowska K et al. 2016; załącznik nr 3.Pkt II A).



Piśmiennictwo:

1. Braganza J, Lee S, McCloy R, et al. Chronic pancreatitis. *Lancet* 2011;377:1184–97.
2. Werlin S, Kugathasan S, Frautschy B. Pancreatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:591–5.
3. Nydegger A, Couper R, Oliver M. Childhood pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:499–509.
4. Sobczynska-Tomaszewska A, Bąk D, Oralewska B et al. Analysis of CFTR, SPINK1, PRSS1 and AAT mutations in children with acute or chronic pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:299–306.
5. Whitcomb D, Gorry M, Preston R et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141e5.
6. Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology* **144**, 1292–1302(2013).
7. Schnur A, Beer S, Witt H et al. Functional effects of 13 rare PRSS1 variants presumed to cause chronic pancreatitis. *Gut* **63**, 337–343 (2014).
8. Witt H, Luck W, Hennies HC et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000;25:213e6.
9. Cohn J, Friedman K, Noone P et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:653e8.
10. Rosendahl J, Witt H, Szmola R et al. Chymotrypsin C (CTRC) alterations that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2008;40:78e82.
11. Witt H, Beer S, Rosendahl J et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1216–20.
12. Rebours V, Bourton-Ruault M, Schnee M et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut* 2009;58:97e103.
13. Joergensen M, Brusgaard K, Cruger D et al. Genetic, epidemiological and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1876e83.
14. Howes N, Lerch M, Greenhalf W et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:252e61.
15. Applebaum-Shapiro S, Finch R, Pfützner R et al. Hereditary Pancreatitis in North America: The Pittsburgh-Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatology* 2001;1:439e4
16. Teich N, Nemoda Z, Köhler H et al. Gene conversion between functional trypsinogen genes PRSS1 and PRSS2 associated with chronic pancreatitis in a six-year-old girl. *Hum Mutat.* 2005 Apr; 25(4):343–7.
17. Masson E, Le Maréchal C, Delcenserie R et al. Hereditary pancreatitis caused by a double gain-of-function trypsinogen mutation. *Hum Genet.* 2008 Jun; 123(5):521–9.

18. Németh BC, Patai AV, Sahin-Tóth M et al. Misfolding cationic trypsinogen variant p.L104P causes hereditary pancreatitis *Gut*. 2017 Sep;66(9):1727-1728.
19. Szmola R, Sahin-To' th M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme *Y. Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11227–32.
20. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. Chymotrypsin C (CTRC) alterations that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2008;40:78–82.
21. Masson E, Chen JM, Scotet V et al. Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Hum Genet* 2008;123:83–91.
22. LaRusch J, Lozano-Leon A, Stello K et al. The common chymotrypsinogen C (CTRC) variant p.Gly60Gly (C.180T) increases risk of chronic pancreatitis but not recurrent acute pancreatitis in a North American population. *Clin Transl Gastroenterol* 2015;6:e68.