

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI ZADAŃ BADAWCZYCH

1. MOLEKULARNE I CYTOGENETYCZNE BADANIA CHORÓB GENETYCZNYCH

Mapowanie i analiza mutacji w genach warunkujących choroby rzęskopochodne (PCD/KS, RP).

K. Voelkel, M. Geremek, U. Skrzypczak, E. Rutkiewicz, E. Ziętkiewicz, M. Witt

Zakończono analizę zmian w genach leżących w obrębie regionie chromosomu 15q sprzężonym z Zespołem Kartagenera – praca „*Sequence analysis of 21 genes located in the Kartagener syndrome linkage region on chromosome 15q*”, przyjęta do druku w *Eur J Human Genetics*. Kontynuowano poszukiwanie mutacji w kolejnych eksonach genów *DNAH5* i *DNAI1* u polskich chorych na PCD/KS. Wyniki badań przedstawiono na II Polskim Kongresie Genetyki w Warszawie (18-28 września) w postaci dwóch doniesień ustnych: „Genetic background of PCD in Polish patients” (Ziętkiewicz, Skrzypczak, Voelkel, Rutkiewicz, Geremek, Diehl, Wijmenga, Witt) i „Search for possible association of PCD/KS with the most frequent CFTR mutations: a Polish study” (Skrzypczak, Rutkiewicz, Pogorzelski, Witt, Ziętkiewicz) oraz dwóch plakatów: „DNAH5 gene mutations in Polish patients with PCD” (Skrzypczak, Voelkel, Rutkiewicz, Ziętkiewicz, Witt) i „Mutacje genu DNAI1 u polskich pacjentów z pierwotną dyskinezą rzęsek” (Voelkel, Rutkiewicz, Witt, Ziętkiewicz). Przeprowadzono analizę nowej mutacji w 3 intronie genu DNAI2 (współpraca z grupą Omrana, Freiburg) – badania nie wykazały obecności tej zmiany u ~120 polskich chorych na PCD. Nawiązano współpracę w zakresie pozyskiwania materiału od chorych na retinitis pigmentosa z objawami ze strony układu oddechowego (prof. Szaflik, Warszawa)

Analiza molekularna genu /CFTR/ w populacji polskiej.

E. Rutkiewicz, E. Ziętkiewicz, M. Witt

Uzupełniono panel przebadanych mutacji genu CFTR (do 36) u 70 polskich chorych na mukowiscydozę, u których dotąd nie znaleziono dwóch mutacji. Uzupełniono dane adresowe chorych (współpraca z dr Pogorzelskim, IChP w Rabce) i przeprowadzono wstępną analizę gradientu występowania mutacji CFTR w populacji polskiej. Przebadano 73 nowe osoby z podejrzeniem CF: u 9 stwierdzono genotyp F508del/F508del, u 5 wykryto dwie inne mutacje, u 6 wykryto jedną mutację. Wśród 6 osób badanych w kierunku nosicielstwa mutacji genu CYTR, zidentyfikowano je u 3 osób. Wśród 61 osób z niepłodnością męską u dwóch stwierdzono obecność jednej kopii mutacji F508del.

Analiza aberracji chromosomowych pojawiających się w procesie starzenia oraz w chorobach rozrostowych wieku dziecięcego.

A. Wojda, E. Ziętkiewicz, M. Mossakowska, J. Wachowiak, M. Witt

Kontynuowano badania zmian cytogenetycznych związanych z procesem starzenia. Wyniki w postaci plakatu „*Badanie zależności poziomu aberracji chromosomowych od wieku i płci: analiza cytogenetyczna limfocytów krwi osób 100-letnich*” (Wojda, Ziętkiewicz, Witt) przedstawiono na II Kongresie Genetyki Polskiej w Warszawie. Rozpoczęto badania wpływu stresu na zmiany cytogenetyczne w limfocytach krwi obwodowej mężczyzn i kobiet z różnych grup wiekowych (nowy grant zamawiany – K143/P01/2007)

Badanie tła haplotypowego mutacji powodujących wybrane choroby genetyczne w populacji polskiej.

E. Ziętkiewicz, E. Rutkiewicz, U. Skrzypczak, K. Voelkel, M. Witt

Kontynuowano genotypowanie częstych, neutralnych polimorfizmów (łącznie 20 SNP) w obrębie genu *DNAH5* w rodzinach z PCD/KS. Analizę haplotypów złożonych z 12 SNP stanowiących tło znalezionych mutacji umożliwiła wytypowanie podgrup badanych, u których – ze względu na podobieństwo haplotypu – spodziewane jest występowanie wspólnych mutacji w *DNAH5*.

Badanie ilościowe chimeryzmu komórkowego oraz choroby resztkowej u dzieci z ALL po transplantacji szpiku kostnego.

M. Dawidowska, J. Jółkowska, T. Szczepański, J. Wachowiak, M. Witt

W 2007 roku prowadzono detekcję i identyfikację rearanżacji genów immunoglobulin i receptorów limfocytów T (Ig/TCR) w grupie 18 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną. Rearanżacje genów Ig/TCR wykrywano poprzez screening-PCR. Produkty PCR poddawano analizie heterodupleksów w celu oceny klonalności rearanżacji. Klonalne produkty PCR sekwencjonowano. Uzyskane sekwencje pacjentów porównywano z sekwencjami germinacyjnymi genów Ig i TCR dostępnymi w bazach danych VBASE i IMGT. Analizie homologii porównywanych sekwencji służyły programy DNAPLOT i SeqMan (pakiet DNA-StarLasergene v6). Detekcję i ocenę klonalności rearanżacji genów Ig/TCR przeprowadzono w grupie 68 pacjentów. Łącznie w badanej grupie wykryto 233 klonalne rearanżacje genów Ig/TCR: 67 *IGH*, 39 *IGK-Kde*, 49 *TCRD*, 16 *TCRD/A*, 58 *TCRG* oraz 4 *TCRB*. Ponadto, w badanej grupie zidentyfikowano 199 rearanżacji genów Ig/TCR: 53 *IGH*, 38 *IGK-Kde*, 49 *TCRD*, 12 *TCRD/A*, 46 *TCRG* oraz 1 *TCRB*. Zidentyfikowane rearanżacje Ig/TCR (tj. sekwencja łącząca między zrearanżowanymi genami) stanowią potencjalne markery do oznaczeń ilościowych poziomów minimalnej choroby resztkowej w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

W 2007 roku badaniami chimeryzmu objęto 7 dzieci z ALL, oznaczenia chimeryzmu kontynuowano u 5 dzieci. Harmonogram badań obejmował: oznaczenia chimeryzmu 1 raz w tygodniu do 100 dnia po transplantacji oraz intensywne monitorowanie w przypadku pacjentów, u których wykryto chimeryzm mieszany (MC), lub podejrzewano wznowę/odrzućcenie przeszczepu: 1 raz w tygodniu do uzyskania pełnego chimeryzmu (CC) w dwóch kolejnych badaniach. Badania ilościowe chimeryzmu prowadzono metodą wykorzystującą polimorfizm markerów mikrosatelitarnych (STR). Chimeryzm oznaczono u 11/12 dzieci (u 1 pacjenta oczekiwano na materiał po transplantacji). U 10/11 pacjentów każdorazowo stwierdzano pełny chimeryzm, co korelowało ze stanem remisji hematologicznej (1/10 pacjentów zmarł w remisji z powodu niewydolności przeszczepionego szpiku; u 1/10 pacjentów w +134 dniu po transplantacji wystąpiło podejrzenie wznowy lub odrzućcenia przeszczepu, co nie znalazło potwierdzenia w badaniu chimeryzmu (CC). U 1/11 pacjentów stwierdzono następującą kinetykę zmian chimeryzmu: CC (+21); CC (+28), 1-5% genotypu biorcy (+37); 1-5% genotypu biorcy (+48); 5-10% genotypu biorcy (+65); CC (+83, +114, +133) przez cały czas pacjent pozostawał, i nadal pozostaje, w remisji.

2. BADANIA STRUKTURY I FUNKCJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

Molekularne podłoże nowotworów jelita grubego.

A. Pławski, M. Podralska, D. Lipiński, R. Słomski

Występowanie Zespołu Peutz-Jeghersa PJS (Peutz-Jeghers Syndrome) związane jest z mutacjami w genie *STK11* (*LKB1*) kodującym kinazę serynowo-treoninową. Zebrano materiał od 40 chorych PJS i członków ich rodzin, scharakteryzowano przebieg choroby u polskich chorych, scharakteryzowano spektrum mutacji genu *STK11*. Według danych literaturowych w genie *LKB1* (*STK11*) znaleziono ponad 160 mutacji powodujących występowanie PJS. Mutacje genu *LKB1* występują u ponad 70% pacjentów z rodzinnym występowaniem choroby i u 30-70% ze sporadycznymi przypadkami choroby. W wyniku analizy polskich pacjentów u 9 przeanalizowano pierwsze 4 eksony i wykryto 4 mutacje punktowe.

Polipowatość młodzieńcza (JPS *juvenile polyposis syndrome*) jest predyspozycją do występowania polipów młodzieńczych w układzie pokarmowym. Występowanie choroby jest warunkowane mutacjami w genach *BMPRIA* i *SMAD4* (*DPC4*). W minionym roku, utworzono bank DNA chorych z polipowatością młodzieńczą. Obecnie w banku znajdują się próbki DNA pochodzące z 14 rodzin, u których rozpoznano polipowatość młodzieńczą. Baza danych zawiera również informacje dotyczące wywiadu rodzinnego oraz dane o przebiegu choroby, które przygotowywane są przez kliniki i szpitale kwalifikujące chorych do badań genetycznych. W analizie genów *SMAD4* i *BMPRIA* oraz *PTEN* stwierdzono 5 mutacji, w tym trzy substytucje i dwie delecje. Dwie mutacje znajdowały się w genie *BMPRIA*, dwie w genie *SMAD4* i jedna w genie *PTEN*. W genie *BMPRIA* wykryte mutacje prowadziły do przedwczesnej terminacji translacji. Były zlokalizowane w eksonie 5 odpowiadającym pozakomórkowej części receptora oraz w eksonie 7, który koduje domenę o aktywności kinazowej. W genie *SMAD4* mutacje wykryto w eksonach 4 i 11. Analiza genu *PTEN* umożliwiła wykrycie mutacji u pacjenta 1003. Transwersja 63 nukleotydu T na A, prowadząca do zmiany kodonu TTA na kodon stop spowodowała przedwczesne skrócenie produktu białkowego. Mutacja zlokalizowana jest w N- terminalnej części białka. Substytucja 63T>A jest pierwszą mutacją wykrytą u polskiego pacjenta z zespołem Cowdena. Wykonanie analizy molekularnej genu *PTEN* może pozwolić na uniknięcie błędów związanych z postawieniem diagnozy.

Optimalizacja diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera, choroby Leśniowskiego-Crohna, raka rdzeniastego tarczycy i polipowatości jelita grubego.

M. Kaczmarek, J. Hoppe-Gołębiewska, A. Pławski, M. Podralska, L. Jakubowska, M. Szalata, R. Słomski

W Banku DNA pacjentów z rodzinną polipowatością jelita grubego zebrano próbki od 340 rodzin, uzyskując ponad 700 próbek DNA. Gen *APC* poddano analizie u 300 probantów. Zidentyfikowano 74 mutacji punktowych w 124 rodzinach z FAP. Spośród nich 34 mutacje są charakterystyczne tylko dla populacji polskiej. Spośród wykrytych mutacji siedem występuje w dwóch lub większej liczbie rodzin. Występowanie rearanżacji genu *APC* analizowano w 95 rodzinach, wykryto 24 rearanżacje, w tym w dwóch przypadkach całkowitą delecję genu *APC*.

W przypadku dystrofii mięśniowej Duchenne'a-Beckera wprowadzono nową technikę – MLPA (ang. *multiplex ligation dependent probe amplification*) umożliwiającą identyfikację

prawie 100% delecji oraz duplikacji. Metoda MLPA pozwala również identyfikować nosicielstwo tego typu mutacji u kobiet w sposób bezpośredni. Równocześnie dla chorych, u których nie wykryto delecji i duplikacji prowadzona jest analiza 32 eksonów pod kątem występowania mutacji punktowych (PCR-SSCP, PCR-HD, sekwencjonowanie DNA). U kobiet z rodzin chorych przeprowadzono analizę nosicielstwa w oparciu o analizę markerów genetycznych typu STR położonych w obrębie genu *DMD*. W celu podwyższenia czułości tej metody oraz polepszenia pewności wyniku wprowadzono kolejne 3 markery.

Diagnostyka molekularna genu *RET* w rodzinach z dziedzicznym rakiem rdzeniastym tarczycy jest prowadzona dla chorych z rozpoznaniem klinicznym raka rdzeniastego, zespołu MEN2A i MEN2B oraz członków ich rodzin, grupa badana obejmuje 300 osób. Analizą objęto 6 eksonów genu *RET*, w których najczęściej występują mutacje (eksony: 10, 11, 13, 14, 15, 16). Analizy prowadzone są przy zastosowaniu technik przesiewowych (PCR-SSCP), sekwencjonowania DNA i sekwencjonowania w czasie rzeczywistym.

W przypadku diagnostyki choroby Leśniowskiego-Crohna analizowano polimorfizmy genów *CARD15/NOD2* (P268S, R702W, G908R, 1007fsinsC) i *DLG5* (R30Q, A1490V). Prowadzono analizy przesiewowe eksonu 10 i 13 genu *DLG5*. Badaniom poddano grupę 296 osób chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna z rodzinami i 200 grupę populacyjną. Badania obejmowały analizę PCR-SSCP, sekwencjonowanie oraz pirosekwencjonowanie.

Profile ekspresji genów w tętniaku aorty brzusznej i w niedrożności aortalno-biodrowej, oceniane techniką macierzy cDNA Atlas.

A. Korcz, J. Mikołajczyk-Stecyna, M. Gabriel, G. Oszkinis, H. Witucka-Wall, K. Pawlaczyk, R. Słomski

Celem badań była próba porównania tętniaka aorty brzusznej i niedrożności aortalno-biodrowej (zespołu Leriche'a) poprzez analizę profili ekspresji genów metodą macierzy cDNA Atlas. Materiał biologiczny stanowiły próbki ściany aorty brzusznej od 12 chorych z tętniakiem aorty brzusznej, 8 z niedrożnością aortalno-biodrową oraz od 5 dawców narządów. Całkowity RNA izolowano z tkanki aorty i poddawano odwrotnej transkrypcji, a następnie hybrydyzowano do macierzy cDNA Atlas. Wyodrębniono grupę 36 genów (20 z grupy „cardiovascular” oraz 16 genów stresu) ulegających znamiennej statystycznie zróżnicowanej ekspresji na poziomie mRNA w badanych schorzeniach. Wyniki analizy otrzymanych profili ekspresji genów w tętniaku aorty brzusznej i niedrożności aortalno-biodrowej wskazują na szczególne znaczenie genów warunkujących stan zapalny i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej w obu schorzeniach.

Polimorfizm insercyjno-delecyjny ACE a ryzyko wystąpienia tętniaka aorty brzusznej lub zespołu Leriche'a.

A. Korcz, J. Mikołajczyk-Stecyna, M. Gabriel, G. Oszkinis, M. Zowczak-Drabarczyk, K. Pawlaczyk, R. Słomski

Celem prezentowanych badań było określenie, czy istnieje asocjacja pomiędzy określonym genotypem *ACE* a wystąpieniem tętniaka aorty brzusznej lub zespołu Leriche'a.

Genotypy *ACE* (*I/I*, *I/D*, *D/D*) zostały scharakteryzowane w czterech grupach: 133 pacjentów z AAA, 152 pacjentów z AIOD, 152 osoby z grupy kontrolnej i 392 osoby z grupy populacyjnej. Na podstawie analizy genotypów i częstości alleli stwierdzono, że polimorfizm insercyjno – delecyjny genu *ACE* nie jest czynnikiem podatności dla zespołu Leriche'a, ale

może być istotnym czynnikiem ryzyka dla powstania tętniaka aorty brzusznej przy współistniejącym nadciśnieniu u chorych.

Zastosowanie badań cytogenetycznych w transgenie zwierząt.

D. Lipiński, E. Mały, M. Kaczmarek, J. Hoppe-Gotłębiewska, R. Słomski

Techniki cytogenetyczne wykorzystano w analizie zwierząt transgeniczných: królików rodu WAPhGH i WAPFUC, świń rodu CMVFUT oraz królików podwójnie transgeniczných WAPhGH:WAPFUC. W wyniku przeprowadzonej analizy możliwe było wyłonienie osobników ze stabilnie wbudowanym transgenem w genom o prawidłowym kariotypie oraz podział osobników na homozygotyczne i heterozygotyczne. Wykazano następującą lokalizację transgenów: u królików WAPhGH - 7q26-27, u królików WAPFUC - 11q13-14, u świń CMVFUT - 14q28. Wykazano wpływ ekspresji transgeny na jego strukturę chromatynową, gdyż u królików w badanych fibroblastach transgeny utworzyły pętle (brak ekspresji), natomiast u świń sygnały FISH obecne były w postaci punktów (jest ekspresja). Analiza wyników 3D FISH za pomocą testu Manna-Whitney'a położenia transgeny u królików WAPhGH w porównaniu ze świniami CMVFUT wykazała, iż w płaszczyźnie xy u świń istnieje preferencja lokalizacji transgeny bliżej środka jądra w porównaniu z królikiem, gdzie sygnał lokalizuje się bliżej brzegu jądra. Przy pomocy testu χ^2 wykazano, że położenie sygnału w jądrze nie jest przypadkowe i u obydwu gatunków zauważono preferencję do określonej lokalizacji transgeny.

Przygotowywanie konstrukcji genowych do ekspresji genów człowieka u transgeniczných zwierząt.

D. Lipiński, A. Ptawski, M. Szalata, J. Zeyland, E. Mały, R. Słomski

Na potrzeby ksenotransplantacji przygotowane zostały trzy konstrukcje genowe zawierające sekwencje kodujące CD46, CD55 oraz CD59 - wybranych czynników odpowiedzialnych za regulację układu dopełniacza. Na matrycy całkowitego RNA syntetyzowano jednoniciowy cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem starterów oligo(dT) i enzymu odwrotnej transkryptazy. Przygotowano konstrukcje genowe pCD46-GFPBsd (7070 pz), pCD55-GFPBsd (7142 pz) oraz pCD59-GFPBsd (6389 pz) zawierające sekwencję kodującą czynnika CD46, CD55 lub CD59 pod kontrolą promotora zapewniającego ogólnoustrojową ekspresję transgeny. Prawidłowość sekwencji została potwierdzona przez sekwencjonowanie.

Badania nad mechanizmem regulacji translacji w spermatogenezie człowieka, zależnym od struktury regionów 3'UTR mRNA – testowanie oddziaływań kandydujących mRNA z białkami NANOS1 i PUMILIO2 w retardacji żelowej (kontynuacja).

L. Tomczyk, A. Spik, J. Jaruzelska

W warunkach *in vitro* białko PUMILIO2 tworzy kompleks z mRNA kodującym Spindlinę - czynnik progresji mejotycznej i mitotycznej komórek germinalnych. Retardacja żelowa w powiązaniu z testem kompetycji pokazała, że wiązanie się PUMILIO2 z regionem 3'UTR mRNA *Spindliny* zawierającym motywy GUUGU(A) oraz AUUGUA(B) w układzie A1B1A2B2 jest specyficzne. Ponadto, białko PUMILIO2 wykazywało istotnie słabsze powinowactwo z mutantami, niż z 3'UTR typu dzikiego. Co więcej, powinowactwo

PUMILIO2 z mutantami A1 i B1 było znacznie słabsze niż z mutantami A2 i B2. Wyniki te pokazują, że motywy A i B, a w szczególności A1 i B1 są istotne dla wiązania się białka PUMILIO2 z mRNA *Spindliny*. Celem następnego etapu badań będzie pokazanie, czy w tworzeniu się kompleksu PUMILIO2 z mRNA *Spindliny* uczestniczy białko NANOS1.

Próba wyjaśnienia funkcji białka NANOS1 w komórkach męskiej linii germinalnej człowieka poprzez analizę interakcji z białkami płodności, z zastosowaniem ko-immunoprecypitacji oraz fluoroimmunohistochemii.

B. Ginter-Matuszewska, K. Kusz, J. Jaruzelska

Drogą ko-immunoprecypitacji z transfekowanych ludzkich komórek somatycznych wykazano, że białko NANOS1, podobnie do białka PUMILIO2, tworzy kompleks z helikazą RNA Gemin3. Helikaza ta stanowi zakonserwowany czynnik biogenezy microRNAs. Zastosowanie techniki fluoroimmunohistochemicznej w skrawkach gonady męskiej człowieka pokazało, że kompleksy Gemin3-PUMILIO2 oraz Gemin3-NANOS1 obecne są w cytoplazmatycznym regionie około-jądrowym spermatogonii, spermatocytów oraz okrągłych spermatyd. Co więcej, w stadium późnych spermatocytów oraz okrągłych spermatyd kompleksy te ulegają kondensacji tworząc strukturę przypominającą ciało chromatoidowe, opisane wcześniej jako strukturę około-jądrową obecną wyłącznie w linii męskiej ssaków. Ciało chromatoidowe uważane jest za ewolucyjną pozostałość plazmy zarodkowej organizmów niższych, która determinuje komórki jako germinalne. Kontynuacja tych badań będzie polegała na sprawdzeniu czy zidentyfikowana struktura około-jądrowa stanowi ciało chromatoidowe.

Rola genów NANOS2 i NANOS3 w niepłodności męskiej (kontynuacja).

K. Kusz, L. Tomczyk, J. Jaruzelska

Geny NANOS2 i NANOS3 zostały poddane analizie w męskich komórkach germinalnych człowieka. Metodą northern wykazano, że gen *NANOS2* ulega specyficznej ekspresji w tkance jądra. Metodą fluoroimmunohistochemiczną pokazano następnie, że białko NANOS2 obecne jest w prenatalnych gonocytach oraz w komórkach germinalnych dorosłych mężczyzn do stadium okrągłych spermatyd włącznie. W grupie 214 niepłodnych mężczyzn zidentyfikowano dwa heterozygotyczne warianty SSCP genu *NANOS2*, u dwóch pacjentów charakteryzujących się kryptozoospermia, u których drugi allel był typu dzikiego. Jeden z wariantów SSCP spowodowany był mutacją H68Q, podczas gdy drugi mutacją H109H. Żadna z tych mutacji nie była obecna w kontrolnej grupie 400 płodnych mężczyzn. Mutacji H68Q towarzyszyła mikrodelecja w regionie AZF chromosomu Y. Pokazano, że również gen *NANOS3* ulega specyficznej ekspresji w tkance jądra. Na drodze analizy SSCP w tej samej grupie pacjentów zidentyfikowano dwa heterozygotyczne warianty genu *NANOS3*, z których każdy występował u jednego pacjenta. Jeden wariant spowodowany był mutacją insGly171-172 podczas gdy drugi mutacją IVS1+25delG. Obie mutacje występowały poza zakonserwowaną domeną palców cynkowych i nie były obecne w grupie kontrolnej. Analiza rodowodów pacjentów będzie konieczna by rozstrzygnąć czy mutacje wykryte u pacjentów są przyczyną niepłodności męskiej.

Analiza oddziaływań białko-białko pomiędzy Snapiną a białkiem NANOS1 i PUMILIO2 w kontekście różnicowania komórek męskiej linii germinalnej człowieka.

B. Ginter-Matuszewska, A. Rembiszewska, J. Jaruzelska

Interakcja białka Snapiny z białkami PUMILIO2 oraz NANOS1 zidentyfikowana została w screeningu biblioteki cDNA jądra człowieka w dwu-hybrydowym systemie drożdżowym i poddano ją dalszej analizie w skrawkach jądra z zastosowaniem fluoroimmunohistochemii oraz specyficznych przeciwciał. W ten sposób pokazano po raz pierwszy, że Snapina ulega ekspresji w komórkach germinalnych. Pokazano ponadto, że Snapina kolokalizuje z białkami PUMILIO2 i NANOS1 w cytoplazmie prenatalnych gonocytów oraz w regionie okołojądrowym cytoplazmy komórek spermatogenetycznych: spermatogonii, spermatocytów i okrągłych spermatyd. Wyniki te mogą oznaczać, odmienną niż dotąd opisaną rolę Snapiny w organizmach ssaków. Dzięki obecności domeny typu Coiled-Coil mogłaby pełnić rolę modulatora pomiędzy kompleksem NANOS1-PUMILIO2 a innymi oddziałującymi z nim białkami.

Allel D polimorfizmu ACE I/D jest niezależnym i specyficznym czynnikiem ryzyka progresji retinopatii wcześniaków (ang. *retinopathy of prematurity*; ROP)

E. Strauss, A. Gotz-Więckowska, J. Gadzinowski, A. Pawlak

Zbadano 100 dzieci urodzonych przed 30 tygodniem ciąży, u których przebieg kliniczny oceniono w okresie pierwszych 3 miesięcy życia, oraz 238 osób z populacji polskiej. Genotyp ACE oceniono metoda PCR.

Stwierdzone częstości alleli i genotypów ACE I/D w badanej grupie dzieci (allel D: 0,5; genotypy: II 20,4%; ID 53,1% i DD 26,5%) były zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga i nie odbiegały istotnie od częstości stwierdzonych w grupie populacyjnej (odpowiednio: 0,49; 27,3%; 47,5%; 25,2%). Obserwowano podwyższoną częstość nosicieli allela ACE D zarówno w całej grupie dzieci, u których wystąpiła retinopatia (leczonych i z remisją samoistną), jak i w podgrupie dzieci z ROP wymagającym leczenia. Częstość nosicieli allela ACE D u dzieci leczonych okazała się 4,9-krotnie wyższa w porównaniu do częstości u dzieci nieleczonych ($p=0,03$). Genotypy ACE ID+DD, okazały się niezależnymi predyktorami progresji ROP, których wpływ na ryzyko progresji wynosił 3%. Nie wykazano asocjacji genotypów ACE z takimi niezależnymi czynnikami ryzyka ROP jak całkowity okres tlenoterapii i wiek ciążowy, jak również z masą urodzeniową, chorobami współistniejącymi i parametrami leczenia.

Nosicielstwo allela ACE D stanowi istotny czynnik warunkujący gorszy przebieg ROP, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. Nie potwierdzono asocjacji między wystąpieniem ROP a genotypem ACE II. Ponadto wykazano, że wpływ genotypów ACE na przebieg ROP jest niezależny od pozostałych czynników ryzyka.

Badania nad genetyką zespołów otępiennych: choroby Alzheimera, otępieńczołowo-skroniowych oraz łagodnych zaburzeń poznawczych.

A. Kowalska, M. Wender, W. Kozubski

We współpracy z Prince of Wales Medical Research Institute w Sydney, Australia (A.Luty, P.R.Schofield) przeprowadzono screening mutacji w wyłonionym wcześniej metodą analizy sprzężeń regionie ramienia krótkiego chromosomu 9. Do badań wyselekcjonowano grupę 8 chorych z wczesną postacią FTD. W analizowanym regionie genomu nie wykryto

mutacji warunkujących FTD. W tym samym czasie wysiłki innych grup badawczych zaowocowały identyfikacją nowego genu w pozycji 9p13.2-21.3 związanego z etiopatogenezą ALS/FTD. Nadal pozostaje kontrowersyjna rola zmienności genetycznej APOE w patogenezie FTD. W całej zebranej dotąd grupie 22 chorych z FTD przeprowadzono analizę rozkładu genotypów APOE. Częstości homo- i heterozygot alleli APOE*2 i APOE*4 nie odbiegały znacząco od tych obserwowanych w grupie kontrolnej.

Rozpoczęto przygotowania do próby zastosowania mikromacierzy izoenergetycznych RNA do detekcji mutacji patogennych oraz oceny haplotypów H1/H2 genu *MAPT* u chorych z różnymi postaciami tauopatii - chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych patologią białka tau.

Badania nad genetyką chorób przyzębia i ich roli w etiopatogenezie chorób wieloczynnikowych związanych z wiekiem podeszłym (age-related disorders).

A. Kowalska, A. Kurhańska-Flisykowska, J. Jeszka, M. Wyganowska, J. Stopa

Choroby przyzębia (periodontopatie) są istotnym czynnikiem ryzyka w rozwoju wielu chorób związanych z podeszłym wiekiem (*age-related disorders*), stanowią też poważny problem medyczno-społeczny. Periodontopatie są uwarunkowane wieloczynnikowo, ich podłoże genetyczne nadal pozostaje nieznane. Poszukiwanie genetycznych i środowiskowych czynników ryzyka wydaje się być kluczowe zarówno dla zrozumienia mechanizmów patogenezы tych chorób, jak i dla rozwoju metod profilaktyki i terapii genowej.

We współpracy z Kliniką Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (*A. Kurhańska-Flisykowska, M. Wyganowska, J. Stopa*) wyselekcjonowano 67 chorych z postacią agresywną (*aggressive periodontitis*, n= 34) oraz przewlekłą (*chronic periodontitis* n= 33) periodontopatii. Oceny stanu przyzębia dokonano posługując się badaniem klinicznym i badaniem rentgenowskim, na podstawie zdjęcia pantomograficznego. Badanie kliniczne obejmowało ocenę stanu higieny jamy ustnej na podstawie wskaźnika odsetkowego powierzchni pokrytych biofilmem bakteryjnym wg O Lary, badanie stanu uzębienia z określeniem wartości liczby próchnicy PUW, ocenę stanu dziąseł na podstawie wartości wskaźnika Sulcus Bleeding Index wg Muhlemanna, pomiar głębokości kieszonek przyzębnych (mm) za pomocą periodontometru oraz określenie położenia klinicznego przyczepu łącznotkankowego (wysokość recesji w mm). Na podstawie pantomogramów stwierdzano zaawansowanie destrukcji kości wyrostka zębodołowego, położenie zmian, ich symetrię a także obecność głębokich ubytków kostnych. U wszystkich chorych przeprowadzono ocenę sposobu żywienia za pomocą metody 7-dniowego bieżącego notowania spożywanej żywności (*J. Jeszka*). Rozpoczęto analizę asocjacji genetycznych wybranych polimorfizmów DNA w genach: *IL-1A*, *IL-1B* oraz *APOE* z postacią agresywną i przewlekłą chorób przyzębia. Termin podsumowania wyników pierwszego etapu badań: czerwiec 2008.

3. MOLEKULARNO-GENETYCZNE ASPEKTY CHOROÓB NOWOTWOROWYCH I AUTOIMMUNIZACYJNYCH

Analiza mutacji i polimorfizmów w genie *NBS1*

-w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci

M. Mosor, D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Pernak, J. Nowak

Kontynuując badania genu *NBS1* w ostrych białaczkach u dzieci oceniono następujące polimorfizmy c.102G>A, c.553G>C, c.1124+18C>T, c.1197T>C, c.2016A>G, c.2071-30A/T. Genotyp TT polimorfizmu c.2071-30A/T występował znacząco częściej w grupie dzieci z ostrą białaczką z porównaniu do grupy kontrolnej. Genotypowanie 6 polimorfizmów pozwoliło wykazać związek haplotypu GGCTAA i ACTCGT z ostrą białaczką ($p=0.0038$, $p<0.001$ odpowiednio).

(Haplotypes and polymorphisms of the NBS1 gene in childhood acute leukemia. M. Mosor, I. Ziółkowska, D. Januszkiewicz-Lewandowska, J. Nowak, praca rzygotowywana do druku)

-w raku krtani i mnogich nowotworach pierwotnych

I. Ziółkowska, M. Mosor, M. Wierzbicka, D. Januszkiewicz-Lewandowska, J. Nowak

Zidentyfikowano 10 heterozygotycznych nosicieli mutacji p.I171V: 6 wśród 130 chorych z mnogimi nowotworami pierwotnymi (*Multiple Primary Tumors*- MPT) w obrębie głowy i szyi (4.6%) i 4 w grupie 175 chorych z rakiem krtani (2.3%). W grupie kontrolnej, liczącej 500 próbek, wykryto tylko jednego nosiciela mutacji p.I171V. Częstość mutacji p.I171V w grupie chorych z MPT (OR=24.6; CI:2.9-202.5; $P=0.0004$) i rakiem krtani (OR=11.7; CI:1.3-105.2; $P=0.0175$) była znacznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, wśród chorych z MPT stwierdzono 2 nosicieli mutacji p.D95N (1.7%), (OR=3.28; CI:0.295-36.68; $P=0.5601$). W eksonie 10 genu *NBS1* zidentyfikowano nową, heterozygotyczną zmianę c.1222A>G (p.K408E) u chorego z rakiem krtani. Nie znaleziono nosiciela mutacji p.R215W lub c.657_661delACAAA w badanych grupach chorych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że heterozygotyczna mutacja p.I171V w genie *NBS1* może być czynnikiem ryzyka w rozwoju nowotworów regionu głowy i szyi, zwłaszcza mnogich nowotworów pierwotnych. *(Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene. I. Ziółkowska, M. Mosor, M. Wierzbicka, M. Rydzanicz, M. Pernak-Schwarz, J. Nowak, Cancer Sci. 2007 Nov; 98 (11) :1701-5.)*

-w raku piersi

K. Rożnowski, D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Mosor, M. Pernak, J. Nowak

W grupie 270 kobiet z rakiem piersi w 7 przypadkach wykazano mutację w genie *NBS1*. Mutację I171V w 5 eksonie stwierdzono w 5 przypadkach, częstość występowania mutacji I171V w grupie chorych z rakiem piersi była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (OR:9,42; 95% CI:1.09-81.05; $P=0.02$). Germinalną mutację I171V można uznać za znaczący czynnik ryzyka w rozwoju raka piersi, zwłaszcza u kobiet, u których w rodzinie krewne pierwszego stopnia leczone były wcześniej z powodu raka piersi (OR: 6.00;95% CI: 0.98-38.07; $P=0.04$)

(K. Rożnowski, D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Moso, M. Pernak, M. Litwiniuk, J. Nowak I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007, DOI 10.1007/s10549-007-9734-1.)

Badanie mutacji genu glukokinazy i jądrowego czynnika hepatocytów (HNF-1 α) w cukrzycy ciężarowej typu MODY. Badania rodzinne.

M. Żurawek, D. Januszkiewicz-Lewandowska, E. Ożegowska, J. Nowak

MODY2 związana z mutacjami w genie glukokinazy (*GCK*) jest jedną z najczęściej spotykanych postaci cukrzycy MODY. Celem badań było określenie występowania cukrzycy typu MODY2 w grupie kobiet z cukrzycą ciężarnych, poprzez ustalenie częstości mutacji w genie *GCK*. W grupie 119 pacjentek z cukrzycą ciężarnych spełniających 3 spośród wymienionych kryteriów: wiek <35 roku życia, współczynnik masy ciała przed ciążą <25, wzrost glikemii w dwugodzinnym teście OGTT <4.6mmol/l, cukrzyca typu 2 lub/i cukrzyca ciężarnych u krewnych I^o lub II^o wykonano analizę polimorfizmu konformacji jednoniciowego DNA oraz sekwencjonowanie genu *GCK*. U 11 (9%) spośród 119 pacjentek z cukrzycą ciężarnych wykryto 7 zmian w genie *GCK*, 3 mutacje typu missens: G448fs, E312Q, S383L oraz 4 zmiany w sekwencjach intronowych: IVS2-12C>T, IVS3-8G>A, IVS4+26C>A, IVS7-13A>G. Mutacje G448fs i E312Q są nowo wykrytymi zmianami. Również 4 warianty sekwencji intronowych nie zostały dotąd opisane w literaturze. W grupie kontrolnej ciężarnych o prawidłowej glikemii (n=210) nie zidentyfikowano żadnej z opisanych zmian. Uzyskane wyniki wskazują, że częstość cukrzycy MODY2 w badanej grupie kobiet z cukrzycą ciężarnych wynosi 2%.

(M. Żurawek, E. Wender- Ożegowska, D. Januszkiewicz-Lewandowska, A. Zawiejska, J. Nowak. Występowanie cukrzycy MODY2 u kobiet z cukrzycą ciężarnych - analiza mutacji i polimorfizmów w genie glukokinazy. *Diabetologia Polska* 2007, vol. 14)

Analiza ilościowa ekspresji genów *TERT* i *TERC* /w wybranych nowotworach.

J. Nowak, M. Pernak, T. Nowak, K. Lewandowski, K. Nowicka, J. Rembowska, D. Januszkiewicz-Lewandowska

Dla oceny półilościowej ekspresji *TERC* i *TERT* posłużono się techniką PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR) z wykorzystaniem barwnika SYBR green. W większości przypadków uzyskiwano wysokie wartości C_t dla *TERT*, co wskazuje na brak lub bardzo niską ekspresję *TERT* w limfocytach krwi obwodowej. Wartości C_t *TERT* wahały się od 30,06 do 36,97. Wartości minimalne dla C_t *TERC* i β -aktyny były zbliżone i wynosiły odpowiednio 24,5 i 24,37, natomiast wartości maksymalne odpowiednio 36,17 i 30,9. Średnie wartości C_t dla *TERT*, *TERC*u i β -aktyny w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej różniły się istotnie statystycznie pomiędzy sobą. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w ekspresji h*TERT* i h*TERC* pomiędzy komórkami białaczkowymi ALL i ANLL a prawidłowymi limfocytami krwi obwodowej. Na uwagę zasługuje wykazanie statystycznie istotnej różnicy w ekspresji h*TERC* i β -aktyny pomiędzy komórkami ALL i ANLL. Ekspresja h*TERT* nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami ALL i ANLL. Wysoka ekspresja h*TERT* i h*TERC* oceniana techniką PCR w czasie rzeczywistym może stanowić uzupełniający marker diagnostyczny ostrych białaczek dzieci.

Badanie amplifikacji MYCN, TERT, TERC oraz ekspresji MYCN, TERT, TERC, hydroksylazy tyrozynowej i dekarboksylazy dopaminy dla określenia stopnia zaawansowania i wyboru leczenia w zwojaku zarodkowym u dzieci.

D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Pernak, M. Zawada, J. Rembowska, P. Mańkowski, J. Nowak

U 23 dzieci w wieku od 2 miesięcy do 9 lat ze zwojakiem zarodkowym przy użyciu techniki hybrydyzacji in situ (FISH) wykazano w komórkach guza amplifikację powyżej 10 kopii genu MYCN w 15/23 przypadkach. W 11/23 dzieci stwierdzono obecność amplifikacji powyżej 10 kopii genu MYCN w komórkach szpiku kostnego. W 11 przebadanych przypadkach neuroblastoma z IV stopniem zaawansowania w 9 wykazano podwyższoną względną ekspresję hydroksylazy tyrozynowej, a w 7 przypadkach podwyższoną względną ekspresję dekarboksylazy dopaminy w komórkach guza. W komórkach szpiku kostnego amplifikacja MYCN korelowała z ekspresją genu hydroksylazy tyrozynowej. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że ekspresja hydroksylazy tyrozynowej jest przydatnym markerem wskazującym na zajęcie szpiku kostnego w przebiegu neuroblastoma.

Występowanie sekwencji *pol*, *gag* i *env* retrowirusa MSRV u chorych ze stwardnieniem rozsianym.

M. Zawada, M. Pernak-Schwarz, D. Januszkiewicz-Lewandowska, I. Liweń, K. Nowicka, J. Rembowska, J. Nowak

Wśród przebadanych 20 osób z SM stwierdzono zwiększoną liczbę kopii sekwencji *gag* i *env* MSRV w porównaniu z osobami zdrowymi. Liczba kopii genu *gag* MSRV wahała się od 2 do 30 kopii na jądro interfazowe, a liczba kopii genu *env* MSRV była w zakresie od 2 do 36. Dane te w powiązaniu z uprzednio uzyskanymi wynikami dotyczącymi zwiększonej liczby kopii sekwencji *pol* MSRV u 60 osób z SM mogą sugerować prawdopodobny udział wirusa MSRV w patogenezie stwardnienia rozsianego.

Ponadto, u 40 pacjentów z SM stwierdzono ponad 3-krotnie większą liczbę mikrojąder w porównaniu z osobami zdrowymi. Zwiększona liczba mikrojąder u osób z SM w porównaniu z osobami zdrowymi może świadczyć o niestabilności genomu chorych na stwardnienie rozsiane. Stosując metody mikrodysekcji i FISH dokonano identyfikacji materiału genetycznego części mikrojąder jako pochodzących z chromosomów pary 1, 2, 3, 4, 14 i X.

Poszukiwanie nowych rearanżacji genów w T-ALL przy wykorzystaniu technik Fine Tailing Comparative Genome Hybridisation (FT-CGH) i Ligation Mediated PCR (LM-PCR).

A. Katożna, G. Przybylski

Metodą FT-CGH wykryto bialleliczną delecję locus receptora alfa/delta limfocytów T (*TRAD*) obejmującą fragment chromosomu 14q o wielkości ok. 8 kb, oraz znajdującą się bezpośrednio za nią monoalleliczną delecję o wielkości ok. 27 kb. Wykorzystując metodę LM-PCR zamplifikowano miejsce pęknięcia, a analiza sekwencyjna uzyskanych produktów amplifikacji wykazała dwie dotychczas nieopisane rearanżacje: większą, pomiędzy segmentem zmiennym *TRVA30* (21 706 725) a regionem 21 742 218, i znajdującą się wewnątrz niej mniejszą rearanżację pomiędzy *TRVA30* a regionem 21 714 582.

Obecność obydwu rearanżacji w badanej próbce T-ALL potwierdzono PCR z użyciem swoistych starterów na genomowym DNA. Mniejszą rearanżację wykryto również w trzech z czterech próbek DNA z grasic obumarłych płodów; natomiast w prawidłowych leukocytach krwi obwodowej nie wykryto żadnej z badanych rearanżacji. Wykryte rearanżacje wydają się być wczesnymi rekombinacjami locus *TRAD* zachodzącymi fizjologicznie w trakcie różnicowania tymocytów i ulegającymi delecji w dalszych etapach dojrzewania komórek T.

Poszukiwanie nowych rearanżacji genów w T-ALL przy wykorzystaniu technik Fine Tailing Comparative Genome Hybridisation (FT-CGH) i Ligation Mediated PCR (LM-PCR).

A. Kałużna, G. Przybylski

Metodą FT-CGH wykryto bialleliczną delecję locus receptora alfa/delta limfocytów T (*TRAD*) obejmującą fragment chromosomu 14q o wielkości ok. 8 kb, oraz znajdującą się bezpośrednio za nią monoalleliczną delecję o wielkości ok. 27 kb. Wykorzystując metodę LM-PCR zamplifikowano miejsce pęknięcia, a analiza sekwencyjna uzyskanych produktów amplifikacji wykazała dwie dotychczas nieopisane rearanżacje: większą, pomiędzy segmentem zmiennym *TRVA30* (21 706 725) a regionem 21 742 218, i znajdującą się wewnątrz niej mniejszą rearanżację pomiędzy *TRVA30* a regionem 21 714 582.

Obecność obydwu rearanżacji w badanej próbce T-ALL potwierdzono PCR z użyciem swoistych starterów na genomowym DNA. Mniejszą rearanżację wykryto również w trzech z czterech próbek DNA z grasic obumarłych płodów; natomiast w prawidłowych leukocytach krwi obwodowej nie wykryto żadnej z badanych rearanżacji. Wykryte rearanżacje wydają się być wczesnymi rekombinacjami locus *TRAD* zachodzącymi fizjologicznie w trakcie różnicowania tymocytów i ulegającymi delecji w dalszych etapach dojrzewania komórek T.

4. BADANIA GENETYCZNE NIEPŁODNOŚCI ORAZ MECHANIZMY PATOFIZJOLOGII ROZRODU

Badania ekspresji wybranych genów w spermatogenezie człowieka

M. Białas, P. Wojciechowska, N. Rozwadowska, A. Borczyńska, D. Fiszer, W. Kosicki, P. Jędrzejczak, M. Kurpisz

Przeprowadzono analizę ilościowej ekspresji genów *c-kit* oraz *SCF* z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym, we frakcjach komórkowych izolowanych ze zdrowej gonady, w homogenatach tkankowych z biopsji jąder z azoospermią oraz w nowotworach jąder. Ekspresja genu *c-kit* we wszystkich analizowanych grupach była wyższa niż dla genu *SCF*. Najwyższy poziom transkryptu dla genu *c-kit* obserwowano w grupie nowotworów. Mutacje w obrębie genu *c-kit*, będącego protoonkogenem, mogą prowadzić do rozwoju zmian nowotworowych na terenie gonady.

Dokonano także analizy poziomu ekspresji genów rodziny *IL-1* w gonadzie gryzoni u osobników męskich. Grupę badaną stanowiły myszy kontrolne z prawidłową spermatogenezą oraz myszy z upośledzoną spermatogenezą z powodu czynników egzogennych (działanie busulfanu, *cis*-platyny oraz podwyższonej temperatury), a także uwarunkowań genetycznych. W warunkach PCR w czasie rzeczywistym dokonano oceny

proporcji ekspresji IL-1 α /IL-1RA. U gryzoni z prawidłowymi gonadami zaobserwowano ok. 20-krotną przewagę ekspresji IL-1 α nad IL-1RA. Przy całkowitym zablokowaniu spermatogenezy busulfanem proporcja ta wzrastała do ponad 500-krotnej przewagi IL-1 α nad IL-1RA. Przy zaburzeniach spermatogenezy na tle genetycznym, ekspresja IL-1 α obniżała się, przy względnie stabilnej ekspresji IL-1RA. Jednak obserwowana zależność przewagi IL-1 α nad ekspresją IL-1RA w normalnej gonadzie mysiej była proporcją całkowicie odwrotną w stosunku do obserwowanej w gonadzie ludzkiej.

Epidemiologiczne badania niepłodności męskiej.

M. Kamieniczna, M. Frączek, A. Havryluk, M. Kurpisz

Przeciwciała przeciwplemnikowe mogą być jedną z przyczyn niepłodności immunologicznej. Przebadano 145 próbek od niepłodnych kobiet i mężczyzn głównie po próbach wspomaganego rozrodu zakończonych niepowodzeniem. Przy pomocy pośredniego testu z paciorkami poliakryloamidowymi (IDIBT – Indirect Immunobead Binding Test) zbadano 56 próbek surowic (24 od niepłodnych kobiet i 32 od niepłodnych mężczyzn), 18 próbek okołoowulacyjnego śluzu szyjkowego oraz 36 próbek plazmy nasiennej. Wykonano także 35 oznaczeń przeciwciał przeciwplemnikowych bezpośrednim testem IBT na powierzchni plemników u niepłodnych mężczyzn (DIBT – Direct Immunobead Binding Test). Badania te uzupełniono o pełne analizy semiologiczne nasienia wg standardów WHO. W pozytywnych próbkach określono topografię wiązania przeciwciał przeciwplemnikowych do plemników oraz izotyp przeciwciał. Próbki zabezpieczono do dalszych badań w celu określenia ich antygenowej reaktywności.

Patologia jąder (wnętrostwo, skręt jądra, jądra ruchome) w wieku przedpokwitaniowym doprowadza do zaindukowania przeciwciał przeciwplemnikowych, które mogą utrzymywać się aż do wieku dojrzałego. Badanie interakcji zachodzących pomiędzy układem immunologicznym a rozrodczym, na wczesnych etapach rozwoju osobniczego, może być kluczowe dla zmniejszenia ryzyka wystąpienia niepłodności męskiej z przyczyn immunologicznych. Pośrednim testem IBT (IDIBT - Indirect Immunobead Binding Test) zbadano 46 surowic od chłopców przed pokwitaniem, głównie z wnętrzem. Badaną populację stanowili głównie chłopcy będący w I fazie dojrzewania płciowego wg skali Tannera. Wyselekcjonowane próbki surowic zostaną wykorzystane do identyfikacji immunoreaktywnych antygenów plemnikowych. Chłopcy, u których stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych będą prospektywnie monitorowani, aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej.

W badaniach pilotowych stwierdzono zwracające uwagę asocjacje pewnych alleli układu HLA z współwystępowaniem przeciwciał przeciwplemnikowych.

Mechanizm stresu tlenowego jako przyczyna niepłodności męskiej.

M. Frączek, G. Dworacki, D. Sanocka, P. Jędrzejczak, A. Szumała-Kąkol, M. Kurpisz

Kontynuowano badanie wpływu stresu oksydacyjnego w nasieniu, wywołanego infekcją *in vitro*, na procesy apoptotyczne w gametach męskich przy wykorzystaniu techniki kometkowej i cytometrii przepływowej z wykorzystaniem barwienia TUNEL. Spośród dwóch wybranych szczepów bakteryjnych (*Escherichia coli* oraz *Bacteroides ureolyticus*), największy wpływ na fragmentację DNA miały bakterie beztlenowe, w szczególności w odniesieniu do plemników o lepszych parametrach seminologicznych. Uzyskane wyniki stanowią dowód na indukcję apoptozy ejakulowanych plemników w wyniku ich

bezpośredniego kontaktu z bakteriami lub ich toksynami, nawet bez pośrednictwa reaktywnych pochodnych tlenu. Dodatkowo, analiza plemników z pozytywną reakcją TUNEL w mikroskopie fluorescencyjnym wykazała zwiększoną fragmentację w obrębie wstawki. To interesujące spostrzeżenie potwierdza zwiększoną wrażliwość mitochondrialnego DNA na uszkodzenia oksydacyjne, co może być przyczyną szybszego kierowania plemników na drogę apoptozy.

Genetyczne podłoże męskiej niepłodności.

E. Wiland, M. Olszewska, M. Kurpisz

Podjęto problematykę oceny topologii chromosomów plemnikowych u zdrowych męskich osobników oraz z niepowodzeniami rozrodu (TCW – translokacje wzajemne).

Badano zarówno liniową jak i radialną lokalizację centromerów chromosomów 7, 9, X oraz Y w plemnikach od czterech mężczyzn kontrolnych o prawidłowym kariotypie oraz u sześciu nosicieli TCW: t(1;7), t(7;2), t(7;13), t(7;9), t(9;14) oraz t(4;13). Stwierdzono, że w jądrze komórkowym ludzkiego plemnika (u mężczyzn kontrolnych) prawdopodobnie występują międzyosobnicze różnice w topologii centromeru chromosomu Y w obszarze chromocentrum. Natomiast w porównaniu do plemników mężczyzn kontrolnych, w jądrach komórkowych plemników nosicieli translokacji (TCW), topologia chromosomów z translokacją była zaburzona a obszar chromocentrum (w którym analizowano lokalizację centromerów wybranych chromosomów) był rozszerzony w kierunku akrosomu. Jednocześnie obecność w jądrze komórkowym chromosomów z translokacją zaburzała topologię innych chromosomów ((X, Y)). Wyniki sugerują, że nieprawidłowej spermatogenezie wynikającej z obecności chromosomów z translokacją, mogą towarzyszyć zmiany w wewnątrzjądrowej architekturze ludzkiego plemnika.

Badanie komórek macierzystych człowieka dla celów terapii narządowej

N. Rozwadowska, Z. Czyż, M. Białas, W. Ruciński, A. Borczyńska, M. Kurpisz

Badania ostatnich lat ujawniły, iż komórki macierzyste identyfikowane w mięśniach szkieletowych u gryzoni zawierają co najmniej kilka populacji komórek o zróżnicowanym potencjale proliferacyjnym, zdolnościach regeneracyjnych czy możliwościach transróżnicowania. Określono tzw. komórki SP (ang. Side Population), czy MDSC (ang. Muscle Derived Stem Cells). Wykorzystując selekcję w oparciu o różnice w czasie adhezji komórek otrzymano trzy odrębne populacje komórkowe: populację wszesno-adherentną, mioblastów oraz populację MDSC-podobną. Przeprowadzono analizę ekspresji następujących genów: c-kit, CD-34 (markery komórek macierzystych), MyHC, desmina (markery komórek mięśniowych), N-CAM (marker komórek biorących udział w procesie fuzji i przylegania) w różnych punktach czasowych hodowli dla poszczególnych populacji komórkowych, a także różnice pomiędzy populacjami. Stwierdzono, że populacja komórek wyizolowanych z ludzkiego mięśnia szkieletowego jest heterogenna, a poziom ekspresji markerów macierzystych komórek mięśniowych (desminy, N-CAM, MyHC) wykazuje zróżnicowanie charakterystycznych zależności od momentu adhezji komórek oraz czasu trwania hodowli. Wysoki poziom ekspresji dla genu CD-34 w populacji MDSC może świadczyć o wysokim odsetku zawartości komórek satelitowych w tej populacji. Uzyskane wyniki są wstępem do optymalizacji warunków izolacji i hodowli komórek stosowanych zarówno w doświadczeniach transplantacyjnych jak i próbach klinicznych.

Modyfikacje genetyczne macierzystych komórek mięśniowych – badania przedkliniczne.
M. Krupka, M. Białas, N. Rozwadowska, W. Ruciński, M. Kurpisz

Stosowane metody przeszczepu mioblastów w regeneracji uszkodzonego pozawałowego mięśnia sercowego prowadzą do zmniejszenia obszaru blizny pozawałowej oraz poprawy parametrów hemodynamicznych. Połączenie przeszczepów komórkowych oraz terapii genowej umożliwi zmniejszenie śmiertelności implantowanych komórek oraz polepszenie ukrwienia mięśnia sercowego. Przeprowadzono optymalizację procesu transfekcji. Uzyskano przejściowo oraz stabilnie stransfekowaną linię mysich komórek C2C12 oraz transfekcję przejściową ludzkich mioblastów, z wykorzystaniem konstrukcji genowej wykazującej jednoczesną nadekspresję dwóch czynników proangiogennych – ludzkiego VEGF oraz FGF-4. Transfekowane komórki w porównaniu do populacji kontrolnej wykazywały zwiększone tempo proliferacji, podwyższone właściwości proangiogenne oraz zmniejszoną ekspresję genów biorących udział w miogenezie. Wykonano także próby przeszczepu stabilnie stransfekowanych komórek mysiej linii C2C12 oraz przejściowo transfekowanych ludzkich mioblastów do pozawałowego miokardium myszy. Ponadto utworzono konstrukcję genową zawierającą ORF genu endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) w plazmidzie pCiNeo (Promega), która w późniejszych etapach doświadczeń, podobnie jak w przypadku VEGF, będzie odpowiedzialna za indukcję procesu angiogenezy.

5. GENETYCZNE ASPEKTY PODATNOŚCI NA NOWOTWORY

A. Ocena indywidualnej podatności zapadalności na nowotwory.

Charakterystyka wybranych uszkodzeń chromosomów w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina oraz płaskonabłonkowego raka krtani.

M. Giefing, J. I. Martin-Subero, K. Kiwerska, M. Jarmuż, R. Grenman, R. Siebert, K. Szyfter

W ramach projektu przeanalizowano przy użyciu techniki array-CGH cztery linie komórkowe chłoniaka Hodgkina oraz trzy linie komórkowe płaskonabłonkowego raka krtani (LSCC). Badanie to pozwoliło na identyfikację 17 dotychczas nieopisanych delecji homozygotycznych w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina oraz 5 nowych delecji homozygotycznych w liniach płaskonabłonkowego raka krtani. Pośród genów ulegających utracie na skutek scharakteryzowanych delecji homozygotycznych wskazano szereg nowych, potencjalnych genów supresji nowotworowej w tym *SEPT9*, *GNG7* czy *CYBB* dla chłoniaków Hodgkina oraz *STK17A* dla LSCC. Wykazano także, że delecje homozygotyczne są częstym mechanizmem inaktywacji genu supresji nowotworowej *CDKN2A* w LSCC. Dodatkowo analiza ekspresji, analiza ontologii genów, sekwencjonowanie i analiza zidentyfikowanych delecji homozygotycznych na większej ilości linii komórkowych pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż inaktywacja wskazanych genów może mieć istotne znaczenie w patogenezie badanych nowotworów.

Poznanie mechanizmu powstawania wybranych translokacji chromosomowych o znaczeniu prognostycznym w nowotworach głowy i szyi.

M. Jarmuż, M. Giefing, M. Kostrzewska-Poczekaj, D. Brauze

Na podstawie wcześniejszych wyników własnych uzyskanych metodami cytogenetyki klasycznej oraz techniką FISH do badań wybrano translokacje, w których zaangażowany jest region 11q13 oraz delecję insercyjną w chromosomie pary 8. Rearanżacje chromosomów w tych regionach są powiązane z krótkim czasem przeżycia chorych na raka krtani.

Na dzień dzisiejszy trzy linie komórkowe wyprowadzone z płaskonabłonkowego raka krtani (UT-SCC-11, UT-SCC-22, UT-SCC-34) zostały przeanalizowane techniką array-CGH o wysokiej rozdzielczości. Uzyskane w ten sposób informacje na temat zmian ilości kopii DNA pozwalają na bliższe określenie miejsc pęknięć chromosomów a co się z tym wiąże także na zidentyfikowanie genów zlokalizowanych w zaangażowanych regionach. Geny te, potencjalnie są zdolne utworzyć geny fuzyjne, które na skutek translokacji mogą być istotne w procesie patogenezy płaskonabłonkowych nowotworów krtani. Dzięki wynikom uzyskanym z array CGH wybrano BACi (sztuczne chromosomy bakteryjne) i fosmidy do zmapowania punktów pęknięć w wybranych aberracjach chromosomowych oraz przeprowadzono wstępne hybrydyzacje.

Znaczenie prognostyczne diagnostyki molekularnej w stanach przedrakowych krtani - analiza utraty heterozygotyczności w dysplazjach i raku przedinwazyjnym.

K. Kiwerska, M. Rydzanicz, M. Kostrzewska-Poczekaj, M. Wierzbicka, K. Szyfter

Zmiany przednowotworowe to zmiany morfologiczne niosące ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworu złośliwego. Celem projektu jest korelacja cech genetycznych stanu przedrakowego krtani z jego klinicznym obrazem i transformacją nowotworową.

Zgromadzono materiał kliniczny pochodzący od 40 pacjentów diagnozowanych pod kątem wystąpienia zmian od dysplazji do carcinoma *in situ* oraz 16 pacjentów z polipami (łagodna zmiana przerostowa, nienowotworowa), stanowiących grupę referencyjną. Zastosowano technikę PCR i analizę utraty heterozygotyczności (LOH) z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w ramionach 3p, 8p, 9p, 13q. Przeanalizowano informatywność 12 markerów mikrosatelitarnych i wyselekcjonowano próby do właściwego badania LOH. Zakończono analizę dla grupy polipów oceniając poziom LOH dla poszczególnych markerów: d3s1038 – 33% LOH, d3s1304 – 66%, d3s1317 – 25%, d3s1284 – brak LOH, d3s1234 – brak LOH, d3s1300 – 12.5% LOH, d3s1621 – brak LOH, d3s1568 – 12.5%, d8s264 – 25%, d9s1870 – 30% LOH, d13s153 – 16%, d13s1307 – 37%.

Identyfikacja nowych onkogenów wybranych z silnie amplifikowanych regionów w liniach komórkowych raka krtani.

M. Kostrzewska-Poczekaj, M. Jarmuż, M. Giefing, D. Brauze, K. Szyfter

Wysoka rozdzielczość techniki array-CGH pozwala na precyzyjne określenie miejsc delecji i amplifikacji. W trzech przebadanych liniach płaskonabłonkowego raka krtani na dużą uwagę zasługuje amplifikacja w regionie 11q13 (linia UT-SCC-22) oraz 22q11-12 (linia UT-SCC-11). W regionie 22q11-12 wytypowano dwa geny o wysokim współczynniku log₂ratio: *CRKL* (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like): 1,53 i *MAPK* (mitogen-activated protein kinase 1): 1,85, gdzie za amplifikację przy diploidalnej linii komórkowej uważa się już współczynnik 1, a za silną amplifikację 1,32. Region ten zasługuje

na uwagę, ponieważ mniej precyzyjne badania za pomocą klasycznego CGH a także barwienia przeprowadzone do tej pory na tej linii wykazywały raczej delecję dużego fragmentu chromosomu 22, niż jego amplifikację.

W celu pomiaru stopnia amplifikacji badanych genów stosujemy technikę ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, z wykorzystaniem beta-2-microglobuliny (B2M) jako referencyjnej sekwencji DNA. Gen *B2M* znajduje się na chromosomie 15 i według wyników array CGH nie jest dodatkowo amplifikowany ($\log_2\text{ratio}$: 0,07). Wstępne wyniki sugerują zwiększoną amplifikację genu *CRKL* w większości badanych linii komórkowych.

Analiza utraty heterozygotyczności u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani.

K. Kiwerska, M. Wierzbicka, K. Szyfter

W roku 2007 kontynuowano prace nad utratą heterozygotyczności w płaskonabłonkowych rakach krtani w regionach znanych lub domniemanych genów supresorowych. Badania uzupełniono o kolejne polimorficzne markery mikrosatelitarne, zlokalizowane w regionach znanych genów supresorowych: d3s1317 (region genu *VHL*), d3s1621 (region genu *RASSF1*), d7s643 (region genu *ING3*), d13s1307 (region genu *Rb1*) oraz d18s484 (region genu *DCC*). Analizy prowadzono na DNA wyizolowanym od 65 pacjentów z krwi obwodowej, guza („a”), tkanki marginesu („b”) i 1-2 makroskopowo niezmiennych wycinków błony śluzowej pobranych z punktów najbardziej odległych od guza w preparacie operacyjnym („c”-nagłośnia, „d”-tchawica). Dla markerów d3s1317, d7s643, d13s1307 oraz d18s484 analizowano materiał od wszystkich pacjentów uzyskując odpowiednio: 14, 57, 63 oraz 15% przypadków informatywnych. Dla markera d3s1621 przeanalizowano do tej pory materiał od 61 pacjentów uzyskując 21% przypadków informatywnych.

Wyniki:

Marker	LOH a	LOH b	LOH c	LOH d
d3s1317	2/9	0	0	0
d3s1621	1/13	0	1/13	1/5
d7s643	5/37	5/37	3/37	1/24
d13s1307	15/41	7/41	7/40	0
d18s484	0	0	0	0

Prace w zakresie tego tematu zmierzają ku zakończeniu i finalizacji pracą doktorską.

Analiza mutacji w genie *p16*.

K. Kiwerska, M. Rydzanicz, K. Szyfter, K. Kram, W. Domagała

W 2007 roku zakończono doświadczenia w zakresie analizy mutacji w genie *p16* u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani. Przeanalizowano grupę 390 archiwalnych próbek (materiał uzyskano z Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie). W pierwszym etapie przeprowadzono odparafinowanie otrzymanych preparatów a następnie izolację DNA ze wszystkich skrawków. Jako metodę przesiewową zastosowano technikę PCR-SSCP. Analizowano oba eksony genu *p16*, każdy w dwóch fragmentach. Próby ze zmienionym wzorem migracyjnym konformerów sekwencjonowano. Zmiany w układzie konformerów wykryto w 67 próbach (17%); po sekwencjonowaniu stwierdzono w 13 przypadkach występowanie więcej niż jednej zmiany. Ogółem zidentyfikowano 40 różnych zmian w sekwencji kodującej oraz 10 w sekwencji intronowej. 11 zmian wykryto w eksonie 1, a 29 zmian w eksonie 2. Wśród tych zmian 20 to mutacje zmiany sensu, 10 to mutacje nie zmieniające aminokwasu, 9 to mutacje powodujące wprowadzające kodon „stop” a 1 to znany

polimorfizm A148T. 32 zmiany to substytucje pojedynczej zasady, 6 to zmiany delecyjne (1-7 zasad) a kolejne 2 to duplikacje pojedynczej zasady. Część z wykrytych zmian to zmiany znane, opisane wcześniej w literaturze w różnych typach nowotworów, w tym też krtani, natomiast część to zmiany nowe, dotąd nieopisane.

Wpływ polimorfizmu receptora Ah na przeżywalność pacjentów z płaskonabłonkowymi rakami krtani.

M. Arndt, D. Brauze, K. Szyfter

Celem pracy jest ocena zależności między występowaniem polimorfizmów receptora Ah a czasem przeżycia pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani w powiązaniu z inicjacją i dynamiką procesu nowotworowego z uwzględnieniem wpływu palenia tytoniu. Celem dodatkowym jest znalezienie ewentualnych nowych polimorfizmów w obrębie genu kodującego receptor Ah.

Materiał badawczy stanowi krew obwodowa pozyskana od pacjentów ze zdiagnozowanym płaskonabłonkowym nowotworem krtani. Następnie za pomocą izolacji DNA oraz technik PCR i RFLP (enzym Hpy188I) oraz sekwencjonowania produktów PCR prowadzona jest analiza polimorfizmów receptora Ah oraz korelacja obecnych polimorfizmów z informacją kliniczną (palenie papierosów, zastosowana terapia, nawroty choroby, czas przeżycia) uzyskiwaną z Kliniki Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Aktualna wielkość grupy badanej: 70 osób a docelowa: 140 osób.

Znaczenie receptora Ah w procesach prowadzących do transformacji nowotworowej.

D. Brauze

Z uwagi na kluczowe znaczenie AhR w kancerogenezie wywoływanej niektórymi węglowodorami aromatycznymi (np. benzo/a/pirenem) oraz dioksynami (TCDD) kontynuowaliśmy badania wpływu różnych ligandów AhR na ekspresję związanych z tym receptorem genów. Jednym z genów bezpośrednio regulowanych przez receptor Ah może być polimeraza DNA kappa. Enzym ten potrafi przeprowadzać replikację DNA mimo obecności adduktów benzo(a)pirenu. Mimo wcześniejszych doniesień literaturowych dotyczących myszy i człowieka, nie udało nam się zaobserwować indukcji mRNA polimerazy kappa w wątrobie szczurów Sprague-Dawley traktowanych ligandami receptora Ah (metylocholanren, β -naftoflawon, α -naftoflawon, TCDD). Równocześnie obserwowano indukcję ekspresji mRNA innych genów regulowanych przez receptor Ah (cytochromy P450 1A1, 1A2 i 1B1). Dla wyeliminowania ewentualne różnic międzypłciowych, porównano ekspresję polimerazy kappa przez ligandy AhR u samic i samców szczurów, nie obserwując większych różnic. Na obecnym etapie badań trudno stwierdzić czy brak indukcji polimerazy kappa przez ligandy AhR związany jest z różnicami międzygatunkowymi czy innymi czynnikami.

Wpływ czynnika Nrf2 na poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w aspekcie kancerogenezy chemicznej.

P. Jałoszyński, S. Nishimura

Realizowany temat stanowi kontynuację badań nad rolą oksydacyjnych uszkodzeń DNA i ich usuwania w procesie kancerogenezy. Do dotychczasowych badań skupionych na oznaczeniach poziomu 8-hydroksyguanyzy oraz ekspresji genu kodującego enzym naprawczy

OGG1 wprowadzono ocenę wpływu czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Badania przeprowadzono na wyprowadzonych znokautowanych szczepach myszy: *Nrf2*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} i podwójnie znokautowanych. Uszkodzenia oksydacyjne indukowano KBrO₃ a monitorowano poziom OGG1 i nefrotoksyczność. Wykazano wpływ Nrf2 na poziom obu uszkodzeń, ale jednocześnie stwierdzono, że zmiany poziomu glutationu, posiadającego wysoki potencjał genotoksyczny, są niezależne od czynnika Nrf2. Dla wyjaśnienia tej sprzeczności postuluje się obecność dodatkowego czynnika zależnego od Nrf2 odgrywającego zasadniczą rolę w kontroli genotoksyczności indukowanej pod wpływem KBrO₃.

B. Ocena właściwości genotoksycznych substancji chemicznych stosowanych w terapii.

Identyfikacja mutacji w mitochondrialnym genie *12S rRNA* u osób niesłyszących leczonych antybiotykami aminoglikozydowymi.

M. Rydzanicz, M. Wróbel, W. Gawęcki, M. Kostrzewska-Poczekaj, D. Brauze, K. Szyfter

Mutacje w mitochondrialnym genie *12S rRNA* mogą warunkować wrażliwość na ototoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych (AG) a w konsekwencji prowadzić do utraty lub pogorszenia słuchu. Celem prowadzonych badań jest identyfikacja mutacji i polimorfizmów genu *12S rRNA* potencjalnie związanych z wrażliwością na ototoksyczne działanie aminoglikozydów.

Analizowano sekwencję genu w trzech grupach: pacjenci z niedosłuchem po leczeniu AG (n=62), osoby słyszące (n=153), grupa populacyjna (n=500). W grupie niesłyszących zidentyfikowano 4 różne substytucje w układzie homoplazmicznym w tym: mutację A1555G (5/62; 8%), dwie potencjalnie patologiczne zmiany T669C (2/26; 3.2%), G988A (1/62; 1.6%) oraz znany polimorfizm G709A (4/62; 6.5%). Z wyjątkiem polimorfizmu G709A, żadna ze zmian wykrytych w grupie niesłyszących nie była obecna w grupie słyszących. W grupie populacyjnej zidentyfikowano 29 wariantów genu, w tym: 4 mutacje związane z niedosłuchem izolowanym lub wywołanym przez AG (A827G z częstością 1/500, C960insC – 1/167, T961C – 1/250 i A1555G - 1/250), 6 polimorfizmów oraz 19 rzadkich wariantów sekwencji. T689C, A751G, A1139delA i C1556T zidentyfikowano po raz pierwszy i zgłoszono do mitochondrialnej bazy danych MITOMAP.

Indukcja jednoniciowych pęknięć DNA generowanych ekspozycją na anestetyki miejscowe, z wykorzystaniem techniki comet assay.

M. Arndt, M. Kostrzewska, T. Karpiński, K. Szyfter

Analiza miała na celu wykazać, czy którykolwiek spośród szeroko stosowanych w praktyce lekarskiej anestetyków lokalnych (lidokaina, bupiwakaina, artikaina, mepiwakaina) charakteryzuje się właściwością generowania pęknięć jednoniciowych DNA.

Materiałem do badań była krew obwodowa pobierana od zdrowych, niepalących i niepijących osób w przedziale wiekowym: 20-27 lat. Pozyskane z niej komórki poddawano ekspozycji na powyższe związki anestetyków w trzech stężeniach. Czasy ekspozycji różnicowano do 15 i 60 min. Część prób poddawano następnie procesom enzymatycznej naprawy indukowanych uszkodzeń. Wykonano 8 powtórzeń dla każdego eksperymentu. Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że żaden z użytych anestetyków lokalnych nie indukuje pęknięć DNA na poziomie właściwym dla substancji genotoksycznych.

C. Inne tematy

Identyfikacja i analiza sekwencji genu lub genów odpowiedzialnych za wysoką rodzinną krótkowzroczność w populacji polskiej.

M. Rydzanicz, A. Frajdenberg, M. Podfigurna-Musielak, M. Mrugasz, K. Pecold, S.M. Leal, B. Bejjani, M. Gajęcka

Etiologia krótkowzroczności nie została w pełni określona. Przyjmuje się, że wysoka rodzinna krótkowzroczność (defekt przekraczający -6,0 dioptrii) jest chorobą wieloczynnikową z dominującym znaczeniem czynnika genetycznego, którego dotąd nie poznano mimo opisanie 11 loci sprzężonych z chorobą.

Pozyskano 61 rodowodów od rodzin polskich z wysoką rodzinną krótkowzrocznością. W większości rodowodów zaobserwowano autosomalnie dominujący typ dziedziczenia.

Przeprowadzono badanie okulistyczne oraz wyizolowano genomowy DNA od 466 osób, w tym od 146 z wysoką krótkowzrocznością. Badania wstępne, poprzedzające analizę całego genomu, wykluczyły w analizowanych rodzinach zespoły Sticklera, Marfana i Knoblocha. Nie wykazano sprzężenia wysokiej krótkowzroczności w rodzinach polskich z żadnym z proponowanych wcześniej loci, w tym 7q36 (*MYP4*), 12q21-23 (*MYP3*), 18p11.31 (*MYP2*), 17q21-23 (*MYP5*), 2q37, 4q22-4q27, 10q i 22q12 (*MYP6*, szkolna krótkowzroczność). Analiza genomu przeprowadzona dla chromosomów 1-16 wykazała istnienie trzech potencjalnych loci w rodzinach polskich z tą chorobą. W trakcie realizacji jest genotypowanie z wykorzystaniem dodatkowych markerów oraz analizy sprzężeń.