

AUTOREFERAT

**Charakterystyka molekularna ostrej białaczki szpikowej
z wykorzystaniem badań transkryptomicznych**

Luiza Handschuh

Poznań, 30 lipca 2021

1. Imię i nazwisko.

Luiza Handschuh

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

1998 magister biologii, specjalność biologia molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Biologii, praca magisterska pt. „Nadekspresja ludzkiego białka CBP20 w *Escherichia coli*”, promotor prof. dr hab. Artur Jaromołowski

2005 doktor nauk chemicznych w dziedzinie biochemii, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, praca doktorska pt. „Białka podklasy PR-10.2 łubinu żółtego”, promotor dr hab. Michał Sikorski, prof. ICHB PAN

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

2005-2018 specjalista / starszy specjalista w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

od 2006 pracownik Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (kolejno asystent, adiunkt i starszy specjalista)

od 2015 kierownik Pracowni Genomiki (pierwotnie Pracowni Mikromacierzy i Głębokiego Sekwencjonowania) ICHB PAN

2016-2017 wykładowca przedmiotu „Biologia komórkowa i molekularna” dla studentów specjalności bioinżynieria na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Tytuł osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Charakterystyka molekularna ostrej białaczki szpikowej z wykorzystaniem badań transkryptomicznych

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ułożone w porządku chronologicznym:

(* - autor korespondujący; IF – wskaźnik *impact factor*; MIN – punkty ministerialne (wg nowej punktacji dla artykułów od 2019 r., dla wcześniejszych wg obu punktacji, z nową w nawiasie))

4.1.

Uszczyńska B, Zyprych-Walczak J, **Handschuh L***, Szabelska A, Kaźmierczak M, Woronowicz W, Kozłowski P*, Sikorski MM, Komarnicki M, Siatkowski I, Figlerowicz M.

Analysis of boutique arrays: a universal method for the selection of the optimal data normalization procedure.

International Journal of Molecular Medicine 2013, 32:668-84.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1443>

IF 2012: 1.957, IF 5-letni z 2012: 2.048, Q3, MIN: 20(70), liczba cytowań: 3 (1 bez autocyt.)

4.2.

Marcinkowska-Swojak M, **Handschuh L**, Wojciechowski P, Goralski M, Tomaszewski K, Kazmierczak M, Lewandowski K, Komarnicki M, Blazewicz J, Figlerowicz M, Kozłowski P*. Simultaneous detection of mutations and copy number variation of *NPM1* in the acute myeloid leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification.

Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2016, 786:14-26. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.001>

równorzędne pierwsze autorstwo z M. Marcinkowską-Swojak

IF 2015: 2.581, 5-letni z 2015: 3.552, Q3, MIN: 35(70), liczba cytowań: 9 (5 bez autocyt.)

4.3.

Klonowska K, **Handschuh L**, Swiercz A, Figlerowicz M, Kozłowski P*.

MTTE: an innovative strategy for the evaluation of targeted/exome enrichment efficiency.

Oncotarget, 2016, 11;7:67266-67276. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11646>

IF 2015: 5.008, 5-letni z 2015: 5.415, Q1, MIN: 40(100), liczba cytowań: 4 (3 bez autocyt.)

4.4.

Handschuh L*, Kaźmierczak M, Milewski MC, Góralski M, Łuczak M, Wojtaszewska M, Uszczyńska-Ratajczak B, Lewandowski K, Komarnicki M, Figlerowicz M.

Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR.

International Journal of Oncology, 2018, 52:656-678. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4233>

IF 2017: 3.333, 5-letni z 2017: 3.271, Q2, MIN: 25(100), liczba cytowań: 26 (23 bez autocyt.)

4.5.

Handschuh L*, Wojciechowski P, Kazmierczak M, Marcinkowska-Swojak M, Luczak M, Lewandowski K, Komarnicki M, Blazewicz J, Figlerowicz M, Kozłowski P.

NPM1 alternative transcripts are upregulated in acute myeloid and lymphoblastic leukemia and their expression level affects patient outcome.

Journal of Translational Medicine, 2018, 16:232. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1608-2>

IF 2017: 4.197, 5-letni z 2017: 4.402, Q2, MIN: 35(100), liczba cytowań: 10 (7 bez autocyt.)

4.6.

Handschuh L*,

Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies.

Journal of Oncology, 2019, 7239206. <https://doi.org/10.1155/2019/7239206>

Praca przeglądowa

IF 2018: 2.6, 5-letni z 2020: 4.499, Q3, MIN: 100, liczba cytowań: 23 (22 bez autocyt.)

4.7.

Handschuh L*, Wojciechowski P, Kazmierczak M, Lewandowski K.

Transcript-level dysregulation of *BCL2* family genes in acute myeloblastic leukemia.

Cancers (Basel), 2021, 3:3175. <https://doi.org/10.3390/cancers13133175>

IF 2020: 6.639, 5-letni z 2020: 6.999, Q1, MIN: 140, liczba cytowań: 0

Tabela 1. Dane naukometryczne dotyczące cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz wszystkich publikacji z kolekcji Web of Science.

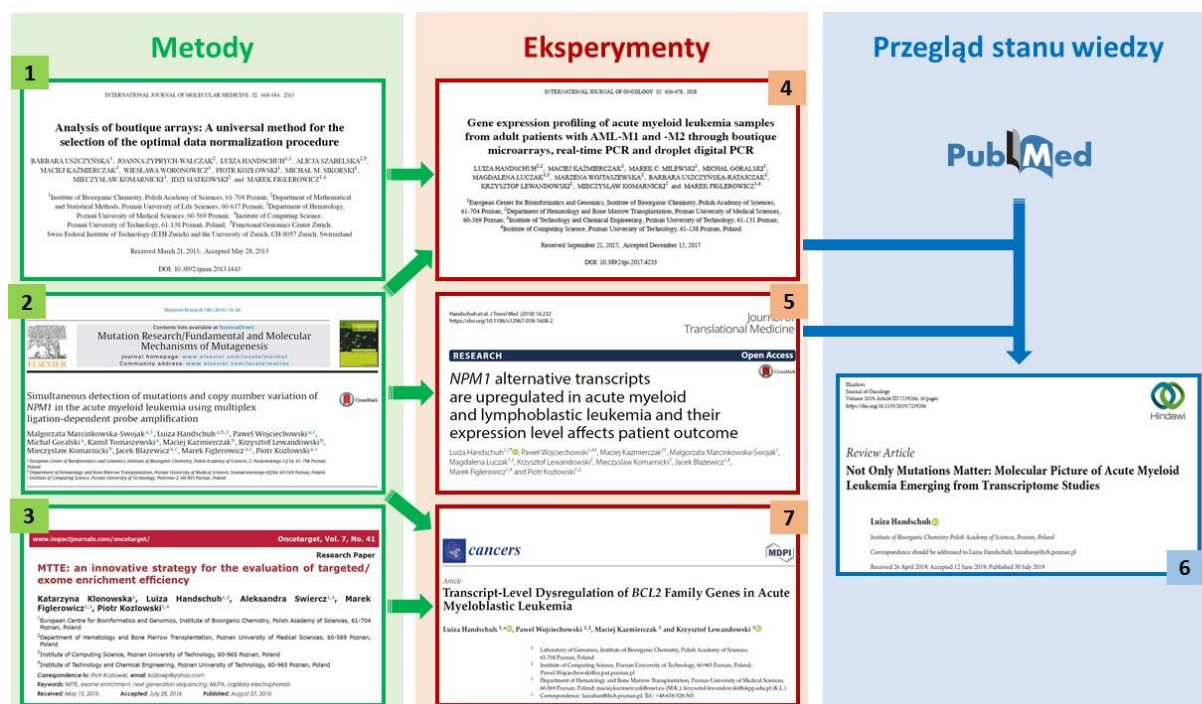
	Cykl 7 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	Wszystkie publikacje z kolekcji Web of Science* (42)
IF z roku poprzedzającego publikację	26,315	111,971
5-letni IF z roku poprzedzającego publikację	28,798	124,947
punkty ministerialne	395	1896
liczba cytowań (bez autocytowań)	75 (61)	389 (363)
<i>h</i> -index	4	12

*stan na dzień 27.07.2021

Opis osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Wstęp

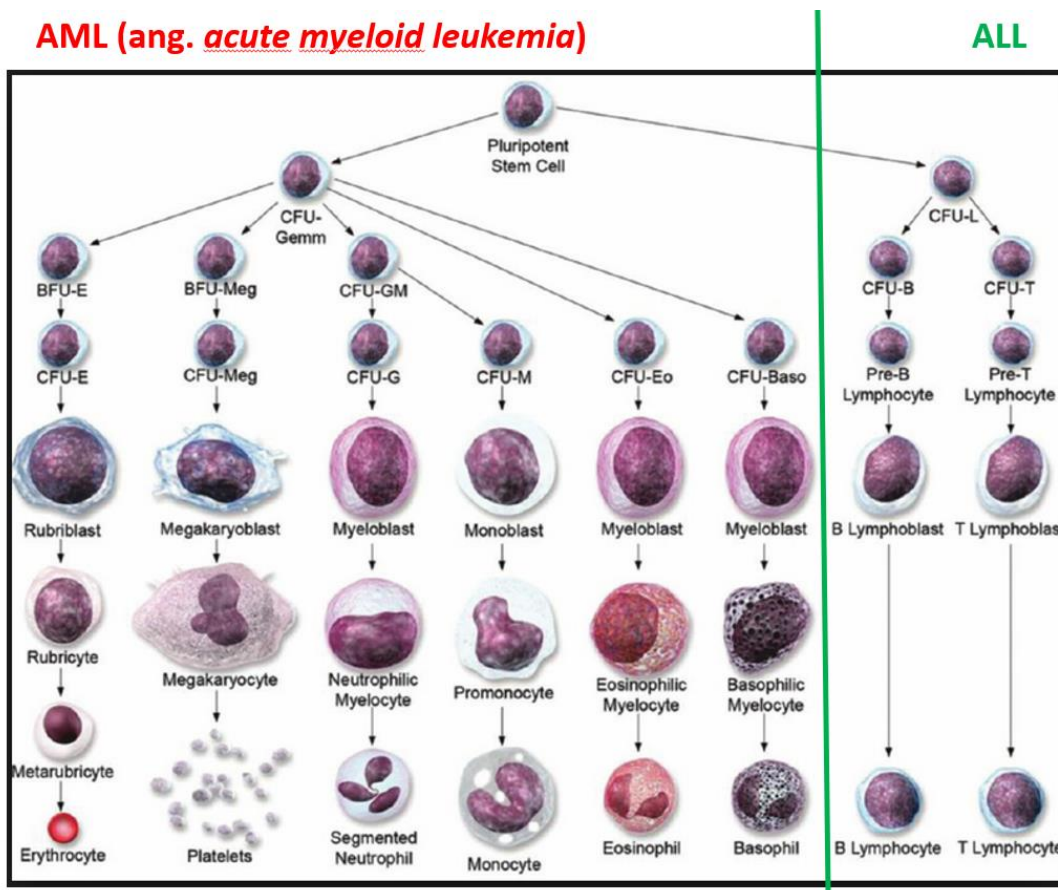
W skład osiągnięcia naukowego wchodzi cykl siedmiu publikacji, obejmujący trzy prace metodyczne, trzy prace eksperymentalne i jedną pracę przeglądową. Powiązania pomiędzy poszczególnymi publikacjami przedstawia schemat na Ryc. 1.



Rycina 1. Schemat powiązań pomiędzy publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia.

Elementem łączącym wszystkie prace jest model badawczy - ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*, AML). Badania zostały wykonane w dwóch jednostkach, z którymi byłam związana umową o pracę – Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICHB PAN) oraz w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ostra białaczka szpikowa należy do najbardziej agresywnych chorób rozrostowych układu krwiotwórczego człowieka. Podobnie jak nowotwory lite charakteryzuje się zaburzeniami różnicowania komórek, ich nadmierną proliferacją i zahamowaniem apoptozy. W AML nieprawidłowe komórki powstają w wyniku zaburzeń procesu hematopoezy w szpiku kostnym (Ryc. 2). Niedojrzałe prekursory białych krwinek, tzw. blasty, namnażają się w szybkim tempie, a następnie przedostają się do krwi obwodowej upośledzając funkcjonowanie nie tylko układu krwiotwórczego, ale i całego organizmu. Pierwsze objawy są zwykle mało specyficzne – osłabienie, zawroty głowy, zasłabnięcia, siniaki, krwawienia z nosa i dziąseł, zakażenia bakteryjne i grzybicze. W badaniu krwi obserwuje się podwyższoną liczbę leukocytów, niedokrwistość, małopłytkowość i neutropenię (Provan D et al., 2007). AML jest chorobą heterogenną, której źródłem są różne rodzaje komórek progenitorowych linii mieloidalnej. Odzwierciedla to klasyfikacja FAB (*French-American-British*) oparta przede wszystkim na cechach morfologicznych komórek (Tabela 2) (Bennet JM et al., 1976).



Rycina 2. Schemat hematopoezy z zaznaczonym rozdziałem na linię mieloidalną (na lewo od zielonej kreski) i limfoidalną (na prawo od zielonej kreski). Zaburzenia różnicowania komórek w obrębie obu linii prowadzą do rozwoju m.in. ostrych białaczek, tj. AML i ALL (źródło: *Williams Hematology, 6th edition. Copyright McGraw-Hill, adaptive drawing by David Sabio*).

Tabela 2. Klasyfikacja FAB (*French-American-British*) ostrej białaczki szpikowej.

Podtyp FAB	Nazwa polska	Nazwa angielska	Typowe cechy
M0	ostra białaczka szpikowa niezróżnicowana	undifferentiated acute myeloblastic leukemia	blasty z cechami linii mieloidalnej i limfoidalnej, CD13+, CD33+, CD11b+, CD11c+, CD14+, CD15+
M1	ostra białaczka mieloblastyczna bez cech dojrzewania	acute myeloblastic leukemia with minimal maturation	monomorficzna populacja mieloblastów, MPO+, CD13+, CD33+, CD117+, CD34+/-,
M2	ostra białaczka mieloblastyczna z cechami dojrzewania	acute myeloblastic leukemia with maturation	ok. 10% komórek w stadium powyżej mieloblastu, MPO+, CD34+/-, CD13+, CD15+, HLA-DR+/-, Sudan black+, CD117+, t(8;21)
M3	ostra białaczka promielocytowa	acute promyelocytic leukemia (APL)	niski poziom leukocytów we krwi, nietypowe promielocyty, CD13+, CD33+, HLA-DR-, CD34-, t(15;17)
M4	ostra białaczka mielomonocytowa	acute myelomonocytic leukemia	granulocyty i monocyty w różnych proporcjach i stadiach rozwoju, CD13+, CD15+, CD33+, CD11b+, CD11c+, CD14+, CD64+, CD4+
M4eos	ostra białaczka mielomonocytowa z eozynofilią	acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia	min. 5% komórek to nieprawidłowe eozynofile z jądrami monocytoidalnymi i nietypowymi ziarnistościami, inv(16), del(16q)
M5	ostra białaczka monocytowa	acute monocytic leukemia	komórki białaczkowe to monoblasty i promonocyty, CD14+, CD68+, CD4+, CD11c+, HLA-DR+, CD64+, t(9;11), del(11), t(6;11), t(8;16)
M6	ostra białaczka erytroidalna	acute erythroid leukemia	dysplastyczne komórki erytroidalne i mieloblasty, CD13+, CD33+, CD15+, glikoforyna A+, glikoforyna C+
M7	ostra białaczka megakarioblastyczna	acute megakaryoblastic leukemia	megakarioblasty, CD41+, CD61+, CD42+, CD13+, CD33+, CD34+

Nieleczona AML prowadzi do śmierci w ciągu kilku tygodni, a skuteczność chemioterapii, stosowanej w prawie niezmienniej formie od ponad 40 lat, kształtuje się na poziomie 40-45% w przypadku osób młodych i zaledwie 10-20% w przypadku pacjentów powyżej 65 roku życia (Bose P et al., 2017). Bardzo często dochodzi do wznowy choroby oraz oporności na terapię. Jedynym skutecznym sposobem leczenia jest allogeniczny przeszczep szpiku, ale nie wszyscy pacjenci mogą się poddać tej procedurze. Z tego względu sporo wysiłku na całym świecie włożono w badania związane z patogenezą, rozwojem i terapią AML. Mimo iż nie jest to choroba tak częsta jak np. rak płuca czy piersi, AML należy do najczęściej badanych chorób nowotworowych, co pokazałam w opublikowanej w 2019 r. pracy przeglądowej (Handsuh L, 2019, poz. 4.6 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). Ze względu na dostępność materiału do badań (często wystarczy próbka krwi) AML stała się chorobą modelową, na przykładzie której pokazano po raz pierwszy zastosowanie w diagnostyce analizy ekspresji genów za pomocą mikromacierzy (Golub et al., 1999). Do pacjentki z AML należał także pierwszy na świecie zsekwencjonowany genom nowotworowy (Ley TJ et al. 2008). Dotychczas zidentyfikowano i scharakteryzowano liczne mutacje, które mają wpływ na rozwój i przebieg choroby, a część z nich znalazła zastosowanie jako czynniki diagnostyczne i prognostyczne w praktyce klinicznej, co uwzględniono w nowszej klasyfikacji WHO (ang. *World Health Organization*) (Tabela 3) (WHO 2008, Arber

DA et al., 2016). Pomimo intensywnych badań w niewielkim stopniu udało się poprawić skuteczność leczenia AML i tylko dla jednego z podtypów (AML M3, APL z *PML-RARA*) opracowano terapię celowaną, pozwalającą na uzyskanie remisji całkowitej u 90-95% pacjentów (Sanz MA et al., 2009 i 2019).

Tabela 3. Klasyfikacja AML i nowotworów mieloidalnych wg WHO (ang. *World Health Organization*) (2008 i 2016).

<p>AML z powtarzającymi się zmianami genetycznymi AML z t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> APL z <i>PML-RARA</i> AML z t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> AML z t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> AML z inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> AML (megakarioblastyczna) z t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> kategoria tymczasowa: AML z <i>BCR-ABL1</i> AML ze zmutowanym <i>NPM1</i> AML z mutacją bialleliczną w <i>CEBPA</i> kategoria tymczasowa: AML ze zmutowanym <i>RUNX1</i></p>
<p>AML związana ze zmianami mielodysplastycznymi</p>
<p>Nowotwory mieloidalne związane z terapią (wtórne)</p>
<p>AML niesklasyfikowana gdzie indziej AML z minimalnym dojrzewaniem AML bez cech dojrzewania AML z dojrzewaniem ostra białaczka mielomonocytoza ostra białaczka monoblastyczna/monocytoza ostra białaczka erytroidalna ostra białaczka megakarioblastyczna ostra białaczka bazofilna ostra panmieloza z mielofibrozą</p>
<p>Mięsak granulocytarny</p>
<p>Choroby mieloproliferacyjne związane z zespołem Downa Przejściowa nieprawidłowa mielopoeza białaczka szpikowa związana z zespołem Downa</p>

Cele badań

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań była charakterystyka transkryptomu komórek białczkowych typowych dla AML, najpierw ogólna i kompleksowa, a następnie szczegółowa, nakierowana na konkretne geny i ich transkrypty alternatywne. Dodatkowym celem było poszukiwanie w transkryptomach nowych czynników związanych z patogenezą AML. Osobnym wyzwaniem było przygotowanie warsztatu metodycznego, obejmujące stworzenie odpowiednich narzędzi badawczych oraz wybór i optymalizację metod służących do analizy wyników. Kolejnym celem było powiązanie zmian we wzorach ekspresji genów z danymi klinicznymi w celu identyfikacji potencjalnych biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym. Aby osiągnąć ten cel niezbędna była ścisła współpraca z lekarzami hematologami i charakterystyka kliniczna pacjentów, którzy wyrazili zgodę na udział w badaniu. Konieczne było także monitorowanie losów pacjentów przez kolejne lata. Pełna

charakterystyka molekularna nowotworu obejmuje również identyfikację mutacji somatycznych, dlatego odrębnym zadaniem, jakiego się podjęłam była analiza eksomów pacjentów w celu określenia profilu mutacji w genach kodujących białka. Chciałam sprawdzić czy obecność poszczególnych mutacji wiąże się ze zmianami w profilu ekspresji genów. Dodatkowym zadaniem było znalezienie relacji pomiędzy poziomem ekspresji genów oraz poziomem akumulacji białek, który badaliśmy równolegle u tych samych pacjentów za pomocą metod proteomicznych (prace Luczak et al., 2012, Kazmierczak et al., 2013).

Metodyka

Mając do dyspozycji bogate zaplecze aparaturowe Pracowni Genomiki ICHB PAN mogłam skorzystać z nowoczesnych metod badania transkryptomu takich jak mikromacierze (ang. *microarrays*), sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) oraz techniki ilościowego RT-PCR (ang. *reverse transcription - polymerase chain reaction*), w tym emulsyjnego PCR (ddPCR, ang. *droplet digital PCR*). Wykorzystałam również możliwość identyfikacji mutacji w DNA pacjentów za pomocą metody MLPA (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) oraz sekwencjonowania eksomów (ang. *whole exome sequencing*, WES). Rozwijając własny warsztat badawczy i współpracując z innymi osobami z ICHB PAN, Uniwersytetu Medycznego oraz Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, opracowałam trzy autorskie metody, które zaowocowały publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego (poz. 1-3). Pierwsza dotyczyła wyboru optymalnej metody normalizacji danych pochodzących z małych drukowanych mikromacierzy (poz.1), druga metody detekcji mutacji w genie *NPM1* (poz. 2), a trzecia metody oceny efektywności wzbogacania bibliotek DNA w eksomy (ang. *exome-enrichment*) przed ich sekwencjonowaniem.

Opracowanie narzędzi

Pierwszym narzędziem, którego użyłam do analiz transkryptomicznych były mikromacierze DNA. Ponieważ podobne badania były już wcześniej prowadzone z zastosowaniem macierzy pełnogenomowych, w projekcie zaplanowaliśmy stworzenie własnego narzędzia, jakim były małe mikromacierze dedykowane AML. Jednym z moich pierwszych zadań był przegląd literatury i dokonanie selekcji genów, których ekspresja miała być analizowana za pomocą mikromacierzy. Kolejnym krokiem była produkcja samych mikromacierzy na szkiełkach z zastosowaniem przeznaczonej do tego celu drukarki. Tak przygotowane narzędzie posłużyło do hybrydyzacji wyznakowanych fluorescencyjnie próbek cDNA, uzyskanego na matrycy RNA wyizolowanego z komórek krwi i/lub szpiku pacjentów oraz zdrowych ochotników, stanowiących grupę kontrolną. Cały eksperyment był bardzo złożony i czasochłonny i wiele czynników wpływało na jakość rezultatów końcowych, widocznych dopiero na etapie skanowania mikromacierzy. W trakcie prac pojawiły się różnorodne problemy techniczne, z którymi musiałam się zmierzyć. Również analiza danych z małych macierzy drukowanych, czasem określanych terminem „*boutique arrays*”, okazała się niezwykle złożona. Nawet w przypadku mikromacierzy dostępnych komercyjnie wybór metody normalizacji danych nie pozostaje bez wpływu na wyniki analiz, co pokazaliśmy w pracy opublikowanej w roku 2011 (Schmidt MT et al., 2011). Z tego względu zdecydowaliśmy się opracować własną strategię wyboru metody normalizacji danych pochodzących z małych mikromacierzy drukowanych, opisaną w pracy Uszczyńskiej B. et al. (2013) (poz. 4.1 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego), której jestem autorem

korespondencyjnym wspólnie z prof. dr hab. Piotrem Kozłowskim. Przetestowaliśmy w niej 13 różnych metod normalizacji danych pochodzących z trzech typów małych drukowanych mikromacierzy. Testowane metody normalizacji dostępne były w postaci tzw. pakietów (ang. *packages*) R Bioconductor, więc ich zastosowanie wymagało zaawansowanej znajomości środowiska R i Bioconductora (www.bioconductor.org). Dwa typy macierzy, jeden dedykowany AML, drugi astmie i alergii, zostały wydrukowane przeze mnie w Pracowni Genomiki, z zastosowaniem drukarki do mikromacierzy SpotArray 24 (Perkin Elmer). Wszystkie wykorzystane w pracy eksperymenty mikromacierzowe związane z AML wykonałam osobiście od początku do końca, natomiast w eksperymentach związanych z astmą i alergią, przeprowadzanych w ramach projektu kierowanego przez dr hab. Michała Sikorskiego, prof. ICHB PAN, uczestniczyła jego doktorantka, Wiesława Woronowicz. Trzeci zestaw danych pochodził z publikacji Oshlack et al (2007). Analizą danych i ich wizualizacją zajmowała się grupa współpracujących ze mną bioinformatyków w składzie: Barbara Uszczyńska (wówczas doktorantka dr hab. Piotra Kozłowskiego, prof. ICHB PAN), dr Joanna Zyprych-Walczak i doktorantka Alicja Szabelska, pracujące w Katedrze Metod Matematycznych i Statystycznych Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod opieką prof. Idziego Siatkowskiego. Razem z dr hab. Piotrem Kozłowskim ocenialiśmy efekty ich prac, dyskutowaliśmy nad wynikami i uczestniczyliśmy w tworzeniu manuskryptu, którego pierwszą wersję opracowała B. Uszczyńska. Pozostali współautorzy zapewniali dodatkowy nadzór merytoryczny. W pracy zaproponowaliśmy szereg kryteriów ułatwiających wybór metody optymalnej dla danego zbioru danych. Opracowanie to ułatwiło mi analizę danych do późniejszej publikacji eksperymentalnej (Handsuh L et al. 2018, poz. 4.4 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego).

Ponieważ w trakcie realizacji projektu poświęconego AML ukazały się prace postulujące istotny udział w patogenezie AML mutacji somatycznej w genie *NPM1* (Falini et al., 2005 i 2007) postanowiłam sprawdzić, którzy z pacjentów stanowiących naszą grupę badaną byli nosicielami tej mutacji. *NPM1* koduje wielofunkcyjne białko nukleofozminę, która uczestniczy w takich procesach jak biogeneza rybosomów, embriogeneza, transport RNA i białek, replikacja i naprawa DNA, regulacja struktury chromatyny, podziałów komórkowych i apoptozy (Falini B et al., 2010, Box JK et al., 2016). W warunkach fizjologicznych białko to nieustannie krąży pomiędzy jądrem (głównie jąderkiem) a cytoplazmą (Falini B et al., 2009). Zaburzenia poziomu ekspresji genu *NPM1* wiązane są z onkogenezą. Odkryta przez Faliniego i wsp. mutacja, obecna u 25-35% pacjentów z AML, a praktycznie nie występująca w innych nowotworach, to insercja 4 reszt nukleotydowych w końcowym fragmencie genu (Falini B et al., 2005 i 2007). Powoduje ona przesunięcie ramki odczytu i zmiany w C-końcowym regionie białka, których konsekwencją jest utrata sygnału lokalizacji jąderkowej i zatrzymanie białka w cytoplazmie. W efekcie białko nie może pełnić funkcji wymagających obecności w jądrze. Mutacja ta, zaliczana do głównych czynników sprawczych AML (ang. *driver mutation*), jest jedną z najczęściej występujących zmian somatycznych w genomach pacjentów z AML. Jej obecność, przy braku mutacji *FLT3-ITD*, wiąże się z korzystnym rokowaniem. Ponieważ pacjenci z mutacją w *NPM1* prezentują wspólne cechy kliniczne, a ich komórki białaczkowe posiadają charakterystyczny profil ekspresji genów kodujących białka oraz mikroRNA, AML ze zmutowanym *NPM1* została wyróżniona jako osobny podtyp w klasyfikacji WHO (Tabela 3) (Falini B et al., 2011). Wspólnie z dr Małgorzatą Marcinkowską-Swojak i dr hab. Piotrem Kozłowskim, prof. ICHB PAN, opracowaliśmy nową, opartą o MLPA metodę identyfikacji mutacji w *NPM1*, opisaną w pracy Marcinkowskiej-Swojak et al., (2016) (poz. 4.2 cyklu

publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). W pracy tej jestem równorzędnym pierwszym autorem. Opracowana przez nas metoda pozwala nie tylko na detekcję trzech najczęściej występujących w *NPM1* typów mutacji (tzw. mutacji A, B oraz D) bez konieczności sekwencjonowania genu, ale także umożliwia jednoczesną ocenę zmian liczby kopii (ang. *copy number alterations*, CNAs) tego genu w genomie. W przypadku wykrycia mutacji możliwe jest także określenie względnej proporcji allelu zmutowanego względem dzikiego. W celu identyfikacji mutacji wyizolowałam genomowy DNA z zamrożonych komórek krwi obwodowej lub szpiku kostnego pacjentów i poddałam go sekwencjonowaniu metodą Sangera z zastosowaniem starterów okalających miejsce mutacji. Równoległe na tych samych próbkach dr M. Marcinkowska-Swojak przeprowadziła eksperyment wykorzystujący opracowaną przez nas metodę MLPA. Wyniki obu eksperymentów były ze sobą zgodne, co potwierdziło wiarygodność nowej metody. Dodatkowo za pomocą sekwencjonowania Sangera wykryliśmy u pojedynczych pacjentów dwie rzadkie mutacje (I oraz ZE). Jednocześnie, korzystając z danych z sekwencjonowania transkryptomów AML badanych pacjentów, które wykonałam, przeprowadziliśmy dodatkową weryfikację obecności mutacji w transkryptach genu *NPM1*. W tym celu informatyk dr inż. Paweł Wojciechowski, pracownik Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej oraz kierowanej przeze mnie Pracowni Genomiki ICHB PAN, stworzył autorskie skrypty pozwalające na ekstrakcję i wizualizację odczytów NGS zmapowanych do miejsca mutacji. W badaniach uczestniczył także magistrant Kamil Tomaszewski, student biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, wykonujący pod moją opieką swoją pracę magisterską, oraz dr Michał Góralski, pracownik techniczny Pracowni Genomiki. K. Tomaszewski nie tylko obronił swoją pracę z oceną bardzo dobrą, ale został również współautorem publikacji. Nad manuskryptem pracowaliśmy wspólnie z dr M. Marcinkowską-Swojak i dr hab. P. Kozłowskim, pozostali współautorzy zapewнили dodatkowy wkład merytoryczny na etapie dyskusji wyników. Opisana praca nie była wyłącznie pracą metodyczną, część wynikowa zawierała bowiem rezultaty analiz częstości występowania mutacji oraz informacje na temat liczby kopii genu *NPM1* w badanej grupie pacjentów. Grupa badana liczyła 83 osoby i uwzględniała nie tylko różne podtypy AML, ale także kilka innych schorzeń układu rozrostowego krwi. Mutacje zostały zidentyfikowane wyłącznie u pacjentów z AML, przy czym częstość występowania mutacji wynosiła 25%, co odpowiada dolnej granicy zakresu częstości tej mutacji w AML opisywanej w literaturze (Falini B et al., 2007). W przypadku podtypu FAB M1 liczba mutacji była najwyższa (36%). Obecność mutacji w *NPM1* skorelowałam z obecnością mutacji *FLT3*-ITD oraz wyższą liczbą białych krwinek. W żadnym przypadku nie stwierdziliśmy zmian liczby kopii genu *NPM1*, przez co możemy wnioskować, że zmiany ekspresji genu *NPM1*, wykryte w AML w dwóch innych pracach z cyklu składającego się na osiągnięcie (poz. 4.4 i 4.5), nie wynikają ze zmian na poziomie genomu. Charakterystyka badanej grupy pacjentów pod względem statusu *NPM1* umożliwiła mi wyłonienie podgrup *NPM1*+ i *NPM1*- w analizach, które wykonałam na potrzeby prac nr 4.4, 4.5 i 4.7 (Ryc. 1).

Badania prowadziłam na materiale zbieranym w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2006-2013. Na początku tego okresu w szpitalu dopiero wprowadzano do diagnostyki metody cytogenetyczne, a jedyną rutynowo badaną (metodą PCR) mutacją w przypadku AML była duplikacja tandemowa w genie *FLT3* (*FLT3*-ITD). Ponieważ od tego czasu ukazało się wiele publikacji na temat występowania w AML całego spektrum mutacji somatycznych, a ich

współwystępowanie często wpływa na rokowanie, postanowiłam sprawdzić jakie jeszcze mutacje, poza tymi znalezionymi w *NPM1* i *FLT3*, znajdują się w genomach pacjentów z badanej grupy. Aby zrobić to w sposób jak najbardziej kompleksowy zamierzałam wykorzystać sekwencjonowanie pełnych eksomów pacjentów. Środki na sfinansowanie tego zadania udało mi się pozyskać w ramach grantu NCN MINIATURA pt. „Analiza eksomów pacjentów z ostrą białaczką szpikową” (nr DEC-2017/01/X/NZ2/01906). Aby jak najlepiej wykorzystać te środki wspólnie z prof. dr hab. Piotrem Kozłowskim i jego doktorantką, Katarzyną Klonowską, opracowałam metodę o nazwie MTTE (ang. *Multipoint Test for Targeted-enrichment Efficiency*), służącą do oceny efektywności procesu wzbogacania bibliotek DNA w eksom. Jest to metoda wykorzystująca MLPA oraz rozdział produktów amplifikacji za pomocą elektroforezy kapilarnej. Pozwala ona stwierdzić, czy biblioteka poddana wzbogaceniu nadaje się do sekwencjonowania. Dotychczas dostępne do tego celu narzędzia opierały się wyłącznie na metodach qPCR. Brak zastosowania tego rodzaju narzędzia sprawia, że sukces procedury wzbogacania można ocenić dopiero po wynikach sekwencjonowania, które jest metodą kosztowną. Nieefektywne wzbogacenie powoduje, że uzyskuje się zbyt małe pokrycie sekwencjonowanego DNA, niewystarczające do stwierdzenia obecności mutacji i cały eksperyment trzeba powtórzyć. Przygotowując nowe narzędzie zaprojektowaliśmy sondy specyficzne dla obszarów genomu zawierających geny oraz dla regionów pozagenowych. Do przetestowania metody użyliśmy trzech bibliotek DNA, które przygotowałam z dwóch próbek AML oraz jednej próbki kontrolnej, a następnie wzbogaciłam w eksom za pomocą rekomendowanego do tego celu zestawu odczynników TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina). Skuteczność metody MTTE potwierdziliśmy za pomocą ilościowego PCR oraz przez porównanie z wynikami sekwencjonowania każdej z badanych próbek w trzech wersjach: (1) przed wzbogacaniem; (2) po pierwszym i (3) po drugim etapie wzbogacania w eksom. Uzyskane wyniki opisaliśmy w pracy Klonowskiej K. et al. 2016 (poz. 4.3 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). W pracy tej jestem drugim autorem. Mój wkład obejmował udział w planowaniu eksperymentów i omawianiu ich wyników, a także prace eksperymentalne związane z przygotowaniem, wzbogacaniem i sekwencjonowaniem bibliotek DNA.

Analiza transkryptomyczna AML z zastosowaniem mikromacierzy

Opanowanie technologii mikromacierzy oraz metod analizy danych mikromacierzowych pozwoliło mi przejść do kolejnego etapu prac, jakim było określenie profilu ekspresji genów u pacjentów z AML. Wyniki badań zostały opublikowane w roku 2018 w *International Journal of Oncology* (poz. 4.4 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). W pracy tej miałam wiodący udział, co potwierdza fakt, że jestem jej pierwszym i korespondującym autorem. Brałam udział w pisaniu projektu, który sfinansował badania, wykonałam osobiście wszystkie eksperymenty mikromacierzowe, nadzorowałam pracę dwójki studentów, którzy w ramach swoich prac magisterskich wykonali analizy real-time PCR, przeanalizowałam wyniki, opracowałam rysunki i napisałam manuskrypt.

Zaprojektowane i wydrukowane przeze mnie mikromacierze zawierały sondy oligonukleotydowe komplementarne do ponad 900 genów, kodujących m.in. białka związane z procesami różnicowania i dojrzewania komórek hematopoetycznych, apoptozą i transformacją białaczkową. Były wśród nich znane onkogeny, ale też wiele genów, których udział w rozwoju AML był tylko postulowany. Jako kontroli pozytywnych użyłam sond komplementarnych do genów ludzkich o tzw. ekspresji konstytutywnej, kodujących białka

niezbędne do podtrzymywania podstawowych funkcji komórki (ang. *housekeeping genes*). Kontrole negatywne z kolei stanowiły sondy zaprojektowane do wykrywania specyficznych genów roślinnych i bakteryjnych. Zarówno projekt mikromacierzy jak i dane uzyskane z ich zastosowaniem zdeponowałam w ogólnodostępnej bazie ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress, nr akcesyjne A-MEXP-2220 i E-MTAB-5434), utworzonej i prowadzonej przez Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej - Europejski Instytut Bioinformatyki (ang. *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute*, EMBL-EBI). Badania przeprowadzone zostały dla grupy 33 pacjentów, u których zdiagnozowano AML oraz 15 zdrowych ochotników. Aby zminimalizować heterogenność badanej grupy, zgodnie z założeniami projektu do badania wybraliśmy wyłącznie pacjentów z podtypami FAB M1 i M2. W przypadku tych podtypów AML blokada różnicowania komórek następuje na wczesnym etapie granulopoezy, a komórki białaczkowe stanowią zwykle większość komórek krwi i szpiku. RNA wyizolowany z badanych próbek przepisywałam na cDNA oraz znakowałam fluorescencyjnie. Dodatkowym czynnikiem, który miał redukować zmienność techniczną było zastosowanie jako referencji RNA wyizolowanego z linii komórkowej HL-60. W dwukanałowym eksperymencie mikromacierzowym wszystkie próbki badane, zarówno AML jak i kontrolne, były znakowane tym samym barwnikiem (AlexaFluor 647) podczas gdy RNA pochodzący z komórek HL-60 innym barwnikiem (AlexaFluor 555). Na każdej mikromacierzy hybrydyzowałam jedną próbkę badaną oraz próbkę referencyjną HL-60. Mimo zastosowanych zabiegów nie ustrzegłam się jednak szeregu problemów technicznych, które sprawiły, że z ostatecznego zbioru mikromacierzy przeznaczonych do analizy trzeba było odrzucić blisko połowę, która nie spełniała przyjętych parametrów jakościowych.

Ostatecznie, na podstawie analizy wyników ponad setki mikromacierzy wyłoniłam 83 geny o najbardziej zmienionym poziomie ekspresji w AML względem próbek kontrolnych (ang. *differentially expressed genes*, DEGs). 43% genów z tego zbioru kodowało białka pośredniczące w transdukcji sygnałów regulującej takie procesy jak wzrost komórki, proliferacja, adhezja i apoptoza. Co ciekawe 12% genów kodowało białka związane z organizacją i funkcjonowaniem cytoszkieletu, a 14,5% genów (wszystkie obniżone w AML) białka związane z odpowiedzią immunologiczną i stanem zapalnym. Podwyższony poziom ekspresji wykazywały geny kodujące znane białka związane z nowotworzeniem i transformacją białaczkową, np. *CEBPA*, *KRAS*, *MYC*, *KIT*, *MYH11*, *MN1*, *MPO*, *SET* czy *HOXA10*. Inne geny stanowiły potencjalne biomarkery, np. *CDK6* kodujący regulator cyklu komórkowego, *ANGPT1* kodujący angiopoetynę, białko regulujące proces angiogenezy, czy *STMN1* kodujący statminę, białko regulujące szybkie zmiany w organizacji mikrotubul w odpowiedzi na zmieniające się potrzeby komórki. *STMN1*, gen o najsilniej zwiększonej ekspresji w AML w naszych badaniach był opisany w literaturze jako ulegający wysokiej ekspresji w ostrych białaczkach, chłodziakach i intensywnie proliferujących komórkach (Rowlands DC et al., 1995, Roos G et al., 1993). Z tego względu rozważany był jako biomarker AML i potencjalny cel terapeutyczny. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają zasadność tych rozważań. Dodatkowa analiza z użyciem metody real-time PCR potwierdziła statystycznie istotny wzrost poziomu ekspresji *STMN1* w AML względem zdrowych kontroli. Do genów o obniżonej ekspresji w AML należały m.in. geny kodujące białka związane z odpowiedzią obronną oraz regulatory różnicowania i proliferacji komórek (m.in. *LYZ*, *LTB*, *IFITM*, *S100A9*, *PTPRE*, *TMSB4X*).

Istotną wartością naszych badań było wskazanie potencjalnej roli innych czynników, dotychczas nie wiązanych bezpośrednio z patogenezą AML, takich jak wzrost ekspresji genów

ENO1 czy *RPLP0*, raportowany w literaturze, ale dla innych nowotworów (Tsai ST et al., 2010, Artero-Castro A et al. 2011), czy supresja kodującego fikolinę 1 genu *FCN1*, na temat którego w momencie publikowania naszych wyników nie było żadnych doniesień w kontekście AML. Warto wspomnieć, że niedawno ukazała się praca innego polskiego zespołu, który podejmuje ten temat, postulując stosowanie niskiego poziomu fikoliny 1, lektyny o właściwościach antybakteryjnych i antynowotworowych, w surowicy krwi jako biomarkera AML i cytując naszą pracę jako wspierającą wyniki ich badań (Sokołowska et al., 2020). Autorzy wspomnianej pracy dowiedli, że poziom fikoliny 1 w surowicy jest obniżony w AML nie tylko względem zdrowych kontroli, ale także wobec innych chorób nowotworowych układu krwiotwórczego (Świerzko et al., 2020).

Analiza przeprowadzona z zastosowaniem zaprojektowanej przez nas mikromacierzy dedykowanej AML nie wykazała znaczących różnic w profilu ekspresji genów pomiędzy podgrupami pacjentów, podzielonych ze względu na podtyp FAB, status mutacji genu *NPM1* (znany dzięki wynikom opublikowanym w pracy - [poz. 4.2 cyklu wchodzącego w skład osiągnięcia](#)), *FLT3*-ITD i *RUNX1/RUNX1T1* oraz odpowiedzi na leczenie. Jedynym genem o statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji pomiędzy podgrupami pacjentów okazał się *CPA3*, gen kodujący karboksypeptydazę, specyficznie podwyższony u pacjentów z podwójną mutacją (*FLT3*⁺/*NPM1*⁺) względem pozostałych pacjentów. Gen ten zidentyfikowano wcześniej jako czwarty na liście genów o najwyższej ekspresji w grupie starszych pacjentów z AML i obecnością mutacji *FLT3*-ITD (Whitman et al., 2010). Z zastosowaniem bardziej czułych metod (real-time PCR, dd PCR) pokazaliśmy też, że poziom ekspresji trzech genów, *ANXA3*, *SI100A9* oraz *WT1*, różnił się istotnie pomiędzy podtypem FAB M1 i M2. Analizując ekspresję poszczególnych genów w aspekcie obecności mutacji, zaobserwowałam najwyższy poziom ekspresji genu *STMN1* u pacjentów z mutacją *FLT3*-ITD, ale bez mutacji w *NPM1*, genu *ABL1* u pacjentów z mutacją *FLT3*-ITD, natomiast genu *CAT* u pacjentów bez tej mutacji, niezależnie od statusu *NPM1*. Ekspresję genów *CAT* i *WT1* można było z kolei skorelować z odpowiedzią pacjentów na leczenie. Poziom *CAT* był najwyższy u pacjentów, którzy uzyskali remisję całkowitą po zastosowaniu chemioterapii, natomiast poziom *WT1* przeciwnie - był tym wyższy im większa była oporność pacjentów na leczenie. Stwierdziłam też korelację pomiędzy wysoką liczbą białych krwinek (ang. *white blood count*, WBC) a podtypem FAB M1 oraz obecnością mutacji *NPM1* i *FLT3*-ITD.

Odrębnym elementem opisywanej pracy było porównanie naszych rezultatów z rezultatami innych badaczy, uzyskanych z zastosowaniem komercyjnych mikromacierzy, a także wyników uzyskanych przez nas na poziomie transkryptomu z opublikowanymi wcześniej wynikami badań proteomicznych przeprowadzonych dla tej samej grupy pacjentów (Luczak M et al., 2012). Zgodność naszych wyników z wynikami trzech innych badań transkryptomu AML wynosiła 47,8-51.9% i była wyższa niż zgodność wyników pomiędzy trzema porównywanymi z naszym zestawami danych. Wyłoniłam też grupę 45 genów o zgodnym trendzie ekspresji we wszystkich badaniach, które określiłam mianem najsilniejszych kandydatów na biomarkery AML. Porównanie wyników transkryptomicznych i proteomicznych pokazało zgodność na poziomie ok. 50%, trzeba jednak dodać, że porównanie to można było przeprowadzić tylko dla niewielkiego podzbioru danych, dla których dysponowaliśmy danymi zarówno dla genu jak i dla białka. Jednym z najciekawszych wyników były te otrzymane metodą ddPCR dla genu *ANXA3*, którego poziom był statystycznie istotnie wyższy u pacjentów z podtypem FAB M2 w porównaniu z M1. Odpowiadało to w pełni wnioskowi płynącemu z analiz proteomicznych, które wskazały aneksynę 3 jako jedno z pięciu białek różnicujących oba podtypy choroby.

Przy okazji, przygotowując się do badań metodami real-time PCR, przeprowadziłam wstępną analizę ekspresji czterech genów (*ACTB*, *GAPDH*, *PGK1* i *PPIA*) uważanych za geny o tzw. konstytutywnej ekspresji i w związku z tym powszechnie stosowanych jako geny referencyjne. Okazało się, że tylko dwa z nich, *PGK1* i *PPIA*, cechowały się stabilną ekspresją w badanych próbkach, natomiast *GAPDH* znalazł się na liście genów różnicujących AML i zdrowe kontrole. Pokazuje to jak bardzo istotna jest selekcja optymalnego genu referencyjnego. Doświadczenia te wykorzystałam również w kolejnej pracy, w której użyłam metody ddPCR do oceny poziomu ekspresji alternatywnych transkryptów genu *NPM1*. Eksperymenty real-time PCR wykonane zostały przez dwoje magistrantów (Marzenę Wojtaszewską i Marka Milewskiego) i stały się tematem ich prac magisterskich.

Badanie poziomu ekspresji alternatywnych transkryptów genu *NPM1*

Ponieważ wyniki analizy mikromacierzowej pokazały, że *NPM1*, jeden z najczęściej zmutowanych genów w AML, ulegał w komórkach białaczkowych badanych przez nas pacjentów podwyższonej ekspresji, postanowiłam bliżej przyjrzeć się temu zagadnieniu. Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały na wysoką ekspresję *NPM1* raczej w guzach litych (referencje nr 19-27 z pracy – poz. 4.5 cyklu), natomiast w AML większą wagę przywiązywano do obecności mutacji zmieniającej lokalizację wewnątrzkomórkową białka. Z przeglądu literatury wynikało, że w wyniku alternatywnego splicingu w komórkach powstają co najmniej trzy różne transkrypty genu *NPM1*, natomiast bazy danych pokazywały ich różną liczbę (8 wg NCBI Gene, 12 wg Ensembl). Dane eksperymentalne na temat poziomu ekspresji poszczególnych transkryptów były bardzo skąpe i ograniczały się do dwóch, rzadziej trzech transkryptów (Zajac M et al., 2017). Co więcej, w nomenklaturze kodowanych przez nie izoform białek panował chaos. Praca, której się podjęłam miała na celu uporządkowanie informacji w tym zakresie oraz dostarczenie nowych danych na temat względnego poziomu ekspresji poszczególnych transkryptów *NPM1*. Do tego celu postanowiłam użyć techniki emulsyjnego (ddPCR). Porównując sekwencje genu oraz jego izoform zaprojektowałam trzy pary starterów, za pomocą których precyzyjnie określiłam poziom ekspresji trzech alternatywnych transkryptów, *NPM1.1*, *NPM1.2* oraz *NPM1.3* w grupie 66 pacjentów i 16 zdrowych ochotników.

Grupa pacjentów liczyła 57 osób ze zdiagnozowaną AML (FAB M0-M5), 8 osób z ostrą białaczką limfoblastyczną typu B (ang. *acute lymphoblastic leukemia, B-cell type, ALL-B*) i jedną osobę z tzw. ostrą białaczką bifenotypową (ang. *biphenotypic acute leukemia*), prezentującą cechy typowe zarówno dla AML jak i ALL. We wszystkich próbkach transkrypt *NPM1.1* charakteryzował się najwyższą ekspresją. Poziom *NPM1.1* był ok. 30-krotnie wyższy od poziomu *NPM1.2* oraz 3-krotnie wyższy od *NPM1.3*. Transkrypt *NPM1.3*, kodujący krótszą izoformę białka, jest pozbawiony ostatniego eksonu, w którym zlokalizowane jest najczęstsze miejsce mutacji. W obu rodzajach ostrej białaczki ekspresja wszystkich trzech transkryptów była podwyższona względem zdrowych kontroli. Pomiędzy próbkami AML i ALL oraz pomiędzy podtypami AML nie stwierdziłam istotnych różnic. Obecność mutacji w *NPM1* miała statystycznie istotny związek z poziomem akumulacji wyłącznie jednego transkryptu, *NPM1.2*, który był obniżony w próbkach z mutacją do poziomu podobnego do obserwowanego u osób zdrowych. Wysoką ekspresję *NPM1.1* oraz *NPM1.3* w momencie diagnozy skorelowałam z krótszym okresem przeżycia wolnego od choroby (ang. *disease-free survival, DFS*), a *NPM1.1* także z krótszym okresem całkowitego przeżycia (ang. *overall survival, OS*) badanych pacjentów. Z klinicznego punktu widzenia istotna była także informacja o spadku

ekspresji wszystkich trzech transkryptów *NPM1* w trakcie remisji całkowitej oraz ponowny wzrost ekspresji w czasie wznowy choroby. U pacjentów opornych na chemioterapię wysoki poziom transkryptów *NPM1* utrzymywał się także po leczeniu.

Ponieważ dla części badanych pacjentów (27 osób, AML FAB M1 i M2) udało nam się wykonać analizę transkryptomu metodą RNA-seq, wykorzystałam te dane w celu określenia poziomu ekspresji genu *NPM1* oraz jego izoform względem innych genów podlegających transkrypcji. Okazało się, że *NPM1* należy do 124 genów o najwyższym poziomie ekspresji w AML oraz do ok. 180 genów o najwyższym poziomie ekspresji w próbkach kontrolnych oraz próbkach AML po leczeniu. Analizując dane na poziomie izoform udało nam się określić względną ekspresję 11 różnych transkryptów genu *NPM1*. Analizy te były zgodne z wynikami analiz ddPCR i pokazały, że transkrypt *NPM1.1* odpowiada za ok. 63% ekspresji całego genu w AML i ok. 56% w próbkach kontrolnych. Dodatkowo wykazałam wysoki poziom jeszcze jednego transkryptu, *NPM1.9*, opisanego w bazie Ensembl jako niekodujący. Ponieważ transkrypt ten stanowił ok. 30% całkowitej ekspresji genu *NPM1* można przypuszczać, że nie jest on jedynie efektem ubocznym wadliwej transkrypcji i może pełnić ważną rolę biologiczną. Proporcje pomiędzy poszczególnymi izoformami genu były podobne, zarówno w AML jak i próbkach kontrolnych. Wyjątkiem była jedna próbka AML, w której wykryliśmy znaczące odchylenia w poziomach ekspresji dwóch transkryptów, *NPM1.2* i *NPM1.9*. Wstępna analiza poziomu ekspresji genów kodujących czynniki splicingowe sugerowała, że może to mieć związek z podwyższoną ekspresją genu *SRSF8*.

Opisane wyniki, stanowiące pierwsze tak wyczerpujące opracowanie na temat ekspresji genu *NPM1*, zostały opublikowane w 2018 r. w *Journal of Translational Medicine* (poz. 4.5 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). Jestem pierwszym i korespondującym autorem tej pracy. Zgodnie z opisem zawartym w sekcji *Authors' contributions* byłam odpowiedzialna za zaprojektowanie badań, wykonanie wszystkich eksperymentów i analiz statystycznych oraz za napisanie manuskryptu.

Analiza poziomu ekspresji genów kodujących białka z rodziny BCL2

Zaburzenia procesów różnicowania, proliferacji i apoptozy są jednymi z najbardziej typowych cech komórek nowotworowych. Zablockowanie apoptozy nie tylko zapewnia komórkom rakowym nieśmiertelność, ale jest jedną z przyczyn niepowodzenia terapii. W przypadku AML podstawą chemioterapii indukującej jest antybiotyk antracyklinowy (np. daunorubicyna, idarubicyna) skojarzony z arabinozydem cytozyny (Ara-C) stosowanym w schemacie (3+7) (Wierzbowska A, 2015, Szmajda 2017). Leczenie cytostatykami ma jednak ograniczoną skuteczność, a powoduje wiele skutków ubocznych, przez co często nie jest możliwe do zastosowania u starszych pacjentów, o gorszej kondycji zdrowotnej, obciążonych chorobami współistniejącymi. Stąd też w ostatnich latach podjęto liczne próby opracowania terapii celowanych, np. w metylotransferazy DNA, kinazy czy białka związane z apoptozą (Wei AH, et al., 2017). W maju 2021 wprowadzono w Polsce refundowaną przez Ministerstwo Zdrowia terapię inhibitorem kinaz - midostauryną u pacjentów z AML z mutacją w genie *FLT3* (<https://hematoonkologia.pl/aktualnosci/news/id/4568-pierwsza-i-jedyna-terapia-celowana-w-leczeniu-aml-flt3-oraz-advsm-dostepna-dla-polskich-pacjentow>). Intensywnie prowadzone są, również w kontekście terapii AML, badania aktywności inhibitorów BCL2 (venetoclax) oraz innych białek antyapoptotycznych (Choi JH et al., 2020).

Rodzina BCL2 obejmuje zarówno białka pro- jak i antyapoptotyczne, a ich wzajemne relacje i interakcje z innymi czynnikami decydują o tym, czy komórka wejdzie na ścieżkę programowanej śmierci. Na temat związku białek BCL2 i kodujących je genów z rozwojem AML powstało sporo prac, ale żadna z nich nie prezentowała kompleksowego podejścia do tematu. W większości przypadków prace te skupiały się na roli samego BCL2, ewentualnie kilku innych członków rodziny. W związku z tym postanowiliśmy w sposób systematyczny przeanalizować profil ekspresji genów z rodziny *BCL2* i ocenić na ile jest on zaburzony w AML. Wyniki badań zostały opublikowane w *Cancers (Basel)* w czerwcu 2021 r. (4.7 pozycja cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego).

Korzystając z danych RNA-seq wygenerowanych w Pracowni Genomiki ICHB PAN dla grupy 27 pacjentów z AML, FAB M1 i M2, przeanalizowałam poziom ekspresji wszystkich (26) genów z rodziny *BCL2*. Okazało się, że tylko pięć z nich (*MCL1*, *BAX*, *BCL2A1*, *BCL2L1* i *BID*) ulega wysokiej ekspresji (zarówno w próbkach AML jak i kontrolnych), a *BCL2*, najbardziej znany przedstawiciel rodziny, wcale nie należy do tej grupy. W AML część genów proapoptotycznych ulegało supresji, natomiast większość genów antyapoptotycznych aktywacji względem zdrowych kontroli. Statystycznie istotna była jednak tylko supresja w AML trzech genów proapoptotycznych: *BMF*, *BNIP1* i *HRK*, kodujących tzw. białka „*BH3-only*”. Rolą tych białek jest tworzenie heterodimerów z białkami antyapoptotycznymi i przez to blokowanie ich funkcji. Wyniki te sugerują, że spowodowany obniżoną transkrypcją niedobór białek „*BH3-only*”, powodujący uwolnienie białek antyapoptotycznych, może być odpowiedzialny za upośledzenie apoptozy w AML.

Ponieważ białka z rodziny BCL2 są rozważane jako cele terapeutyczne, postanowiłam sprawdzić, czy istnieją różnice w poziomie ekspresji kodujących je genów między podgrupami pacjentów różnie reagujących na chemioterapię. Okazało się, że jedyną istotną statystycznie różnicą był podwyższony poziom genu *BCL2L1* u pacjentów opornych na chemioterapię. Gen *BCL2L1*, prezentujący w AML najwyższy poziom ekspresji z całej rodziny genów, koduje antyapoptotyczne białko BCL-XL. Gen ten jest podwyższony w wielu nowotworach, a w raku jelita postuluje się dominującą rolę białka BCL-XL jako czynnika gwarantującego przeżycie komórek (Scherr AL, et al. 2020). O istotnej funkcji BCL-XL świadczy dodatkowo fakt, że utrata kodującego je genu u myszy jest letalna podczas gdy utrata genu *Bcl2* tylko skraca czas życia osobnika (Rinkenberger JL, et al. 2000). Ciekawą właściwością genu *BCL2L1* jest też to, że ulega on alternatywnej transkrypcji, a poszczególne transkrypty kodują białka o właściwościach anty- lub proapoptotycznych. Analizując dane RNA-seq na poziomie izoform genów, odkryłam, że u chorych z AML większy udział niż u osób zdrowych miały transkrypty kodujące najdłuższe białko, które jest inhibitorem apoptozy. Poziom ekspresji *BCL2L1* różnił się znacznie pomiędzy poszczególnymi pacjentami, co wskazuje na fakt, że aktywacja tego genu jest tylko jednym z czynników, który może przyczyniać się do braku odpowiedzi na leczenie. Pragnąc zgłębić tę kwestię, przeanalizowałam poziom ekspresji dwudziestu genów kodujących białka wchodzące w interakcje z BCL-XL. U chorych opornych na leczenie poziom *BCL2L1* był silnie pozytywnie skorelowany z poziomem ekspresji genu *BECN1*, kodującego beclinę 1, białko związane z autofagią, oraz protoonkogenu *MDM2*, a negatywnie skorelowany z poziomem ekspresji genu *BID*, kodującego aktywator apoptozy.

Analizując retrospektywnie dane na temat przeżycia pacjentów i porównując je z danymi dotyczącymi ekspresji genów, odkryłam, że wysoki poziom genów z rodziny *BCL2*, zwłaszcza *BCL2L13* i *BIK*, w momencie diagnozy choroby, może być wyznacznikiem

niekorzystnego rokowania. Mając do dyspozycji dane z sekwencjonowania eksomów pacjentów, które wykonałam w ramach grantu NCN Miniatura, przeanalizowałam także profil mutacji w genach z rodziny *BCL2*, ale nie stwierdziłam w żadnym z nich istotnej biologicznie mutacji. U wielu pacjentów zidentyfikowałam za to zmiany w genach kodujących białka związane ze splicingiem oraz w genach opisanych jako często podlegające mutacjom w AML. Udało mi się znaleźć szereg zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów z rodziny *BCL2* a obecnością poszczególnych mutacji. Przykładem może być związek pomiędzy ekspresją *BCL2L1*, *BID*, *BOK* i *HRK* a obecnością mutacji w genach *BRCA2* i *RUNX1* oraz relacja pomiędzy ekspresją *BCL2L1* i *BCL2L11* a obecnością mutacji w genie *IDH2*.

Praca opublikowana w *Cancers (Basel)* stanowi ostatnią (4.7) pozycję cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego. Jestem pierwszym i korespondującym autorem tej pracy. Zgodnie z opisem zawartym w sekcji *Authors' contributions* byłam odpowiedzialna za planowanie pracy, przeprowadzenie eksperymentów, wykonanie i wizualizację analiz oraz napisanie manuskryptu.

Podsumowanie

Literatura naukowa dotycząca AML jest niezwykle obszerna. Badania AML, przeprowadzane na coraz bardziej imponujących liczbowo grupach pacjentów, często w ramach dużych międzynarodowych konsorcjów, publikowane są w prestiżowych czasopismach, takich jak *New England Journal of Medicine (NEJM)*, *Nature*, *Science*, *Blood* czy *Leukemia*. Badania, których jestem autorem nie są może tak imponujące pod względem skali, ale z pewnością dokładają kilka elementów do złożonego obrazu molekularnego AML, który nadal nie jest do końca poznany. Aktualny stan wiedzy na temat AML, wyłaniający się z badań transkryptomicznych, także tych prowadzonych przeze mnie, starałam się podsumować w pracy przeglądowej w *Journal of Oncology*, której jestem jedynym autorem (poz. 4.6 cyklu publikacyjnego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego). Motywem przewodnim tej pracy, który znalazł odzwierciedlenie w tytule (*Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies*) jest to, że nie tyle mutacje, co ich konsekwencje w postaci zmienionej struktury i ekspresji genów, a docelowo zaburzonej dostępności lub funkcji białek, mają znaczenie dla patogenezy i rozwoju ostrej białaczki szpikowej. W obrazie ekspresji genów można doszukiwać się szeregu nieprawidłowości, które pomagają wyjaśniać przyczyny choroby, typować potencjalne cele terapeutyczne, wnioskować o dalszym rozwoju choroby oraz przewidzieć jak pacjent zareaguje na leczenie.

Warto podkreślić, że wszystkie badania opisane w ramach osiągnięcia naukowego zostały całkowicie wykonane w Polsce, własnymi siłami i z wykorzystaniem aparatury zgromadzonej w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki, utworzonym przez Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w konsorcjum z Instytutem Informatyki Politechniki Poznańskiej. Część aparatury sfinansował również Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, jako konsorcjant Regionalnego Centrum Genomiki.

Perspektywy

Rozwój technologii mikromacierzowych, a następnie sekwencjonowania nowej generacji, sprawił, że można było coraz bardziej precyzyjnie określać profile ekspresji genów w AML, ujawniając niespodziewaną heterogenność tej choroby. Wyróżnienie nowych podtypów AML usprawniło diagnostykę i poprawiło skuteczność leczenia niektórych z nich.

Nadal jednak pozostaje wiele do zrobienia. Wciąż mało wiadomo na temat roli długich niekodujących RNA w rozwoju i przebiegu AML. Mało jest też badań wykorzystujących analizę pojedynczych komórek (ang. *single cell analysis*). Ponieważ w ICHB PAN właśnie powstaje dedykowana temu pracownia, chciałabym w przyszłości skorzystać z jej zasobów i przeprowadzić takie analizy z wykorzystaniem materiału od nowych pacjentów z AML. AML jest chorobą klonalną i zwykle u jednego pacjenta istnieje kilka subpopulacji komórek białaczkowych, które ulegają dynamicznym zmianom indukowanym przez leczenie. Podejścia, które stosowałam do tej pory pozwalały jedynie na ogląd całości i ocenę profilu ekspresji genów oraz identyfikację mutacji we wszystkich komórkach razem.

Kluczowe wydaje się też poszukiwanie nowych strategii leczenia AML. Ich opracowanie i testowanie wymaga analiz prowadzonych na liniach komórkowych i modelach zwierzęcych. Mając do dyspozycji narzędzia genomiczne i sporą już wiedzę na temat molekularnych podstaw AML, chciałabym w przyszłości włączyć się w tego rodzaju badania. Być może przydatne do tego celu będzie nawiązanie współpracy z innymi ośrodkami w Polsce lub za granicą. Na obecnym etapie życia jestem bardziej mobilna niż krótko po doktoracie. Nawiązałam już współpracę z profesorem Ryo Yamada z Uniwersytetu Medycznego w Kyoto (Unit of Statistical Genetics, Center for Genomic Medicine, Graduate School of Medicine Kyoto University), w ramach której będę realizować bioinformatyczny projekt poświęcony multiomicznym analizom ostrej białaczki szpikowej, w oparciu o dane własne jak i dostępne w repozytoriach.

Dodatkowo, będąc bezpośrednio zaangażowana w realizację projektu ECBiG, którego celem jest stworzenie Genomicznej Mapy Polski (GMP), chciałabym przeprowadzić analizy na temat częstości występowania związanych z predyspozycjami do chorób hematologicznych mutacji germinalnych oraz SNP w populacji polskiej. Badania takie były już prowadzone na świecie i jest znanych całe spektrum mutacji, których obecność może się wiązać z ryzykiem zachorowania na zespoły mielodysplastyczne czy AML. Ponieważ tego rodzaju mutacje są rzadkie, analiza wymaga większej grupy badanej. GMP ma powstać w oparciu o pełne sekwencje genomowe 5 tys. mieszkańców naszego kraju i jest to jak dotąd największy projekt uwzględniający sekwencjonowanie pełnych genomów w Polsce. Dodatkową zaletą projektu z punktu widzenia badań AML, jest powstanie populacji referencyjnej, która będzie mi służyć za punkt odniesienia w analizach, których celem jest identyfikacja potencjalnych nowych mutacji, o nieznanym dotąd związku z AML.

AML jest niezwykle ciekawym modelem badawczym. Na jego podstawie można bowiem prześledzić w jaki sposób zaburzenia procesu hematopoezy kierują komórki na różnych etapach różnicowania na drogę transformacji nowotworowej. Ponieważ dzieje się to rzadko, istnieją mechanizmy zapewniające równowagę między procesami różnicowania i dojrzewania komórek krwiotwórczych a procesem samoodnawiania się komórek macierzystych szpiku. W szerszym kontekście jest to doskonały model do badania procesów związanych z regeneracją komórek.

Mimo, iż od kilku lat nie jestem już zatrudniona w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, nadal utrzymuję współpracę z lekarzami hematologami i mam możliwość pozyskania nowego materiału biologicznego do kolejnych badań. Ich prowadzenie będzie jednak wymagało zdobycia środków finansowych, o które mam zamiar się ubiegać w ramach grantów, m.in. NCN.

Opis przebiegu kariery naukowej i pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Wprowadzenie

Pisząc, że biologia była moją pasją od dziecka, skłamałabym. Już w szkole podstawowej zainteresowania miałam bardzo wszechstronne, od plastyki po literaturę i języki obce. Jako laureatka wojewódzkiej olimpiady z j. polskiego w pełni świadomie wybrałam profil humanistyczny w Liceum SS. Urszulanek U. Rz. w Poznaniu. Do trzeciej klasy włącznie planowałam studiować konserwację zabytków i uczyłam się rysunku, ale w końcu dotarło do mnie, że istnieje tylko jedna słuszna droga – medycyna. Decyzja o zmianie profilu była na tyle późna, że nie udało mi się dostać na Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, choć zabrakło mi naprawdę niewiele (na egzaminie wstępnym uzyskałam 99 punktów, a przyjmowano od 103). Biologia na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza była moim drugim wyborem i dopiero na pierwszym roku studiów obudziła się we mnie pasja biologiczna. Dodatkowej motywacji dostarczyło mi dwoje nauczycieli z liceum, jednocześnie związanych ze światem akademickim i naukowym – biolog, prof. dr hab. Teresa Mossor-Pietraszewska, która zachęciła mnie do wyboru specjalności biologii molekularnej, oraz chemik, dr Zbigniew Michalski, za którego radą trafiłam już po studiach do Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Po drodze miałam więcej dobrych wzorców, w tym prof. Artura Jarmołowskiego (promotora mojej pracy magisterskiej), dr hab. Michała Sikorskiego, prof. ICHB PAN (promotora pracy doktorskiej), prof. dr hab. Andrzeja Legockiego (dyrektora ICHB PAN i kierownika zakładu, w którym zaczęłam pracę nad doktoratem) i prof. dr hab. Marka Figlerowicza, obecnego dyrektora ICHB PAN i kierownika Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej, w którym pracuję od czasu uzyskania stopnia doktora do chwili obecnej. Między innymi dzięki Nim wykonuję teraz pracę, którą lubię i nie wyobrażam sobie żadnej innej.

Studia biologiczne zakończyłam z wyróżnieniem i bez żadnej przerwy mimo iż na początku czwartego roku urodziłam pierwsze dziecko. Dobre wyniki w nauce były podstawą do uzyskania od trzeciego roku indywidualnego toku studiów. Umożliwiło mi to wybór przedmiotów dodatkowych, których nie przewidywał program dla studentów biologii molekularnej. W trakcie realizacji pracy magisterskiej opracowałam pod kierunkiem dr hab. Artura Jarmołowskiego protokół optymalnej nadekspresji genu kodującego ludzkie białko CBP20 w *Escherichia coli* oraz izolacji tego białka z komórek bakteryjnych. W latach późniejszych protokół ten wraz z obrazkowym schematem przygotowania żelu do analizy białek służył pomocą kolejnym rocznikom studentów Wydziału Biologii UAM wykonującym swoje prace badawcze w Zakładzie Ekspresji Genów.

Doktorat

Po zakończeniu studiów postanowiłam kontynuować swoją przygodę z nauką i znalazłam miejsce w kierowanym przez prof. dr hab. Andrzeja Legockiego Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin ICHB PAN. Zajmowałam się badaniem roślinnych białek klasy PR-10 pod opieką dr hab. Michała Sikorskiego, prof. ICHB PAN. Dzięki zastosowaniu metody przeszukiwania bibliotek (ang. *library screening*) cDNA udało mi się zidentyfikować nowe geny kodujące białka z tej rodziny w łubinie żółtym. Przez kolejne lata zajmowałam się analizą aktywności genów *PR-10.2* oraz kodowanych przez nie białek w roślinach, z zastosowaniem takich technik jak analiza aktywności promotora *in vivo* w układzie sprzężonym z genem markerowym w transformowanych roślinach tytoniu, RT-PCR, Northern blot, western blot oraz

wyciszenie genów za pośrednictwem interferencji RNA (RNAi). Odkryłam, że białka PR-10.2, zaklasyfikowane ze względu na podobieństwa strukturalne do grupy białek związanych z patogenezą (PR, ang. *pathogenesis-related*) w warunkach fizjologicznych ulegają ekspresji praktycznie we wszystkich częściach rośliny. Ich aktywność była jednak zależna od stadium rozwojowego i ulegała zmianom pod wpływem zranienia, kwasu salicylowego oraz stresu oksydacyjnego. Wyciszenie jednego z genów z rodziny nie wywoływało zauważalnych zmian w rozwoju rośliny i jej reakcji na stres, co sugerowało, że najprawdopodobniej geny homologiczne kodują białka, które się wzajemnie zastępują. Prace te zaowocowały doktoratem oraz dwiema publikacjami eksperymentalnymi (Pasternak O. et al., 2005, Handschuh L. et al., 2007) i jedną przeglądową w j. polskim (Handschuh L., 1999).

Ostra białaczka szpikowa

Tematyką związaną z ostrą białaczką szpikową zainteresowałam się krótko po doktoracie. W Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICHB PAN) powołano właśnie Centrum Doskonałości CENAT (*Center for Nucleic-Acid Based Technologies*) i wprowadzano nowatorską technologię mikromacierzy DNA. Kierownikiem CENAT-u był dr. hab. Marek Figlerowicz, z którym miałam okazję współpracować pod koniec doktoratu przy wyciszaniu genów roślinnych. Dr hab. Figlerowicz zaproponował mi udział w tworzeniu nowego laboratorium mikromacierzowego, a ja chętnie skorzystałam z tej propozycji. Nie bez znaczenia był fakt, że moja sytuacja rodzinna (w tym momencie już troje dzieci, z czego najmłodsze w wieku kilku miesięcy) nie sprzyjała decyzji o wyjeździe na staż podoktorski.

Dr hab. Figlerowicz podjął również starania o pozyskanie środków na badania w ramach grantu zamawianego pt. „Zastosowanie współczesnej genomiki funkcjonalnej i bioinformatyki do charakteryzacji i tworzenia modeli procesów biologicznych o istotnym znaczeniu w medycynie i rolnictwie”. Z inicjatywy dr hab. Marka Figlerowicza oraz prof. dr hab. Wojciecha Markiewicza, ówczesnego dyrektora ICHB PAN, została nawiązana współpraca pomiędzy Instytutem a Katedrą i Kliniką Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, której kierownikiem był prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki. Współpraca ta zaowocowała powołaniem konsorcjum o nazwie Poznańskie Centrum Genomiki, do którego w późniejszym czasie dołączyła jeszcze Politechnika Poznańska. Jednym z pierwszych zadań konsorcjantów było napisanie wniosku grantowego pt. “Wykorzystanie technologii genomiki funkcjonalnej do stworzenia kompleksowego modelu transformacji nowotworowej. Badania modelowe mechanizmów molekularnych warunkujących rozwój ostrej białaczki szpikowej”, (nr PBZ-MNiI-2/1/2005). Inicjatorem i kierownikiem projektu był dr. hab. Marek Figlerowicz. AML została wybrana jako idealny model badawczy ze względu na dynamiczny rozwój choroby, genezę związaną z zaburzeniami hematopoezy (procesu różnicowania i stałego odnawiania się komórek krwiotwórczych) oraz możliwość pozyskania dużej ilości materiału do badań od pacjentów (z powodu nadmiaru komórek nowotworowych we krwi i szpiku). Rozpoczynając w tym okresie pracę pod kierunkiem dr hab. Marka Figlerowicza, miałam okazję włączyć się zarówno w pisanie wniosku jak i jego realizację jako jeden z głównych wykonawców.

Dzięki współpracy między ICHB PAN a Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu znalazłam też zatrudnienie jako specjalista w Katedrze i Klinice Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego (obecnie Katedrze i Klinice Hematologii i

Transplantacji Szpiku). Zdobyłam dzięki temu nowe doświadczenia związane z pracą w innej jednostce, a zarazem spełniłam dawne marzenia o medycynie. Zaangażowałam się nie tylko w rozwój technologii mikromacierzy, ale także we wprowadzenie nowej tematyki badawczej w ICHB PAN. Materiał zebrany w ramach projektu posłużył do przeprowadzenia badań opisanych w szeregu publikacji, w tym cyklu wchodzącego w skład mojego osiągnięcia naukowego opisanego powyżej.

Pozostałe publikacje związane z ostrą białaczką szpikową dotyczyły badań proteomicznych, w których mój udział był zdecydowanie mniejszy (dwie prace eksperymentalne, Luczak M et al. 2012, Kazmierczak M et al., 2013, oraz jedna przeglądowa w *Contemp. Oncol.*, Luczak M et al. 2012). Przygotowując się do badań AML i optymalizując zaprojektowane do tego celu mikromacierze napisałam też pracę przeglądową pt. „Choroby rozrostowe krwi - analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy” (Handschuh L et al. 2009, *Biotechnologia*), w której jestem pierwszym i korespondującym autorem. Nie zdecydowałam się włączyć tej pracy w skład osiągnięcia naukowego ze względu na fakt, że została napisana w j. polskim i ukazała się w czasopiśmie nieposiadającym wskaźnika IF. W okresie późniejszym, w oparciu o dane pozyskane z sekwencjonowania transkryptomów AML, we współpracy z grupą statystyków z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, powstała praca porównująca metody normalizacji danych RNA-seq (Zyprych-Walczak J et al., 2015).

W trakcie badań AML powstały w ICHB PAN prace licencjacka (Melania Nowicka, Politechnika Poznańska), magisterskie (Piotr Stępiak, UAM; Marzena Pieronkiewicz, UAM; Marek Milewski, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu; Kamil Tomaszewski, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Martyna Machowina, UAM; Monika Hazy, UAM) i doktorska (Tomasz Magacz, ICHB PAN). W przypadku pracy licencjackiej i trzech magisterskich (K. Tomaszewskiego, M. Machowiny i M. Hazy) jestem promotorem, w przypadku pozostałych prac promotorem był prof. dr hab. Marek Figlerowicz, a ja pełniłam nieformalną rolę opiekuna.

Wykorzystanie technologii mikromacierzy

Pierwsze lata po doktoracie upłynęły mi w dużej mierze na zmaganiach z wyzwaniami, które towarzyszyły wprowadzaniu do badań technologii mikromacierzy DNA. Mikromacierze białaczkowe nie były jedynymi mikromacierzami, jakie opracowywałam w tamtym okresie. Pierwsze miały na celu detekcję transpozonów Tc1-2 w genomach ryb. Wyniki zostały opublikowane w pracy Wenne R. et al. (2011), której jestem drugim autorem. Brałam udział nie tylko w projektowaniu i przeprowadzeniu eksperymentu, ale także w opracowaniu wyników i tworzeniu manuskryptu.

Wraz z dr M. Schmidtem oraz grupą statystyków z Uniwersytetu Przyrodniczego zajmowałam się porównaniem metod normalizacji danych pochodzących z komercyjnych mikromacierzy służących do analizy ekspresji genów ludzkich (Schmidt M et al., 2011). Moim zadaniem było wykonanie eksperymentu mikromacierzowego, z którego dane posłużyły do przeprowadzenia analizy porównawczej. Napisaliśmy też wspólnie pracę przeglądową poświęconą tej tematyce (Siatkowski I, et al., 2009). Współpraca z informatykami z Poznańskiego Centrum Superkomputerowo-Sieciowego zaowocowała z kolei trzema pracami poświęconymi idei i organizacji Wirtualnego Laboratorium Genomiki, platformy przeznaczonej do automatycznej analizy danych pochodzących z mikromacierzy (Handschuh L. et al. 2009 i 2010, Cegielska B, 2010). Brałam również udział w pisaniu prac przeglądowych w j. polskim związanych z działaniem i zastosowaniem mikromacierzy, projektowaniem sond

i analizą danych mikromacierzowych. Prace te w większości ukazały się w kwartalniku *Biotechnologia* (Formanowicz P, et al., 2008, Stępiak P et al., 2008, Zmieńko A, et al. 2008, Handschuh L et al., 2009 (dwie różne prace)), stanowiąc użyteczny materiał edukacyjny dla młodych adeptów biologii molekularnej i biotechnologii, o czym wiem od studentów, z którymi miałam styczność w ciągu ostatnich lat.

Najlepiej opublikowaną publikacją mikromacierzową okazała się ta wykonana we współpracy z prof. dr hab. Hieronimem Jakubowskim i jego doktorantką, Dorotą Gurdą (Gurda D, et al. 2015, *Amino Acids*, 50 cytowań). W pracy tej wykorzystaliśmy macierze komercyjne do analizy poziomów mRNA oraz mikroRNA w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) traktowanych w hodowli *in vitro* homocysteiną, tiolaktonem homocysteiny i N-homocysteinylowanym białkiem. Moją rolą było przeprowadzenie eksperymentu mikromacierzowego i analiza jego wyników. Rezultaty badań pokazały, że analizowane związki wywołują ekspresję genów kodujących białka regulujące homeostazę naczyń, indukując zmiany podobne do tych obserwowanych w miażdżycy i chorobie sercowo-naczyniowej. Przeprowadzone badania stały się podstawą dwóch zgłoszeń patentowych w roku 2012. W konsekwencji w 2014 r. Urząd Patentowy RP udzielił nam dwóch patentów:

- „Zastosowanie molekularnych biomarkerów do oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią wywołaną podwyższonym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi”

- „Sposób określania zmian ekspresji cząsteczek miRNA *in vitro* w celu oznaczania wczesnych chorobowych zmian strukturalnych śródbłonna naczyń krwionośnych spowodowanych hiperhomocysteinemią”.

Nie wszystkie projekty mikromacierzowe z różnych względów zostały zakończone publikacjami. Brałam także udział w opracowaniu mikromacierzy służącej do analizy ekspresji roślinnych genów *pr-10* (we współpracy z W. Woronowicz i dr hab. M. Sikorskim, prof. ICHB PAN), a także do analizy genów związanych z rozwojem astmy i alergii (we współpracy z W. Woronowicz i dr hab. M. Sikorskim, prof. ICHB PAN) oraz chorób spichrzeniowych (we współpracy z zespołem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna z Uniwersytetu Gdańskiego). Badania te doprowadziły do powstania jednej pracy magisterskiej (Katarzyna Jezierska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) i dwóch doktorskich (Ewa Piotrowska, Uniwersytet Gdański; Wiesława Włoszczak, ICHB PAN).

Wykorzystanie technologii sekwencjonowania nowej generacji

Mikromacierze po zaledwie 10 latach od ich wprowadzenia do badań biologicznych, zaczęły być stopniowo wypierane przez technologię sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS). Od czasu poznania genomu człowieka technologia ta bardzo dynamicznie się rozwijała, a jej koszty znacząco malały. Idąc w ślady innych ośrodków genomicznych na świecie, postanowiliśmy również w ICHB PAN wprowadzić technologię NGS. Pierwszy wysokoprzepustowy sekwenator (Genome Analyzer Iix, Illumina) udało się nam zakupić pod koniec roku 2010, dzięki środkom pozyskanym w konsorcjum z Politechniką Poznańską na rozwój infrastruktury ECBiG. W 2011 roku uruchomione zostało nowe laboratorium sekwencjonowania. Po Centrum Onkologii w Gliwicach byliśmy drugą jednostką w Polsce posiadającą tego typu aparaturę. Po wcześniejszych doświadczeniach z mikromacierzami, zetknięcie z technologią NGS było stosunkowo łatwe. Pierwsze publikacje

z wykorzystaniem danych wygenerowanych na naszym sekwenatorze zaczęły się ukazywać w latach 2014-2015. W niniejszym rozdziale omawiam krótko te z nich, w których mój udział nie był dominujący, ale obejmował zaprojektowanie i przeprowadzenie eksperymentu NGS.

We współpracy z Centrum Onkologii w Gliwicach opublikowaliśmy dwie prace wykorzystujące metodę immunoprecypitacji chromatyny w połączeniu z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem (ChIP-seq) do analizy interakcji pomiędzy DNA a czynnikami transkrypcyjnymi HSF1 i HSF2 (Korfanty J et al. 2014, Janus P et al., 2015).

We współpracy z zespołem dr hab. Jana Wrzesińskiego, prof. ICHB PAN, przeanalizowaliśmy profil ekspresji krótkich niekodujących RNA w gonadach świni (Kowalczykiewicz D et al., 2014). Udało nam się scharakteryzować trzy klasy małych RNA: piRNA, miRNA oraz tRF, krótkie (30-36 nt) fragmenty RNA o niejasnej funkcji, powstające w sposób powtarzalny na skutek hydrolizy tRNA.

Analiza eksomów, wykonana we współpracy z dr Bartłojem Budnym z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, doprowadziła do identyfikacji mutacji w genach związanych z proteasomem u pacjentów z hemiagenezą tarczycy (Budny B et al., 2017).

Badania transkryptomyczne komórek męskiej linii germinacyjnej (TCam-2), przeprowadzone we współpracy z zespołem prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej z Instytutu Genetyki Człowieka PAN, pozwoliły wyłonić szereg genów regulowanych przez wiążące RNA białka PUM1 i PUM2 (Smialek MJ et al., 2020). Z przeprowadzonych badań wynika, że białka te, mimo wspólnego motywu wiążącego RNA, uczestniczą w regulacji grup genów tylko częściowo nakładających się na siebie, pełnią więc najprawdopodobniej odrębne funkcje w komórkach germinacyjnych.

We współpracy z zespołem dr hab. Macieja Figła, prof. ICHB PAN, opublikowaliśmy dwie prace, w których wykorzystane zostały analizy transkryptomiczne chorób neurodegeneracyjnych powodowanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń. W pierwszej pracy opisane zostały wczesne zmiany transkrypcyjne w młodzieńczej chorobie Huntingtona (HD), wykryte przy użyciu ludzkich linii komórkowych wyprowadzonych z komórek iPS pacjentów z różną liczbą powtórzeń CAG w genie huntingtyny (*HTT*) (Świtońska K, et al., 2019). Zidentyfikowane grupy genów o zmienionej ekspresji wskazywały na udział w patogenezie choroby m.in. zaburzeń szlaków związanych z apoptozą i naprawą DNA. W drugiej pracy obiektem badawczym były myszy z homozygotyczną mutacją typu *knock-in* w genie ataksyny 3 (*ATXN3*). Myszy te stanowią presymptomatyczny model ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3), w której nieprawidłowe białko z przedłużonym traktem poliQ powstaje na matrycy transkryptu ze zwiększoną liczbą powtórzeń CAG. Badania dowiodły, że SCA3 we wczesnej fazie nie wywołuje zmian na poziomie transkryptomu, a jedynie proteomu, powodując zmiany w poziomie akumulacji i fosforylacji białek. Zmiany transkryptomiczne pojawiały się dopiero na dalszych etapach rozwoju choroby (Wiatr K et al., 2019).

Współpraca z kolegami z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN w zakresie transkryptomiki roślin zaowocowała dwoma publikacjami, które ukazały się w roku 2020. W obu pracach obiektem analizy były słabo do tej pory poznane koliste RNA (circRNA) w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. W pierwszej pracy scharakteryzowano grupę circRNA ulegających ekspresji w całej roślinie oraz nieliczne, których ekspresja była specyficzna dla poszczególnych narządów. Zaobserwowano, że zdecydowana większość

circRNA powstaje w roślinach w sposób całkowicie przypadkowy, a tylko niewielki procent w sposób powtarzalny i kontrolowany (Philips A et al., 2020, *Frontiers in Plant Science*). W drugiej pracy analizie poddano 18 mutantów *A. thaliana* pod względem różnych genów związanych ze splicingiem. Okazało się, większość circRNA występowała w więcej niż jednym mutancie, a tylko nieliczne były charakterystyczne dla konkretnych mutantów. Odkryto również, że w mutantach *cbp80*, *c2h2* i *flk* akumulacja circRNA była znacząco zwiększona (Philips A et al., 2020, *Cells*).

Wykorzystanie metod ilościowego PCR

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technologii takich jak mikromacierze i sekwencjonowanie zwykle weryfikuje się za pomocą metod ilościowego PCR (real-time PCR, ddPCR). Metody te zastosowałam z powodzeniem w pracach nr 4.4 i 4.5 z cyklu stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego. Brałam też udział w projekcie, w którym ddPCR był jedyną i docelową metodą oceny ekspresji genów kodujących białka wyselekcjonowane w rezultacie analiz proteomicznych. Projekt, którego kierownikiem jest dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN, miał na celu badanie mechanizmów postawiania przewlekłej choroby nerek w powiązaniu z chorobą sercowo-naczyniową i miażdżycą naczyń krwionośnych. Moim zadaniem było zaprojektowanie eksperymentów ddPCR i nadzór nad wykonaniem i analizą wyników tych eksperymentów, które przeprowadzała doktorantka, Joanna Tracz. Analiza ekspresji badanych genów w leukocytach krwi obwodowej pacjentów potwierdziła wcześniejsze wyniki analiz na poziomie białka, aczkolwiek nie zawsze różnice w poziomie transkryptu były statystycznie istotne między grupami pacjentów o różnym stopniu zaawansowania choroby. Rezultaty badań wskazują na deregulację białek związanych z adhezją i diapedezą leukocytów oraz apoptozą i zostały opisane w publikacji w *Journal of Proteome Research* (Tracz J, et al., 2021).

Metodę ilościowego PCR wykorzystałam również w pilotażowym projekcie realizowanym we współpracy z Polskim Towarzystwem Ochrony Przyrody „Salamandra”. Celem projektu była analiza środowiskowych próbek wody pod kątem obecności DNA żółwia błotnego *Emys orbicularis*, który jest gatunkiem zagrożonym wyginięciem. Pracownicy PTOOP „Salamandra” chcieli sprawdzić czy jest możliwe określenie naturalnych miejsc bytowania żółwia błotnego na podstawie analizy środowiskowego DNA (ang. *environmental DNA*, eDNA). Dwójka stażystów, student biotechnologii UAM i uczennica klasy maturalnej XXVII LO im. Tadeusza Czackiego w Warszawie, pod moim nadzorem wyizolowali eDNA z kilkunastu próbek wody z obszaru Wielkopolski. Następnie przeanalizowali je metodą PCR i real-time PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla DNA *E. orbicularis*, ale w żadnej z nich nie wykryli DNA żółwia błotnego. Potwierdzeniem tego, że metoda działa było wykrycie w kilku próbkach wody DNA bobra. Woda ta pochodziła z zbiorników, w których znajdowano ślady bytności bobrów.

Onkogenomika

Ze względu na własne zainteresowania naukowe, tematyka onkologiczna jest mi szczególnie bliska. Brałam udział w tworzeniu pracy przeglądowej na temat portali i baz danych onkogenomicznych (Klonowska K et al., 2016, *Oncogenomic portals...*) i chętnie podejmuję współpracę w zakresie onkogenomiki. Jestem zaangażowana w realizację projektu MOSAIC, którego celem jest stworzenie platformy służącej do multiomicznej analizy danych pochodzących między innymi od pacjentów onkologicznych.

W ramach wieloletniej współpracy z dr Jolantą Szenajch z Wojskowego Instytutu Medycznego (WIM) w Warszawie przeprowadziliśmy kompleksową analizę zmian zachodzących w transkryptomach linii komórek raka jajnika w trakcie nabywania lekooporności. Wyniki zostały opublikowane w ubiegłym roku w pracy, której ze względu na znaczące zaangażowanie jestem ostatnim autorem (Szenajch J et al., 2020). Jako modelu badawczego użyliśmy wygenerowanych w WIM linii komórek raka jajnika o krzyżowej oporności na paklitaksel (PTX) i cisplatinę (CDDP). Traktowanie komórek A2780 rosnącymi stężeniami PTX pozwoliło uzyskać linie potomne o rosnącej oporności na PTX, a zarazem rosnącej wrażliwości na CDDP. Analizując transkryptomy wybranych linii z wykorzystaniem metody RNA-seq zaobserwowaliśmy, że liczba genów o zmienionej ekspresji w stosunku do linii macierzystej rośnie wraz ze wzrostem oporności na PTX, co wskazuje na stopniową i globalną zmianę transkryptomu. 160 genów, których poziom ekspresji zmieniał się najbardziej poddanych zostało bioinformatycznej analizie funkcjonalnej z zastosowaniem sieci interakcji białkowych. Zidentyfikowane zostały czynniki o znanym związku z nowotworzeniem i lekoopornością, np. czynnik nekrozy nowotworu (TNF), kinaza PLK2 (pełniącą rolę supresora nowotworów lub onkogenu), czy biorące udział szlakach przekazywania sygnałów receptory epinefryny (m.in. EPHA3). Co ciekawe, w wygenerowanych sieciach interakcji dominowały białka biorące udział w rozwoju systemu nerwowego oraz tkanki łącznej, zwłaszcza w procesach osteo- i chondrogenyzy. Były to m.in. czynniki transkrypcyjne (SOX2, RUNX2) i białka macierzy zewnątrzkomórkowej (COL1A2, POSTN, MGP, CLEC11A, SPOCK2, SPOCK3). Ekspresja większości genów kodujących te białka była obniżona, co sugeruje, że może istnieć związek pomiędzy osteomimikrą a lekoopornością w raku jajnika. Osteomimikra polega na uruchamianiu przez komórki nowotworowe ekspresji genów typowych dla komórek uczestniczących w tworzeniu i przemianach tkanki kostnej - osteoblastów i osteoklastów. Ułatwia to przeżycie komórek nowotworowych w obcym dla nich środowisku i tworzenie przerzutów. Uzyskane wyniki sugerują, że nabyta oporność na PTX i jednoczesna zwiększona wrażliwość na CDDP może hamować ten proces.

Wygenerowane w WIM i scharakteryzowane z wykorzystaniem metody RNA-seq linie komórkowe były podstawą przyznanego w roku 2019 patentu krajowego, którego współautorem jest ICHB PAN. Zostały również w ostatnim czasie skomercjalizowane i można je obecnie zakupić z banku komórek za pośrednictwem Ximbio (<https://ximbio.com>).

Archeogenomika

Od 2015 r., w konsorcjum z Wydziałem Historycznym oraz Wydziałem Biologii UAM, realizujemy niezwykle ciekawy, interdyscyplinarny projekt pt. „Dynastia i społeczeństwo państwa Piastów w świetle zintegrowanych badań historycznych, antropologicznych i genomicznych”. Kierownikiem projektu jest prof. dr hab. Marek Figlerowicz, a ja należę do osób, które brały aktywny udział zarówno w pisaniu projektu jak i jego wykonaniu i organizacji od samego początku. Głównym obiektem naszych badań jest kopalny DNA (ang. *ancient DNA*, aDNA), izolowany z najlepiej zachowanych kości, najczęściej zębów. Do tej pory poddaliśmy sekwencjonowaniu blisko 500 próbek aDNA, pozyskanego ze szczątków kostnych osobników zamieszkujących obszar współczesnej Polski w pierwszych stuleciach naszej ery (okres tzw. wpływów rzymskich) oraz we wczesnym średniowieczu.

Wyniki badań materiału genetycznego pochodzącego z dwóch cmentarzy z okresu wpływów rzymskich opublikowaliśmy w dwóch pracach w *Scientific Reports* (Stolarek I et al.,

2018 i 2019). Pierwsza z nich dotyczy Kowalewka (I-II w. n.e.), zlokalizowanego na terenie Wielkopolski, druga tzw. cmentarzyska Gotów w Masłomęczu (II-IV w. n.e.) w woj. lubelskim. Wyniki badań mitochondrialnego DNA dowiodły, że obie populacje cechowały się wysoką wewnątrzpopulacyjną różnorodnością genetyczną. Dodatkowo w Kowalewku zaobserwowaliśmy różnice w genetycznym pochodzeniu kobiet oraz mężczyzn. Wydaje się, że kobiety, wykazujące podobieństwo genetyczne do populacji neolitycznych rolników, reprezentowały lokalne społeczeństwo, podczas gdy mężczyźni, prawdopodobnie napływowi, byli blisko spokrewnieni z ówczesną populacją z półwyspu Jutlandzkiego. W przypadku populacji z Masłomęcza odkryliśmy związki zarówno z populacjami z Kowalewka oraz Półwyspu Jutlandzkiego jak i z populacjami ze stepów pontyjsko-kaspijskich. Na podstawie uzyskanych danych zaproponowaliśmy przypuszczalny przebieg szlaków wędrówek Gotów przez tereny współczesnej Polski oraz określiliśmy ich wkład w kształtowanie się struktury genetycznej populacji centralnej i wschodniej Europy. Wyniki analizy porównawczej pełnych genomów kilkuset osobników z okresu wpływów rzymskich i wczesnego średniowiecza są aktualnie przygotowywane do publikacji. W przygotowaniu jest też portal do wizualizacji danych uzyskanych w projekcie.

Oprócz badań populacyjnych projekt zakładał również badania genetyczne przedstawicieli rodu Piastów. Nie bez trudu udało się nam pozyskać materiał kostny od ponad 30 osobników. Stan tego materiału nie zawsze był wystarczająco dobry, by uzyskać dobrej jakości dane z sekwencjonowania. Z części próbek udało się jednak wyizolować DNA i poddać go sekwencjonowaniu. Dane są w trakcie analizy, wyniki prawdopodobnie będziemy mogli zaprezentować jeszcze w tym roku. Projekt ten cieszy się dużym zainteresowaniem ze strony społeczeństwa, w którym nie brakuje pasjonatów historii i genealogii, dlatego też wspólnie z konsorcjantami z UAM napisaliśmy cztery prace w j. polskim, w których przybliżyliśmy założenia projektu, trudności związane z badaniem kopalnego DNA oraz problemy, na jakie napotkaliśmy poszukując doczesnych szczątków Piastów. We wszystkich tych pracach jestem pierwszym autorem (Handsuh L et al. 2016 – 3 prace, Handsuh L et al. 2017).

Badania mikrobiomu

Analizy metagenomiczne mikrobiomu jelita człowieka prowadzę wspólnie z dr Anną Philips w ramach kierowanego przez nią projektu NCBI „Mapa Mikrobiomu Polski”. Ponadto w czasie rocznej nieobecności dr A. Philips pełniłam obowiązki kierownika tego projektu. Projekt kończy się wkrótce, więc większość prac została już wykonana. Przygotowaliśmy i zsekwencjonowaliśmy łącznie ponad 1000 bibliotek DNA wyizolowanego z zebranych od ochotników z całej Polski próbek kału. Dane uzyskane z sekwencjonowania posłużyły do identyfikacji mikroorganizmów (gł. bakterii), którą przeprowadził partner projektu, firma Ardigén S.A. w Krakowie. Uczestnicy projektu otrzymali już wyniki swoich badań w postaci zestawu zidentyfikowanych w ich próbkach bakterii, sklasyfikowanych na różnych poziomach taksonomicznych. Aktualnie trwają metaanalizy, których celem jest powiązanie składu mikrobiomu z zebranymi w postaci ankiet danymi na temat stanu zdrowia, diety i aktywności fizycznej populacji polskiej. Powstało zgłoszenie patentowe dotyczące metody izolacji DNA z kału pod kątem analiz mikrobiomu. W przygotowaniu jest też praca przedstawiająca porównanie przeznaczonych do tego celu metod przygotowania i sekwencjonowania bibliotek.

Badania mikrobiomu współczesnej populacji były poprzedzone badaniami bakterii towarzyszących szczątkom ludzkim sprzed 1000-2000 lat, które wykonaliśmy w ramach

projektu archeogenomicznego opisanego powyżej. Rezultaty tych badań opisaliśmy w dwóch publikacjach. W pierwszej z nich (Philips A et al., 2017) przedstawiliśmy badania metagenomiczne ponad 160 próbek kostnych datowanych na okres od 120 do 1200 lat n.e. Mimo iż większość mikroorganizmów stanowiły bakterie środowiskowe, przypuszczalnie znacznie młodsze od samych szczątków, udało się nam również zidentyfikować bakterie typowe dla flory jamy ustnej i przewodu pokarmowego, których materiał genetyczny zawierał uszkodzenia typowe dla aDNA. Mikroorganizmy te najprawdopodobniej towarzyszyły ludziom za życia, były wśród nich także potencjalne bakterie patogenne. W drugiej pracy (Philips A et al., 2020, *BMC Genomics*) przyjrzelśmy się bliżej jednej z nich, dziś powszechnie występującej bakterii *Tannerella forsythia* wywołującej zapalenie przyzębia. Analiza prawie 350 mikrobiomów 1000-2000-letnich zębów ujawniła obecność tej bakterii w kilku zębach, na których widoczne były zmiany typowe dla zaawansowanego zapalenia przyzębia. Analiza porównawcza czterech pełnych archeogenomów *T. forsythia* z genomem współczesnym tej bakterii ujawniła istotne różnice w czynnikach wirulencji.

SARS-CoV-2

W marcu 2020 r., na początku pandemii COVID-19 w Polsce, włączyłam się w spontaniczną akcję pomocy Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Poznaniu w wykonywaniu testów na koronawirusa. Pierwotnym zamysłem było udostępnienie sanepidowi aparatury, którą posiadał ICHB PAN, ale szybko okazało się, że bardziej potrzebne jest nowe miejsce i dodatkowe ręce do pracy. Podobnie jak większość wolontariuszy z ICHB PAN, posiadałam odpowiednie kompetencje do tego, by podjąć się zarówno izolacji wirusowego RNA jak i przeprowadzania reakcji real-time RT-PCR. Skala akcji okazała się jednak na tyle duża, że moja rola polegała głównie na koordynacji prac tzw. Wirusowej Grupy Wsparcia. Włączyłam się także w działania prowadzące do opracowania pierwszego polskiego testu do detekcji SARS-CoV-2 metodą RT-PCR. W rezultacie kilkumiesięcznej intensywnej pracy i porozumieniu z firmami udało nam się doprowadzić do komercjalizacji i wyprodukowania pięciu generacji testu, których jestem współtwórcą:

- 1) MediPAN COVID test – prosty test jednogenny, wymagający dwóch osobnych reakcji (jedna wykrywająca specyficzny gen wirusa, druga kontrolna)
- 2) MediPAN-2G COVID - test dwugenowy zawierający dwie różne kontrole (wymagający dwóch osobnych reakcji), pozwalające na sprawdzenie poprawności przeprowadzenia procedury diagnostycznej a zarazem poprawności pobrania wymazu
- 3) MediPAN-2G+ COVID test - test dwugenowy, w którym w jednej mieszaninie zachodzą 3 reakcje: dwie wykrywające 2 specyficzne geny wirusa i reakcja kontrolna
- 4) MediPAN-2G+ FAST COVID test – test dwugenowy, w którym w jednej mieszaninie zachodzą 3 reakcje, z dwukrotnie skróconym (do 1h) czasem trwania real-time PCR
- 5) MediPAN-2G+ FAST COVID + FLU – szybki test RT-PCR różnicujący COVID-19 i grypę, dwugenowy (w stosunku do SARS-CoV-2); w którym w jednej mieszaninie zachodzi 5 reakcji: dwie na 2 specyficzne geny wirusa, dwie (ale wykrywane tym samym barwnikiem) na pojedyncze geny wirusa grypa A i B i reakcja kontrolna.

Działanie naszego testu w porównaniu z innymi dostępnymi na rynku opisaliśmy w pracy opublikowanej w Przeglądzie Epidemiologicznym, której jestem współautorem

(Tymoniuk B et al., 2020). Dodatkowo nasze działania w dobie pandemii COVID-19 przedstawiliśmy wraz z dr Pawłem Zmorą oraz prof. dr hab. Markiem Figlerowiczom w artykule zatytułowanym „Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w czasie pandemii” opublikowanym w kwartalniku *Kronika Miasta Poznania* (Zmora P et al., 2021).

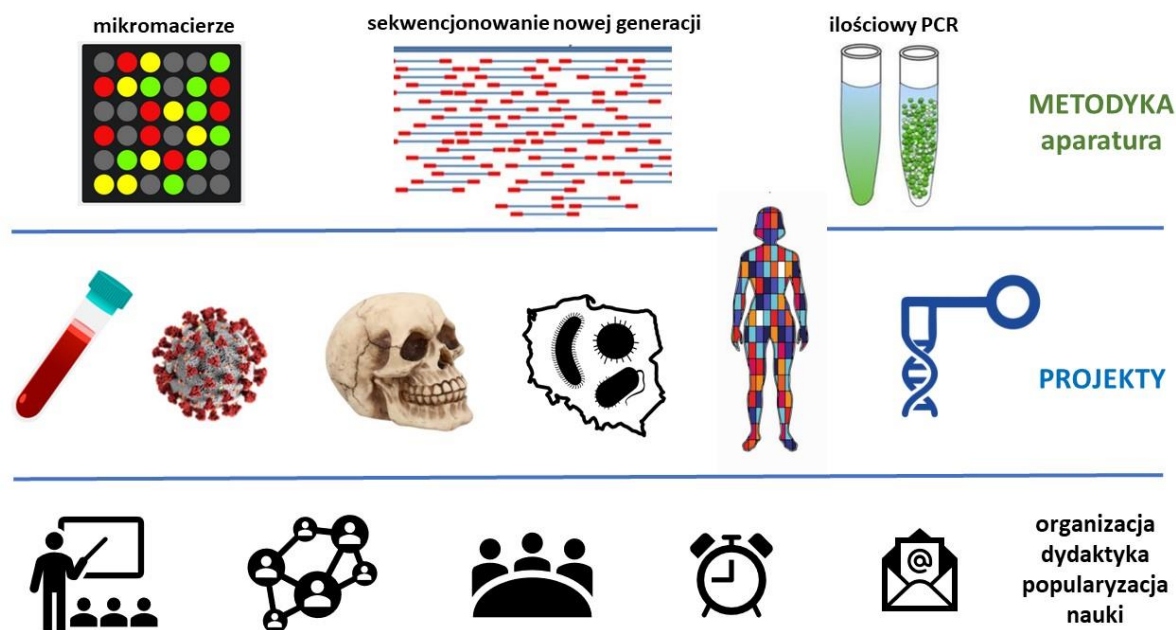
W ramach dofinansowania, które uzyskaliśmy w roku 2020 z Ministerstwa Edukacji i Nauki na produkcję testu oraz badania związane z nowym koronawirusem, nadzoruję trwający do tej pory w ICHB PAN projekt sekwencjonowania genomów wirusa SARS-CoV-2 z materiału podiagnostycznego pozyskanego we współpracy z sześcioma laboratoriami diagnostycznymi w Polsce. Do tej pory zsekwencjonowaliśmy już ponad 500 próbek, głównie z okresu początku pandemii oraz przełomu lat 2020/2021. W tej puli próbek zdecydowanie dominuje kład 20B (69%), kład 20A stanowi 26,5%, natomiast pozostałe klady (20C, 20E(EU1) i 20I/501Y.V1 znany jako tzw. wariant brytyjski) po 1-2%. Dane uzyskane z sekwencjonowania, zgodnie z polityką otwartego dostępu, deponujemy na platformie informatycznej COVID-HUB PL/Covid-19 Data Portal Poland (<https://covidhub.psnc.pl/>), prowadzonej we współpracy ICHB PAN-PCSS z Europejskim Instytutem Bioinformatyki (EMBL-EBI). Platforma ta umożliwia wymianę informacji naukowych i koordynowanie działań krajowych jednostek naukowo-badawczych prowadzących badania dotyczące SARS-CoV-2. Za pośrednictwem platformy dane trafiają do bazy europejskiej i mogą być wykorzystywane przez badaczy SARS-CoV-2 z całego świata.

Podsumowanie i perspektywy dalszego rozwoju

Podsumowując moją aktywność naukową mogę stwierdzić, że tematyka badań, w jakich uczestniczyłam i nadal uczestniczę jest bardzo szeroka. Elementem wspólnym jest metodyka, w szczególności technologie wysokoprzepustowych analiz DNA i RNA, w jakich się wyspecjalizowałam (Ryc. 3). Moja praca wpisuje się doskonale w cele funkcjonowania Pracowni Genomiki, której jestem kierownikiem. Zadaniem Pracowni jest bowiem nie tyle realizować własne projekty, co wspierać inne zespoły badaczy, przede wszystkim z ICHB PAN, w realizacji ich projektów genomicznych. W miarę możliwości podejmuję także współpracę z osobami z innych jednostek, które nie mają u siebie dostępu do zaplecza aparaturowego, jakim dysponuje ICHB PAN. Z tego też względu moje własne badania toczyły się nieco wolniej. Z drugiej strony udział w licznych, niezwykle ciekawych i ambitnych projektach był dla mnie wyzwaniem i okazją do wykorzystania własnych kompetencji oraz ich ciągłego rozwijania i nabywania nowych doświadczeń. Dzięki takiemu podejściu mogę patrzeć na badania własne z szerszej perspektywy, pomagać innym lepiej realizować ich projekty, mogłam też koordynować działania, których podjął się ICHB PAN w dobie pandemii COVID-19.

Aktualnie największym wyzwaniem dla mnie są dwa duże projekty ECBiG, GMP i MOSAIC. Pierwszy jest już na półmetku, ale drugi dopiero się rozpoczyna. Ma on na celu stworzenie platformy wykorzystującej sztuczną inteligencję do integracji i analizy danych multiomicznych i klinicznych dla uzyskania nowej wiedzy i narzędzi na potrzeby spersonalizowanej profilaktyki, diagnostyki i terapii medycznej. Plan zakłada sekwencjonowanie w tym celu pełnych genomów 5-8 tys. pacjentów z chorobami nowotworowymi oraz kardiologicznymi. Dla części pacjentów planujemy wykonać także innego rodzaju analizy genomiczne, uwzględniające badania epigenomów i transkryptomów, w tym także na poziomie pojedynczych komórek. Wymaga to rozbudowy infrastruktury Pracowni o sekwenator do krótkich odczytów o największej możliwej przepustowości,

sekwenator do długich odczytów, automatyczną stację pipetującą do przygotowywania bibliotek oraz robota do izolacji kwasów nukleinowych. Zwiększy to jeszcze bardziej potencjał ECBiG i zapewni narzędzia do realizacji kolejnych ambitnych projektów.



Rycina 3. Trzy płaszczyzny aktywności naukowej realizowanej po doktoracie.

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

Moja aktywność naukowa po doktoracie była nierozdzielnie związana z dwoma instytucjami – ICHB PAN oraz Uniwersytetem im. K. Marciniowskiego w Poznaniu. Łącząc przez kilkanaście lat zatrudnienia w obu jednostkach starałam się wykorzystać własną wiedzę i doświadczenie oraz bogate zaplecze aparaturowe ICHB PAN w celu rozwiązywania problemów naukowych z dziedziny hematologii. Brałam udział zarówno w pisaniu jak i realizacji projektu zamawianego pt. „Wykorzystanie technologii genomiki funkcjonalnej do stworzenia kompleksowego modelu transformacji nowotworowej. Badania modelowe mechanizmów molekularnych warunkujących rozwój ostrej białaczki szpikowej”. Zebrany wówczas materiał posłużył do przeprowadzenia szeregu eksperymentów, opisanych w publikacjach ukazujących się jeszcze długo po zakończeniu projektu. Pozwolił mi także na realizację projektu NCN MINIATURA, pt. „Analiza eksomów pacjentów z ostrą białaczką szpikową”, którego byłam kierownikiem, oraz na zdobycie stypendium wyjazdowego do Japonii w celu realizacji własnego projektu pt. „Multi-omic analysis of acute myeloid leukemia” w Unit of Statistical Genetics, Center for Genomic Medicine, Graduate School of Medicine Kyoto University. Niestety ze względu na pandemię COVID-19 wyjazd ten nie doszedł jeszcze do skutku. Molekularne aspekty patogenezy i rozwoju ostrej białaczki szpikowej stały się tematem przewodnim moich własnych badań oraz przedstawionego w niniejszym dokumencie osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

W ramach pracy w Katedrze Hematologii i Transplantacji Szpiku UM w Poznaniu zajmowałam się przygotowaniem pobranych od pacjentów i ochotników próbek krwi i szpiku kostnego do dalszych etapów eksperymentu, które były prowadzone w laboratorium ICHB PAN. Współpracowałam z lekarzami hematologami w celu zebrania danych klinicznych dla badanej grupy pacjentów. W celu poszerzenia wiedzy z zakresu hematologii uczestniczyłam w seminariach i konferencjach tematycznych. Efektem mojej pracy na Uniwersytecie Medycznym im. K. Marciniowskiego w Poznaniu jest 9 publikacji eksperymentalnych i 3 prace przeglądowe, w tym 8 w j. angielskim i jedna w j. polskim. W większości tych publikacji pełniłam wiodącą rolę.

W ICHB PAN z kolei zajmowałam się rozwojem technologii umożliwiających prowadzenie wysokoprzepustowych badań transkrytpomicznych i genomicznych. Ze względu na wyzwania związane z analizą danych generowanych przy użyciu tego rodzaju technologii odbyłam szkolenia i kursy pozwalające mi na bardziej aktywny i świadomy udział w analizie danych. Najważniejsze z nich to kursy zagraniczne w Cambridge (EMBO Practical Course on Analysis and Informatics of Microarray Data, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, Wielka Brytania, 2007) i Dortmundzie (Course in Practical DNA Microarray Data Analysis, Dortmund, Niemcy 2007), gdzie poznałam tajniki środowiska R Bioconductor. W ICHB PAN brałam udział w realizacji wielu różnorodnych projektów wykorzystujących narzędzia genomiczne, bardziej szczegółowo opisanych powyżej. Efektem tych działań jest 18 publikacji eksperymentalnych, 7 prac przeglądowych i 3 patenty. W przypadku części tych prac moja rola była mniejsza niż w przypadku prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne. Istotną rolę odgrywałam natomiast we wszystkich pracach z zakresu archeogenomiki oraz w pracy z dr J. Szenajch (2020), której jestem ostatnim autorem. Tu brałam udział zarówno w tworzeniu wniosków o finansowanie projektów, pracach eksperymentalnych jak i pisaniu manuskryptów publikacji.

Dodatkowo, przez krótki czas (jeden rok akademicki) byłam formalnie związana z jeszcze jedną uczelnią – Politechniką Poznańską, jako wykładowca na Wydziale Technologii Chemicznej. Od lat współpracuję również z Instytutem Informatyki Politechniki Poznańskiej, w ramach zadań związanych z organizacją ECBiG i projektów realizowanych przez konsorcjum ICHB PAN i PP. Politechnicy informatycy z kolei wspomagają Pracownię Genomiki w zakresie analizy danych.

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

Osiągnięcia dydaktyczne:

W roku akademickim 2016/2017 pełniłam funkcję wykładowcy przedmiotu „Biologia komórkowa i molekularna” dla studentów specjalności bioinżynieria na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Prowadziłam zarówno wykłady jak i ćwiczenia laboratoryjne. Praca ta nie była kontynuowana ze względu na niewystarczającą liczbę osób chętnych do studiowania tej specjalności w kolejnych rocznikach.

Po doktoracie byłam opiekunem kilkunastu stażystów i studentów wykonujących w ICHB PAN swoje staże naukowe, prace licencjackie, magisterskie i doktorskie, w tym w przypadku pięciu osób (dwojga licencjuszy i trojga magistrantów) byłam również promotorem ich prac.

Magistranci, którzy wykonywali prace magisterskie pod moją opieką, ale promotorem ich prac był prof. dr hab. Marka Figlerowicz:

Katarzyna Jezierska - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, kierunek biotechnologia, praca magisterska nt. „Optymalizacja mikromacierzy do analizy ekspresji genów w chorobach spichrzeniowych” (2007)

Piotr Stępniaak - UAM, Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, praca magisterska pt. „Zastosowanie ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych w analizie ukierunkowanych mikromacierzy DNA” (2008)

Marzena Pieronkiewicz - UAM, Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, praca magisterska pt. „Analiza zmian poziomu ekspresji wybranych genów związanych z transformacją nowotworową u pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową” (2008)

Marek Milewski - Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, kierunek biotechnologia medyczna, praca magisterska pt. „Analiza różnicowa profilu ekspresji genów w komórkach hematopoetycznych pochodzących od pacjentów z ostrą białaczką szpikową typu M1 i M2” (2011)

Studenci, których prac jestem promotorem:

Kamil Tomaszewski - Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, kierunek biotechnologia, praca magisterska pt. „Detekcja mutacji w genie *NPM1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) z zastosowaniem reakcji PCR i automatycznego sekwencjonowania metodą Sangera” (obrona pracy z oceną bardzo dobrą, 2014)

Melania Nowicka – Politechnika Poznańska, kierunek bioinformatyka, praca licencjacka pt. „VisualExpression: wizualizacja danych w analizie wyników eksperymentu RNA-Seq z wykorzystaniem pakietu cummeRbund” (obrona 16.09.2013)

Oliwier Kłós - UAM, Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, praca licencjacka pt. „Przygotowanie materiału genetycznego SARS-CoV-2 do sekwencjonowania nowej generacji” (obrona pracy z oceną bardzo dobrą, 13.07.2021)

Martyna Machowina - UAM, Wydział Biologii, kierunek biologia i zdrowie człowieka, 2021, praca magisterska pt. „Identyfikacja mutacji w genie *KRAS* w ostrej białaczce mieloblastycznej” (obrona pracy z oceną bardzo dobrą, 27.07.2021)

Monika Hazy - UAM, Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, praca magisterska pt. „Identyfikacja mutacji w genach *IDH1* oraz *IDH2* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową z zastosowaniem metody sekwencjonowania Sangera” (obrona planowana na sierpień 2021)

W latach 2008-2019, na prośbę wykładowców z poznańskich uczelni, organizowałam i współprowadziłam coroczne ćwiczenia pokazowe dla studentów nanotechnologii UAM oraz biotechnologii medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W ramach tych zajęć przybliżałam studentom najpierw podstawy technologii mikromacierzy, a potem także sekwencjonowania nowej generacji. Podobne ćwiczenia zorganizowałam jednorazowo dla studentów biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (15.05.2008, ICHB PAN) oraz dla studentów III roku biotechnologii z Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy (11.04.2014, ECBiG). Byłam też zaproszona do udziału w seminarium Koła Naukowego

Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, podczas którego wygłosiłam wykład pt. „Mikromacierze DNA - wciąż nowatorskie czy już przeżytek?” (18.05.2011). W roku 2014, wraz z dr Pawłem Wojciechowskim oraz dr Aleksandrą Świercz, uczestniczyłam w oprowadzaniu cotygodniowych delegacji uczniów szkół średnich (techników i liceów o profilach matematyczno-fizycznym i informatycznym z woj. wielkopolskiego) po laboratoriach ECBiG, prezentując podstawy technologii głębokiego sekwencjonowania DNA i zachęcając do podjęcia studiów w zakresie bioinformatyki. Byłam opiekunem czwórki stażystów: dwójga uczniów I klasy biol.-chem. VIII LO w Poznaniu (20.03.2019, w ramach szesnastej edycji programu Dzień Przedsiębiorczości), uczennicy klasy maturalnej o profilu biologiczno-chemicznym z rozszerzoną matematyką XXVII LO im. Tadeusza Czackiego w Warszawie (5-26.10.2020, Wiktoria Czumaj) oraz studenta III roku biotechnologii na Wydziale Biologii UAM (01-30.10.2020, Oliwier Kłos, który potem zdecydował się wykonać pracę licencjacką pod moją opieką).

Przeprowadziłam dwa szkolenia indywidualne na zlecenie firm (dr Jolanta Szenajch z WIM, szkolenie w zakresie technik mikromacierzowych na zlecenie firmy PerkinElmer, 15-19.11.2007; dr Joanna Kosińska z Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, szkolenie z przygotowywania bibliotek do sekwencjonowania NGS na zlecenie firmy OpenExome, 12-16.11.2012). Ponadto w roku 2011, na zlecenie firmy BioInfoBank, opracowałam serię 15 wykładów online pt. „Genomika, proteomika, metabolomika” dla edukacyjnej platformy bioinformatycznej „Virtual Academy of Bioinformatics”.

Osiągnięcia organizacyjne:

W latach 2005-2006 organizowałam w ICHB PAN nowe laboratorium w ramach Centrum Doskonałości CENAT, wprowadzając w Instytucie technologię mikromacierzy DNA, wspólnie z dr Agnieszką Żmieńko i prof. dr hab. Markiem Figlerowiczem. W tym samym okresie uczestniczyłam w pracach utworzonego w 2005 r. konsorcjum o nazwie Regionalne Centrum Genomiki, pełniąc funkcję sekretarza konsorcjum.

W latach 2007-2014 byłam członkiem z wyboru Rady Naukowej ICHB PAN, biorąc udział w pracach rady jako przedstawiciel adiunktów.

W latach 2010-2011 aktywnie uczestniczyłam w organizacji Europejskiego Centrum Bioinformatyki i Genomiki (ECBiG), konsorcjum, którego inicjatorami byli ze strony ICHB PAN prof. dr hab. Marek Figlerowicz, a ze strony Politechniki Poznańskiej prof. dr hab. inż. Jacek Błazewicz. Wspólnie z dr Agnieszką Żmieńko i dr Magdaleną Łuczak zajmowałyśmy się zakupami aparatury, projektowałyśmy i urządziłyśmy od podstaw nowe laboratoria ECBiG zlokalizowane w budynku Centrum Wykładowego i Biblioteki Technicznej Politechniki Poznańskiej przy ul. Piotrowo 2. W latach 2011-2021 było to moje główne miejsce pracy, tam też w roku 2015 powstała Pracownia Mikromacierzy i Głębokiego Sekwencjonowania, przekształcona później w Pracownię Genomiki, której kierownikiem jestem do dnia dzisiejszego. Od samego początku zajmowałam się sprawami związanymi z wyborem i zakupem aparatury niezbędnej do funkcjonowania Pracowni, począwszy od automatycznych stacji do drukowania, hybrydyzacji i skanowania mikromacierzy, po sekwenatory nowej generacji. Aktualnie zajmuję się przygotowaniem przetargów, których celem jest zakup kolejnej zaawansowanej aparatury – sekwenatora do krótkich odczytów o najwyższej przepustowości, umożliwiającej jednorazowo sekwencjonowanie 48 genomów ludzkich, sekwenatora do długich odczytów, automatycznej stacji do przygotowywania bibliotek do

sekwencjonowania oraz biorobota do izolacji kwasów nukleinowych. Zakup tego sprzętu jest finansowany ze środków uzyskanych niedawno w ramach projektu pt. „ECBiG – Europejskie Centrum Bioinformatyki i Genomiki – MOSAIC” (POIR.04.02.00-00-D017/20), którego celem jest stworzenie zaawansowanej platformy badawczej, umożliwiającej pozyskiwanie wielowymiarowych danych biomedycznych i klinicznych oraz ich standaryzację, integrację i analizę z wykorzystaniem algorytmów sztucznej inteligencji. W pisaniu tego wniosku także brałam aktywny udział.

W ostatnim czasie podjęłam się też kolejnego wyzwania natury organizacyjnej, jakim jest projektowanie jednego piętra zabytkowej willi przy ul. Wieniawskiego 21/23. Ma się tam mieścić w przyszłości Centrum Edukacji Społecznej, w którym powstaną laboratoria biologii molekularnej przeznaczone wyłącznie do celów edukacyjnych. Nową lokalizację zyska też rozwijana przeze mnie Pracownia Genomiki.

Jako kierownik Pracowni Genomiki nawiązałam współpracę z wieloma zakładami ICHB PAN oraz innymi jednostkami naukowymi w kraju, wspierając projekty innych badaczy technologiami genomicznymi dostępnymi w Pracowni. W większości przypadków współprace te zaowocowały publikacjami w punktowanych czasopismach branżowych, opisanymi powyżej.

Od początku istnienia ECBiG brałam udział w pisaniu i sprawozdawaniu wniosków o dofinansowanie utrzymania specjalnej aparatury badawczej, tzw. SPUB, a także wniosku o wpis ECBiG na Polską Mapę Infrastruktury Badawczej. Jestem przewodniczącą zespołu ds. zakupu strategicznej aparatury ICHB PAN, a od roku 2020 pełnię także funkcję inspektora ds. bioetyki i bezpieczeństwa biologicznego w ICHB PAN. Do moich zadań należy m.in. weryfikacja kwestii bioetycznych we wszystkich wnioskach grantowych składanych przez ICHB PAN.

W trakcie rocznej nieobecności dr Anny Philips (2018/2019) pełniłam obowiązki kierownika projektu NCBiR pt. „Mapa Mikrobiomu Polski” (nr POIR.04.01.02-00-0025/17). Pod względem organizacyjnym wspieram także prof. dr hab. Marka Figlerowicza w realizacji dużych interdyscyplinarnych i strukturalnych projektów, takich jak „Dynastia i społeczeństwo państwa Piastów w świetle badań archeologicznych, antropologicznych i genomicznych” czy „Europejskie Centrum Bioinformatyki i Genomiki”, którego celem jest stworzenie Genomicznej Mapy Polski. Przy okazji realizacji pierwszego z wymienionych projektów uczestniczyłam w powołaniu dwóch konsorcjów zrzeszających instytucje w Polsce zainteresowane badaniami z zakresu archeogenomiki: Poznańskiego Centrum Archeogenomiki (2013) oraz Polskiego Centrum Archeogenomiki (2016).

Współorganizowałam cztery konferencje:

- „Tradycje i nowoczesność - początki państwa polskiego na tle środkowoeuropejskim w badaniach interdyscyplinarnych”, Poznań, 10-12.06.2015 - konferencja międzynarodowa, organizowana przez Instytut Historii i Instytut Prahistorii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz ICHB PAN
- „DNA – język życia”, Poznań, 27–28.10. 2016, konferencja krajowa organizowana przez ICHB PAN i Politechnikę Poznańską

- „Piast & Přemyslovci Meeting”, Poznań, 29-30.05.2018, konferencja międzynarodowa organizowana przez ICHB PAN, UAM (Wydział Historyczny) oraz Instytut Archeologii Czeskiej Akademii Nauk w Pradze

- „Fascinating World of Bioorganic Chemistry”, konferencja międzynarodowa dedykowana prof. Andrzejowi B. Legockiemu z okazji 80. urodzin, organizowana przez ICHB PAN, Poznań, 12-13.11.2019.

W roku 2020 byłam koordynatorem prac Wirusowej Grupy Wsparcia (WGW). Była to grupa wolontariuszy z ICHB PAN, którzy w pierwszych miesiącach pandemii COVID-19 zaangażowali się w pomoc Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Poznaniu wspierając diagnostów w wykonywaniu testów wykrywających koronawirusa SARS-CoV-2. Był to okres niezwykle intensywnej i odpowiedzialnej pracy, podczas której odpowiadałam za organizację prac diagnostycznych w Instytucie oraz stały kontakt pomiędzy WGW a sanepidem. Ze względu na zainteresowanie mediów, firm i osób prywatnych, które pragnęły na różne sposoby wesprzeć naszą działalność, stałam się także w tym okresie głównym punktem kontaktowym i nieformalnym rzecznikiem prasowym ICHB PAN. Moje działania doprowadziły m. in. do powstania w Instytucie Pracowni Diagnostyki Molekularnej WGW, a później także laboratorium diagnostycznego z prawdziwego zdarzenia - Laboratorium Diagnostyki Molekularnej PANgen, spółki, której jestem członkiem zarządu. Biorę także udział w organizacji finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki zadania związanego z sekwencjonowaniem genomów wirusa SARS-CoV-2 z materiału poddiagnostycznego pozyskanego we współpracy z sześcioma laboratoriami diagnostycznymi w Polsce.

Popularyzacja nauki:

Moja przygoda z popularyzacją nauki rozpoczęła się 28.09.2006 w Zespole Szkół Technicznych w Trzciance, miejscowości, w której spędziłam 11 lat życia (do końca szkoły podstawowej). Z okazji organizowanego tam Dnia Technika wygłosiłam wykład na zaproszenie pt. „Nowoczesne technologie w służbie biologii i medycynie”. Kolejnym ciekawym doświadczeniem było wygłoszenie (na zaproszenie organizatorów) godzinnego wykładu pt. „Genom człowieka – fantastyczne puzzle” podczas ogólnopolskiego konwentu miłośników fantastyki PYRKON 2011 na terenie Międzynarodowych Targów Poznańskich.

Od roku 2010 nieprzerwanie biorę aktywny udział w popularyzacji nauki jako współorganizator Nocy Naukowców, Festiwalu Nauki i Sztuki oraz warsztatów na temat DNA i podstaw genetyki dla dzieci i młodzieży w podpoznańskich szkołach. Zorganizowałam grupę kilkunastu wolontariuszy spośród pracowników i doktorantów ICHB PAN, który wspierają mnie w tych działaniach. Przez wiele lat wspomagały mnie w tych przedsięwzięciach także własne dzieci. Wspólnie opracowaliśmy szereg autorskich gier i zabaw edukacyjnych oraz modeli DNA do wielorazowego składania. Dzięki nim poprzez zabawę uczymy jak zbudowany jest DNA, tłumaczymy jak działa kod genetyczny oraz pokazujemy jak można wyizolować DNA z roślin w warunkach domowych. Każda grupa uczestników słucha zwykle krótkiego wykładu wprowadzającego (prowadzonego przeze mnie), dostosowanego poziomem trudności do wieku słuchaczy, a następnie bierze udział w warsztatach. Jedynie w roku 2020 Festiwal Nauki nie odbył się z powodu pandemii, a Noc Naukowców miała formę online. Na ten cel przygotowałam nagranie, podczas którego opowiedziałam o działaniach Instytutu związanych z diagnostyką i opracowywaniem testów do detekcji SARS-CoV-2.

W ramach aktywizacji mieszkańców terenów wiejskich wyjazdowe warsztaty pt. „DNA – cząsteczka życia” prowadziłam m. in. dla uczniów Zespołu Szkół im. Królowej Jadwigi w Jerzykowie, Zespołu Szkół im. Konstytucji 3 Maja w Pobiedziskach Letnisku, Szkoły Podstawowej w Biskupicach, Szkoły Podstawowej nr 5 im. Prof. Adama Wodziczki w Swarzędzu, Szkoły Podstawowej nr 4 im. Jana Brzechwy w Swarzędzu.

Jestem autorką serii artykułów popularyzatorskich związanych z biologią, medycyną i zdrowiem (m.in. pt. „Czas na witaminy”, „Biologiczne znaczenie postu”) w „Pulsie Pobiedzisk”, gazecie obywatelskiej, wydawanej i rozprowadzanej na terenie gminy Pobiedziska w latach 2014-2016, najpierw jako miesięcznik, potem dwumiesięcznik liczący 24 strony, z nakładem 3150 egzemplarzy. Gazeta wydawana była dzięki pracy wolontariuszy (w tym mnie) zrzeszonych w ramach Stowarzyszenia Gmina Pobiedziska w Europie.

11.01.2017, na zaproszenie prof. dr hab. Jana Barciszewskiego prowadziłam spotkanie z cyklu Poznański Klub RNA, którego gościem był dr Tomasz Żemojtel z Charité Universitätsmedizin w Berlinie. Moją rolą było przedstawienie gościa, który wygłosił wykład pt. „3Gbp”, oraz prowadzenie dyskusji.

13.03.2019, wraz z prof. dr hab. Markiem Figlerowiczem i dr Ireneuszem Stolarkiem wygłosiłam wykład otwarty pt. „Homo sapiens w Europie” w ramach cyklu „Biesiady z myślą”, organizowanego przez ICHB PAN dla szerokiego grona odbiorców, w tym młodzieży licealnej.

Ze względu na duże zainteresowanie społeczeństwa projektem pt. „Dynastia i społeczeństwo państwa Piastów w świetle badań archeologicznych, antropologicznych i genomicznych”, którego jestem jednym z głównych wykonawców, 06.02.2020 byłam gościem audycji Radia Poznań pt. „Trzecie Milenium”. Wzięłam również udział w nagraniu filmu edukacyjnego na temat naszych badań dla Rezerwatu Archeologicznego Genius Loci. Film ten w czerwcu 2021 stał się jednym ze stałych elementów ekspozycji muzeum.

Byłam gościem podcastu „Faceci w Kitlach”, odcinka pt. „Czy istnieje gen Polaka?” poświęconego Genomicznej Mapie Polski.

W okresie wzrostu popularności ICHB PAN w czasie pandemii COVID-19 udzielałam licznych wywiadów dla gazet, stacji radiowych i telewizyjnych oraz portali internetowych, byłam też zapraszana jako ekspert do programów telewizyjnych transmitowanych na żywo. Kilka przykładów poniżej:

“Pandemia COVID-19 jako stymulator współpracy między nauką a biznesem - przykład polskiego testu na SARS-CoV-2” - wystąpienie online na Międzynarodowej Konferencji Polskiego Stowarzyszenia Dyrektorów Szpitali „Nowe wyzwania organizacyjne i technologie w walce z wirusem SARS-COV-2” organizowanej w Krakowie, 25.09.2020

“Wirusowa Grupa Wsparcia – odpowiedź Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN na pandemię COVID-19” - wystąpienie online na konferencji "UNIwersytet W CZASACH PANDEMII: NAUKA, DYDAKTYKA, ADMINISTRACJA" organizowanej przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 24.09.2020

Udział online w panelu dyskusyjnym pt. “Jak pandemia stymuluje rozwój nowych technologii medycznych” podczas XVI Forum Rynku Zdrowia organizowanego w Warszawie, 19-20.10.2020

Od wirusów do Piastów, magazyn internetowy "Genetyka Fakty i Mity", maj 2020 (<https://genetyka.bio/tag/dr-luiza-handschuh/>)

"Co dobrego wydarzyło się w tym trudnym roku? "Najważniejsza była solidarność" - publikacja w Gazecie Wyborczej, 26.12.2020 (<https://poznan.wyborcza.pl/poznan/7,36001,26639367,co-dobrego-wydarzylo-sie-w-tym-trudnym-roku-najwazniejsza.html>)

"Wykryjemy wirusa i z Wuhan, i z Londynu" - wywiad w Gazecie Prawnej, 28.12.2020 (<https://serwisy.gazetaprawna.pl/zdrowie/artykuly/8054203,luiza-handschuh-wirus-covid-19-wuhan-londyn-wywiad.html>)

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

Odnaczona przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski za wybitne zasługi w działalności organizacyjno-badawczej na rzecz zwalczania zagrożeń biologicznych (09.06.2020).

Referencje

Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore DT, Hudson JR Jr, Chan WC, Greiner T, Weisenburger D, Armitage JO, Lossos I, Levy R, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999, 64:71-8.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016, 127(20):2391-2405.

Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Ramón y Cajal S and Lleónart ME: Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum Pathol* 2011, 42:194-203.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976, 33(4):451-458.

Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 2017, 18(3):17.

Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, Richard DJ. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol.* 2016, 17(1):19.

Budny B, Szczepanek-Parulska E, Zemojtel T, Szaflarski W, Rydzanicz M, Wesoly J, Handschuh L, Wolinski K, Piatek K, Niedziela M, Ziemnicka K, Figlerowicz M, Zabel M, Ruchala M. Mutations in proteasome-related genes are associated with thyroid hemiagenesis. *Endocrine.* 2017, 56(2):279-285.

Cegielska B, Kaliszan D, Handschuh L, Figlerowicz M, Meyer N, Genomic Virtual Laboratory, *Compt. Methods Sci. Technology,* 2010, 16 (1):39-49.

Choi, J.H.; Bogenberger, J.M.; Tibes, R. Targeting Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions of BCL-2 Inhibition with Venetoclax and Beyond. *Target. Oncol.* 2020, 15:147-162.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med,* 2005, 352:254-266.

Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C, Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood,* 2007, 109(3):874-885.

- Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, I Nicoletti I. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. *Leukemia*, 2009, 23(10):1731-43.
- Falini B. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): molecular, pathological, and clinical features. *Cancer Treat Res*. 2010, 145:149-68.
- Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*, 2011, 117(4):1109-20.
- Formanowicz P, Urbaniak R, Handschuh L, Formanowicz D, Figlerowicz M, Mikromacierze DNA – zasady projektowania sond, *Biotechnologia*, 2008, 4: 54-67.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286(5439):531-7.
- Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids*, 2015, 47(7):1319-39.
- Handschuh L, Etlén a reakcje obronne roślin, *Biotechnologia* 1999, 3(46):86-99.
- Handschuh L, Femiak I, Kasperska A, Figlerowicz M, Sikorski MM. Structural and functional characteristics of two novel members of pathogenesis-related multigene family of class 10 from yellow lupine. *Acta Biochim Pol*. 2007, 54(4):783-96.
- Handschuh L, Lewandowski K, Kaźmierczak M, Komarnicki M, Figlerowicz M, Choroby rozrostowe krwi – analiza transkryptomu z zastosowaniem mikromacierzy DNA, *Biotechnologia*, 2009, 3: 22-43.
- Handschuh L, Lawenda M, Stepniak P, Figlerowicz M, Stroński M, Węglarz J, New Approach to Genomics Experiments Taking Advantage of Virtual Laboratory System, *Compt. Methods Sci. Technology*, 2009, 15:31-40.
- Handschuh L, Lawenda M, MeyerN, Stepniak P, Figlerowicz M, Stroinski M, Węglarz J, Virtual laboratory and its application in genomics, in: *Remote Instrumentation and Virtual Laboratories. Service Architecture and Networking*, ed. Springer US, 2010, 43-57.
- Handschuh L, Stolarek I, Juras A, Zeńczak M, Marcinkowska-Swojak M, Mysza A, Trzcński D, Losik-Sidorska A, Wojtczak J, Philips A, Różański A, Dębski A, Kozłowski P, Matla M, Dobosz J, Jasiński J, Piontek J, Kóčka-Krenz H, Figlerowicz M, W poszukiwaniu Piastów, *Opolskie Studia Administracyjno-Prawne*, 2016, XIV/4(2) str. 63-77.
- Handschuh L, Matla M, Juras A, Legocki A, Kozłowski P, Dobosz J, Jasiński T, Piontek J, Kóčka-Krenz H, Figlerowicz M, Dynastia i społeczeństwo państwa Piastów w świetle zintegrowanych badań historycznych, antropologicznych i genomicznych - podstawowe założenia i cele projektu realizowanego przez Poznańskie Centrum Archeogenomiki, w: *Tradycje i nowoczesność. Początki państwa polskiego na tle środkowoeuropejskim w badaniach interdyscyplinarnych. Seria Historia nr 230, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2016, str. 309-321.*
- Handschuh L, Marcinkowska-Swojak M, Philips A, Stolarek I, Kozłowski P, Figlerowicz M, Pozyskiwanie i analiza kopalnego DNA, w: *Tradycje i nowoczesność. Początki państwa polskiego na tle środkowoeuropejskim w badaniach interdyscyplinarnych. Seria Historia nr 230, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2016, str. 277-292.*
- Handschuh L, Marcinkowska-Swojak M, Philips A, Stolarek I, Zeńczak M, Kozłowski P, Figlerowicz M, Dynastia i społeczeństwo państwa Piastów w świetle badań genomicznych, w: *Chrzest — przemiany religijne, kulturowe i sepulkralne. Funeralia Lednickie - spotkanie 19, Poznań 2017, str. 203-209,*
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 2008, 456(7218):66-72.
- Luczak M, Kaźmierczak M, Handschuh L, Lewandowski K, Komarnicki M, Figlerowicz M. Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without maturation. *J Proteomics*. 2012, 75(18):5734-48.

- Luczak M, Kaźmierczak M, Hadschuh L, Lewandowski K, Komarnicki M, Figlerowicz M. Comparative proteomics in acute myeloid leukemia. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2012, 16(2):95-103.
- Kaźmierczak M, Luczak M, Lewandowski K, Handschuh L, Czyż A, Jarmuż M, Gniot M, Michalak M, Figlerowicz M, Komarnicki M. Esterase D and gamma 1 actin level might predict results of induction therapy in patients with acute myeloid leukemia without and with maturation. *Med Oncol*. 2013, 30(4):725.
- Klonowska K, Czubak K, Wojciechowska M, Handschuh L, Zmienko A, Figlerowicz M, Dams-Kozłowska H, Kozłowski P. Oncogenomic portals for the visualization and analysis of genome-wide cancer data. *Oncotarget*. 2016, 7(1):176-92.
- Korfanty J, Stokowy T, Widlak P, Gogler-Pigłowska A, Handschuh L, Podkowiński J, Vydra N, Naumowicz A, Toma-Jonik A, Widlak W. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014, 57:76-83.
- Kowalczykiewicz D, Świercz A, Handschuh L, Leśniak K, Figlerowicz M, Wrzesinski J. Characterization of Sus scrofa small non-coding RNAs present in both female and male gonads. *PLoS One*. 2014, 9(11):e113249.
- Oshlack A, Emslie D, Corcoran LM, Smyth GK. Normalization of boutique two-color microarrays with a high proportion of differentially expressed probes. *Genome Biol*. 2007, 8(1):R2.
- Pasternak O, Biesiadka J, Dolot R, Handschuh L, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M. Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to a novel subclass. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005, 61:99-107.
- Philips A, Stolarek I, Kuczkowska B, Juras A, Handschuh L, Piontek J, Kozłowski P, Figlerowicz M. Comprehensive analysis of microorganisms accompanying human archaeological remains. *Gigascience*. 2017, 6(7):1-13.
- Philips A, Stolarek I, Handschuh L, Nowis K, Juras A, Trzciniński D, Nowaczewska W, Wrzeńska A, Potempa J, Figlerowicz M. Analysis of oral microbiome from fossil human remains revealed the significant differences in virulence factors of modern and ancient *Tannerella forsythia*. *BMC Genomics*. 2020, 21(1):402.
- Philips A, Nowis K, Stelmaszczuk M, Podkowiński J, Handschuh L, Jackowiak P, Figlerowicz M. Arabidopsis thaliana cbp80, c2h2, and flk Knockout Mutants Accumulate Increased Amounts of Circular RNAs. *Cells*. 2020, 9(9):1937.
- Philips A, Nowis K, Stelmaszczuk M, Jackowiak P, Podkowiński J, Handschuh L, Figlerowicz M. Expression Landscape of circRNAs in Arabidopsis thaliana Seedlings and Adult Tissues. *Front Plant Sci*. 2020, 11:576581.
- Provan, Singer C, Baglin T, Lilleyman J, Hematologia kliniczna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, wyd. 1, red. wyd. pol. Jerzy Hołowiecki.
- Rinkenberger, J.L.; Horning, S.; Klocke, B.; Roth, K.; Korsmeyer, S.J. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev*. 2000, 14, 23–27.
- Rowlands DC, Williams A, Jones NA, Guest SS, Reynolds GM, Barber PC and Brown G: Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest*, 1995, 72:100-113.
- Roos G, Brattsand G, Landberg G, Marklund U and Gullberg M: Expression of oncoprotein 18 in human leukemias and lymphomas. *Leukemia*, 1993, 7:1538-1546.
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009, 113(9):1875-91.
- Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T, Lengfelder E, Döhner H, Burnett AK, Chen SJ, Mathews V, Iland H, Rego E, Kantarjian H, Adès L, Avvisati G, Montesinos P, Platzbecker U, Ravandi F, Russell NH, Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2019, 133(15):1630-1643.

- Scherr, A.L.; Mock, A.; Gdynia, G.; Schmitt, N.; Heilig, C.E.; Korell, F.; Rhadakrishnan, P.; Hoffmeister, P.; Metzeler, K.H.; Schulze-Osthoff, K.; et al. Identification of BCL-XL as highly active survival factor and promising therapeutic target in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2020, 11, 875.
- Schmidt MT, Handschuh L, Zyprych J, Szabelska A, Olejnik-Schmidt AK, Siatkowski I, Figlerowicz M. Impact of DNA microarray data transformation on gene expression analysis - comparison of two normalization methods. *Acta Biochim Pol.* 2011, 58(4):573-80.
- Siatkowski I, Zyprych J, Handschuh L, Figlerowicz M. The methods of normalization used in the analysis of two-color microarrays, *Colloquium Biometricum*, 2009, 39: 9-19.
- Smialek MJ, Ilaslan E, Sajek MP, Swiercz A, Janecki DM, Kusz-Zamelczyk K, Wozniak T, Kotecki M, Handschuh L, Figlerowicz M, Jaruzelska J. Characterization of RNP Networks of PUM1 and PUM2 Post-Transcriptional Regulators in TCam-2 Cells, a Human Male Germ Cell Model. *Cells.* 2020, 9(4):984.
- Sokołowska A, Świerzek AS, Gajek G, Gołos A, Michalski M, Nowicki M, Szala-Poździej A, Wolska-Washer A, Brzezińska O, Wierzbowska A, Jamroziak K, Kowalski ML, Thiel S, Matsushita M, Jensenius JC, Cedzyński M. Associations of ficolins and mannose-binding lectin with acute myeloid leukaemia in adults. *Sci Rep.* 2020, 10(1):10561.
- Stolarek I, Handschuh L, Juras A, Nowaczewska W, Kóčka-Krenz H, Michalowski A, Piontek J, Kozłowski P, Figlerowicz M. Goth migration induced changes in the matrilineal genetic structure of the central-east European population. *Sci Rep.* 2019, 9(1):6737.
- Stolarek I, Juras A, Handschuh L, Marcinkowska-Swojak M, Philips A, Zenczak M, Dębski A, Kóčka-Krenz H, Piontek J, Kozłowski P, Figlerowicz M. A mosaic genetic structure of the human population living in the South Baltic region during the Iron Age. *Sci Rep.* 2018, 8(1):2455.
- Szenajch J, Szabelska-Beręsewicz A, Świercz A, Zyprych-Walczak J, Siatkowski I, Góralski M, Synowiec A, Handschuh L. Transcriptome Remodeling in Gradual Development of Inverse Resistance between Paclitaxel and Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(23):9218.
- Szmajda D, Balcerczak E, Krygier A. Standardy diagnostyki oraz nowe trendy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematologica Polonica*, 2017, 48(4):291-299.
- Świerzek AS, Michalski M, Sokołowska A, Nowicki M, Szala-Poździej A, Eppa Ł, Mitrus I, Szmigielska-Kapłon A, Sobczyk-Kruszelnicka M, Michalak K, Gołos A, Wierzbowska A, Giebel S, Jamroziak K, Kowalski ML, Brzezińska O, Thiel S, Matsushita M, Jensenius JC, Gajek G, Cedzyński M. Associations of Ficolins With Hematological Malignancies in Patients Receiving High-Dose Chemotherapy and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantations. *Front Immunol.* 2020, 10:3097.
- Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M, Figiel M. Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling. *Front Cell Neurosci.* 2019, 12:528.
- Tracz J, Handschuh L, Lalowski M, Marczak Ł, Kostka-Jeziorny K, Perek B, Wanic-Kossowska M, Podkowińska A, Tykarski A, Formanowicz D, Luczak M. Proteomic Profiling of Leukocytes Reveals Dysregulation of Adhesion and Integrin Proteins in Chronic Kidney Disease-Related Atherosclerosis. *J Proteome Res.* 2021, 20(6):3053-3067.
- Tsai ST, Chien IH, Shen WH, Kuo YZ, Jin YT, Wong TY, Hsiao JR, Wang HP, Shih NY and Wu LW: ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *Eur J Cancer*, 2010, 46:1712-1723.
- Wei, A.H.; Tiong, I.S. Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML. *Blood*, 2017, 130:2469–2474.
- Wenne R, Handschuh L, Pocwierz-Kotus A, Urbaniak R, Formanowicz P, Calkiewicz J, Brzozowska K, Figlerowicz M, Wegrzyn G & Wrobel B. The application of microarray technology to the identification of Tc1-like element sequences in fish genomes. *Marine Biol Res.* 2011, 7:466-77.

Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Wu YZ, Schwind S, Metzeler KH, Wen J, Baer MR, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Moore JO, Stone RM, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010 116(18):3622-3626.

Wiatr K, Piasecki P, Marczak L, Wojciechowski P, Kurkowiak M, Płoski R, Rydzanicz M, Handschuh L, Jungverdorben J, Brüstle O, Figlerowicz M, Figiel M. Altered Levels of Proteins and Phosphoproteins, in the Absence of Early Causative Transcriptional Changes, Shape the Molecular Pathogenesis in the Brain of Young Presymptomatic Ki91 SCA3/MJD Mouse. *Mol Neurobiol*. 2019, 56(12):8168-8202.

World Health Organization, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, USA, 2008.

Wierzbowska A, Gołos A, Współczesne poglądy na leczenie ostrej białaczki promielocytowej, *Hematologia* 2013, 4(4):291-300.

Wierzbowska A, Postępy w leczeniu dorosłych chorych na ostre białaczki. *Hematologia* 2015, 6, 1: 52-62.

Zajac M, Dolnik A, Stasiak G, Zaleska J, Kielbus M, Czapinski J, Schunn M, Correa SC, Glodkowska-Mrowka E, Sundaram RC, Jankowska-Lecka O, Schlenk RF, Döhner H, et al. Analysis of NPM1 splice variants reveals differential expression patterns of prognostic value in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017, 8:95163–75.

Zmora P, Handschuh L, Figlerowicz M, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w czasie pandemii, *Kronika Miasta Poznania*, 2021, 2:199-211.

Zyprych-Walczak J, Szabelska A, Handschuh L, Górczak K, Klamecka K, Figlerowicz M, Siatkowski I. The Impact of Normalization Methods on RNA-Seq Data Analysis. *Biomed Res Int*. 2015, 2015:621690.

Poznań, 30.07.2021

Luiza Jędrak