

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI ZADAŃ BADAWCZYCH w roku 2006

1. MOLEKULARNE I CYTOGENETYCZNE BADANIA CHORÓB GENETYCZNYCH

Mapowanie i analiza genów warunkujących choroby rzęskopochodne (PCD/KS, RP).

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

Materiał badawczy stanowi DNA od ponad 130 rodzin z PCD/KS. W sprawozdawanym okresie kontynuowano analizę sprzężeń w chromosomie 15q24-25 w rodzinach z zespołem Kartagera (KS, podtyp PCD z przełożeniem trzewi). W okolicy najsilniej sprzężonego markera (D15S1005) genotypowano kolejne markery celem zawężenia regionu sprzężenia oraz przeprowadzono analizę sekwencji kodujących w kilku genach kandydujących w rodzinach wykazujących najsilniejsze sprzężenie. W zakresie analizy sekwencji genu *DNAH5* przeprowadzono analizę kolejnych eksonów w zawężonej grupie rodzin, u których wykluczono udział *DNAH5* w patogenezie PCD. Kontynuowano (współpraca z grupą prof. Omrana) analizę immunofluorescencyjną w preparatach komórek nabłonka orzęsionego od chorego z rodziny, w której sprzężone z chromosomem X barwnikowe zwyrodnienie siatkówki (mutacja w genie *RPGR*) współwystępuje z objawami PCD. Ponadto, przeprowadzono analizę nosicielstwa mutacji genu *CFTR* u chorych na PCD.

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

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

W sprawozdawanym okresie kontynuowano badania różnorodności genetycznej populacji polskiej w obrębie genów *DNAH5* i *CFTR* (PCR/SSCP, sekwencjonowanie, hybrydyzacja ASO). Przeprowadzono analizę 4-markerowego haplotypu *CFTR* (IVS6aGATT-T854-IVS17bTA-TUB20) u kolejnych ~80 chorych na mukowiscydozę z mutacjami F508 del, 3849+10kbC>T, G542X, 2,3del21kb oraz 1117-1G>A (łącznie ~210 pacjentów). Na podstawie analizy haplotypu złożonego z markerów SNP w genie *DNAH5* wytypowano rodziny PCD, w których ten gen nie bierze udziału w patogenezie, a także określono tło haplotypowe powtarzających się mutacji.

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

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

Przeprowadzono analizę częstości występowania mikrojąder i nondysjunkcji w limfocytach krwi obwodowej stulatków (52 osoby) i grupy kontrolnej (ponad 70 osób w wieku 21-78 lat). W analizie stosowano technikę FISH z sondami dla wybranych chromosomów; w statystycznej ocenie różnic poziomu aberracji wykorzystano testy nieparametryczne i analizę regresji. Wykonano 131 badań (technika fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ i klasyczna technika cytogenetyczna) u 40 pacjentów z ALL i CML na limfocytach krwi obwodowej i szpiku kostnego. U 27 (22 w momencie rozpoznania i 5-monitorowanie terapii) dzieci z ALL przeprowadzono 90 badań z zastosowaniem FISH z sondami molekularnymi BCR/ABL, TEL/AML oraz MLL. W dwóch przypadkach

stwierdzono fuzję genów TEL/AML i w czterech przypadkach rearanżację genu MLL. U 13 dzieci z CML (4 w momencie rozpoznania i 9- monitorowanie terapii) przeprowadzono 41 badań z sondą molekularną BCR/ABL. W pięciu przypadkach stwierdzono występowanie fuzji genów BCR/ABL. U jednej pacjentki z CML, w momencie rozpoznania określono kariotyp i stwierdzono translokację między chromosomami pary 8 i 22.

Analiza molekularna genu *CFTR* w populacji polskiej. (*E. Rutkiewicz, E. Ziętkiewicz, M. Witt*)

W 2006 roku kontynuowano program identyfikacji mutacji genu *CFTR* powodujących mukowiscydozę (CF) w rodzinach ryzyka genetycznego. Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej, posiadający międzynarodowe certyfikaty jakości, pełni rolę jednego z dwóch krajowych ośrodków referencyjnych ds. analizy molekularnej w mukowiscydozie. Badaniami objęto osoby z klinicznym rozpoznaniem lub z podejrzeniem mukowiscydozy. Przeprowadzono 169 badań mających na celu identyfikację mutacji genu *CFTR* (w tym przebadano 46 pacjentów w ramach analizy molekularnej niepłodności męskiej - stwierdzając u 5 pacjentów pojedynczą mutację). Chorzy kierowani byli z 5 ośrodków klinicznych w kraju. Jedną mutację genu *CFTR* zidentyfikowano u 9 chorych, u 35 chorych zidentyfikowano dwie mutacje (z tego u 22 chorych stwierdzono układ homozygotyczny F508del/F508del). Przebadano 6 potencjalnych bezobjawowych nosicieli genu *CFTR*, potwierdzając nosicielstwo mutacji powodujących mukowiscydozę u 3 osób.

Badania ilościowe chimeryzmu komórkowego oraz choroby resztkowej u dzieci z ALL po transplantacji szpiku kostnego. (*J. Jółkowska, M. Dawidowska, A. Wojda, T. Szczepański, J. Wachowiak, M. Witt*)

U 5 dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, które poddane zostały allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych w 2006 roku, przeprowadzono badania molekularne chimeryzmu potransplantacyjnego. Do badań tych zastosowano metodę opartą na analizie wybranych markerów mikrosatelitarnych (FGA, TH, VWA, D21S11, D12S391, D81179) oraz metodę real-time PCR, opartą na analizie 6 polimorfizmów typu delecja genu (*SRY, RHD, GSTM1, GSTT1, S03, S06*), 9 biallelicznych polimorfizmów typu ins/del w obrębie genu (*RHC/c, ACE, S04-5, S07-11*) oraz genu konstytutywnego CCR5, jest to „normalizator” do analizy chimeryzmu po przeszczepieniu szpiku. Badania molekularne chimeryzmu poprzyszczepowego prowadzono w miarę możliwości, w ściśle określonych odstępach czasu po zabiegu HSCT (raz w tygodniu, do 100 dnia po HSCT). U wszystkich pacjentów, z wykorzystaniem metody STR-PCR, zidentyfikowano pełny chimeryzm. Metodą real-time PCR badania chimeryzmu wykonano u 2 pacjentów, w 9 punktach czasowych po HSCT. U badanych pacjentów procent cechy dawcy zidentyfikowano na poziomie 97.6-99.72 oraz 94.86- 99.91. W grupie 61 pacjentów z ALL zidentyfikowano 181 klonalnych rearanżacji Ig/TCR, na co składa się 48 rearanżacji genów *IGH*, 32 rearanżacje genów *IGK-Kde*, 48 rearanżacji genów *TCRD*, 11 rearanżacji genów *TCRD/A*, 40 rearanżacji genów *TCRG* oraz 2 rearanżacje genów *TCRB*. W przypadku 27 pacjentów z badanej grupy, w oparciu o sekwencje złącz zrearanżowanych genów Ig/TCR, zaprojektowano startery ASO (ang. *allele specific oligonucleotide*) i wykonano oznaczenia poziomów MRD w RQ-PCR. U 20 pacjentów obserwowano spadek poziomów MRD w kolejnych punktach czasowych leczenia, u 5 pacjentów stały poziom MRD (3/5 negatywny), a u 1 pacjenta wzrost poziomu MRD, co odzwierciedlało wystąpienie wznowy

ALL. W przypadku 1 pacjenta wykonanie oznaczeń MRD okazało się niemożliwe ze względu na niewystarczającą czułość rearanżacji markerowej (*TCRG* jako jedyna rearanżacja u tego pacjenta). Do tej pory 3 pacjentów z badanej grupy zostało poddanych transplantacji komórek hematopoetycznych i planowane są u nich oznaczenia poziomu MRD po transplantacji oraz badania chimeryzmu poprzyszczepowego.

2. BADANIA STRUKTURY I FUNKCJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

Poszukiwanie mutacji genu *MYH* u pacjentów z polipowatością jelita grubego, u których nie wykryto mutacji w genie *APC*

(*A. Pławski, M. Podralska, D. Lipiński, R. Słomski*)

Przebadano DNA 90 osób z naszego banku DNA pacjentów z polipowatością jelita grubego, u których nie wykryto mutacji w genie *APC*. Dwie z najczęstszych mutacji genu *MYH* (Y165C i G382D) występowały w formie heterozygotycznej u 13% pacjentów. Nie wykryto innych mutacji w sekwencji kodującej tego genu. U osób, u których mutacja genu *MYH* występowała w formie heterozygotycznej, objawy chorobowe były podobne, jak u chorych bez mutacji, a średni wiek wystąpienia choroby był nawet niższy. Powyższe obserwacje pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że mutacje genu *MYH* nie warunkują wystąpienia choroby. Uzyskane wyniki wskazują, że kryteria rozpoznania FAP są bardziej precyzyjne niż stosowane w innych krajach.

Optimalizacja diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera (gen *DMD*), choroby Leśniowskiego-Crohna (gen *NOD2/CARD15*), raka rdzeniastego tarczycy (gen *RET*) i polipowatości jelita grubego (gen *APC*).

(*M. Kaczmarek, J. Hoppe-Gołębiewska, A. Pławski, R. Słomski*)

Badania molekularne w chorobie Leśniowskiego-Crohna obejmowały analizę polimorfizmów genu *CARD15/NOD2* (P268S, R702W, G908R, 1007fsinsC) oraz genu *DLG5* (R30Q, A1490V). Przeprowadzono również wykrywanie mutacji w eksonach 10 i 23 genu *DLG5*. Badaniom poddano 254 osoby z Wielkopolski, obejmujące pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Leśniowskiego-Crohna wraz z rodzinami oraz 100 osób z grupy populacyjnej. Poszukiwanie mutacji prowadzono metodą PCR-SSCP, a następnie bezpośrednio sekwencjonowano próbki, albo prowadzono genotypowanie z zastosowaniem pirosekwencjonowania. Analiza statystyczna dla wariantu P268Ser genu *CARD15/NOD2* wskazuje, że allel C występuje z częstością 0,61, allel T – 0,39. Allel T występuje z wyższą częstością u osób chorych niż w populacji – 0,155. Zaobserwowano współwystępowanie wariantów polimorficznych genów *CARD15/NOD2* i *DLG5*. W 10 przypadkach mutacja 1007fs współwystępowała z homozygotyczną formą 268Ser. U dwóch pacjentów homozygotycznych dla 268Ser, wykryto homozygotyczny wariant 1007fs. Nasze wyniki potwierdzają obserwację, że około 50% chorych jest nosicielami co najmniej 1 mutacji i wspierają hipotezę, że całkowite uszkodzenie drogi sygnalizacji białka NOD2 i współdziałanie między genami *CARD15/NOD2* i *DLG5* albo innymi genami podatności może być niezbędne do wystąpienia choroby. W roku sprawozdawczym wdrożono wykrywanie mutacji w genie *DMD* i nosicielstwa metodą MLPA.

Przygotowywanie konstrukcji genowych do ekspresji genów człowieka u transgenicznych zwierząt.

(D. Lipiński, A. Pławski, M. Szalata, J. Zeyland, W. Juzwa, P. Toboła, R. Słomski)

W ramach współpracy z Instytutem Zootechniki –PIB w Balicach przygotowano konstrukcje genowe WAP-CFIII i WAP-C1Inh zawierające sekwencję kodującą czynnik tkankowy człowieka i sekwencję kodującą inhibitor C1 człowieka pod kontrolą promotora specyficznego dla gruczołu mlekowego. Gen kodujący czynnik tkankowy człowieka (CFIII) amplifikowano metodą PCR na matrycy jednoniciowego cDNA, za pomocą starterów modyfikowanych. Starter F zawierał na końcu 5' oprócz sekwencji komplementarnej do amplifikowanego genu, sekwencję kodującą 6 reszt histydyny rozpoznawane przez enzym enterokinazę oraz miejsce restrykcyjne NcoI, natomiast starter R sekwencję miejsca restrykcyjnego HindIII. Gen kodujący inhibitor C1 człowieka amplifikowano metodą PCR na matrycy biblioteki cDNA wątroby. Sekwencję regulatorową genu WAP szczura amplifikowano metodą PCR na matrycy genomowego DNA, za pomocą starterów modyfikowanych, z których starter F zawierał na końcu 5' oprócz sekwencji komplementarnej do amplifikowanego fragmentu miejsce restrykcyjne EcoRI, natomiast starter R sekwencję miejsca restrykcyjnego NcoI. Sekwencję sygnałową poli(A) hormonu wzrostu człowieka amplifikowano metodą PCR, na matrycy genomowego DNA, za pomocą starterów modyfikowanych, z których starter F zawierał na końcu 5' oprócz sekwencji komplementarnej do amplifikowanego fragmentu miejsce restrykcyjne HindIII, natomiast starter R sekwencję miejsca restrykcyjnego HindIII. Produkty PCR klonowano do wektora pBluescriptSK(+). Prawidłową sekwencję nukleotydów potwierdzano przez sekwencjonowanie metodą cykliczną z zastosowaniem zestawu do automatycznego sekwencjonowania MegaBACE.

Zastosowanie badań cytogenetycznych w transgenezie zwierząt.

(D. Lipiński, E. Michalak, R. Słomski, M. Kaczmarek, J. Hoppe-Gołębiowska)

Badaniami cytogenetycznymi objęto trzy grupy zwierząt transgenicznych uzyskanych wcześniej z zastosowaniem mikroiniekcji w ramach współpracy z Instytutem Zootechniki –PIB w Balicach. Analizowano króliki WAPhGH wytwarzające w gruczole mlekowym hormon wzrostu, króliki WAPFUT wytwarzające w gruczole mlekowym alfa-1,3-fukozylotransferazę i świnię CMVFUT przygotowane dla potrzeb ksenotransplantacji. Badania wykonano na fibroblastach z bioptatów usznych. Badania kariotypów nie wykazały zmian w trzech pokoleniach królików. Metodą FISH potwierdzono wcześniejsze obserwacje stabilności transgenezy. U królików WAPhGH transgen zlokalizowano na chromosomie 7q26-27, u królików WAPFUT na chromosomie 11q13-14, a u transgenicznych świń CMVFUT na chromosomie 14q28. We wszystkich przypadkach wykazano stabilność genomu po integracji transgeny, nie zaobserwowano reorganizacji chromosomów. Fizyczna lokalizacja transgeny dla wszystkich badanych zwierząt wskazuje na stabilność transgenezy. Przeprowadzono również porównanie wyników badań molekularnych i cytogenetycznych.

Charakterystyka interakcji białkowych kompleksu NANOS1-PUMILIO2 w męskich komórkach germinalnych człowieka (kontynuacja).

(B. Ginter-Matuszewska, K. Kusz, A. Rembiszewska, A. Spik, J. Jaruzelska)

Techniką western wykazano ekspresję interaktorów NANOS1 (białek translacyjnych DP103 oraz HSPCO21) w ekstraktach tkanki jądra myszy i człowieka. Komórki ssaków transfekowano plazmidem kodującym PUMILIO2 i przeprowadzono immunoprecypitację przeciwciałem anti-PUMILIO2. W immunoprecypitacie wykryto endogenne białko DP103. Dowiedziono w ten sposób, że białka PUMILIO2 i DP103 mogą tworzyć ze sobą kompleks w komórkach ssaków. Imunohistochemiczna analiza skrawków jąder pokazała, że białka DP103, PABPC3 oraz HSPCO21 współwystępują z białkami PUMILIO2 i NANOS1 w cytoplazmie macierzystych komórek germinalnych (spermatogoniach) oraz w komórkach mejotycznych (spermatocytach i okrągłych spermatydach) człowieka.

Próba poznania mechanizmu molekularnego, który jest zaburzony przez mutacje genu NANOS1 wykryte u nieplodnych mężczyzn (kontynuacja).

(K. Kusz, M. Kotecki, J. Jaruzelska)

Wykonano konstrukcje kodujące cDNA *NANOS1* typu dzikiego, cDNA zawierające mutacje punktowe wykryte u nieplodnych, lub mutacje punktowe o charakterze neutralnym, w wektorze pACT oraz pBIND. W tych samych wektorach przygotowano konstrukcje kodujące interaktory NANOS1: PABPC3, HSPCO21 oraz DP103 (w sumie 20 plazmidów). Odpowiednimi parami konstrukcji: jedną kodującą *NANOS1* i drugą kodującą odpowiedni interaktor *NANOS1* transfekowano komórki COS i mierzono interakcję poprzez pomiar aktywności reporterowego białka – lucyferazy. Wstępne doświadczenie wykazało znaczny spadek aktywności lucyferazy, w ko-transfekcji cDNA *NANOS1* zawierającego mutację deltaS78 (występującą wyłącznie u nieplodnych mężczyzn) z cDNA PUMILIO2. Może to oznaczać, że mutacja ta zaburza interakcję tych dwóch białek.

Poszukiwanie mRNA regulowanych translacyjnie w komórkach macierzystych męskiej linii germinalnej człowieka przez kompleks PUMILIO2-NANOS1 (kontynuacja).

(A. Spik, E. Wilcz, J. Marquay, J. Jaruzelska)

Za pomocą ukierunkowanej mutagenyzy przygotowano trzy mutanty mRNA *TSC22* pod względem motywów 3'UTR A1(GUUGU), B(UUGUA) lub A2(GUUGU). W testach retardacji żelowej wykazano, że usunięcie motywu A1 znacznie osłabiało wiązanie mRNA z białkiem PUMILIO2. Wynik ten stanowi cenną przesłankę za istotną rolę tego motywu w rozpoznawaniu mRNA *TSC22* przez białko PUMILIO2. Skłania on do przeprowadzenia testów w transfekowanych komórkach by przekonać się, czy ten mechanizm działa również w warunkach *in vivo*.

Badania polimorfizmów genetycznych wpływających na wystąpienie nadciśnienia tętniczego lub tętniaków aorty brzusznej z uwzględnieniem ich udziału w przebiegu towarzyszących zmian chorobowych.

(E. Strauss, A. L. Pawlak, J. Głuszek, K. Waliszewski, W. Majewski, W. Supiński, R. Słomski)

W badanych grupach mężczyzn z chorobą wieńcową serca (n=209), tętniakiem aorty brzusznej i zespołem Leriche'a (n=154) oraz w grupie mężczyzn bez objawów chorób naczyń krwionośnych oceniono występowanie czynników ryzyka zachorowania na badane choroby, stwierdzając znaczący udział nadciśnienia tętniczego, palenia tytoniu, niskich wartości cholesterolu HDL (HDLC) i wysokich wartości trójglicerydów i poziomu glukozy na czczo. Niskie wartości HDLC były czynnikiem ryzyka we wszystkich badanych grupach chorych. Najniższe stężenia HDLC stwierdzono u chorych z zespołem Leriche'a (1,18 mmol/l), pośrednie w tętniakach aorty brzusznej (1,27 mmol/l), a najwyższe (1,34 mmol/l) w chorobie wieńcowej serca. Częstość allele *PON155M* nie różniła się pomiędzy grupami chorych i kontrolną. Znaczące obniżenie poziomów HDLC w badanych grupach chorych w porównaniu do osób z grupy kontrolnej obserwowano u nosicieli allele *PON155M*.

Nie stwierdzono wpływu nadciśnienia tętniczego na wzrost ryzyka miażdżycy u chorych z miażdżycą (choroba wieńcowa serca, zespół Leriche'a) u osób, homozygot *PON1 55 LL* i *MM*.

W badaniu 160 mężczyzn po koronarografii stwierdzono, że u chorych palących z miażdżycą tętnic wieńcowych i niewydolnością skurczową lewej komory, zmiany naczyniowe wiążą się z zaburzeniami metabolizmu homocysteiny wyrażającymi się podwyższonymi wartościami indeksu stężeń homocysteiny do kwasu foliowego w surowicy.

Badania polimorfizmów genetycznych związanych z występowaniem retinopatii wcześniaków.

(E. Strauss, A. Gotz-Więckowska, A. L. Pawlak)

Badaniami prowadzonymi prospektywnie objęto grupę 100 dzieci urodzonych ≤ 30 tygodnia ciąży, hospitalizowanych w Klinice Neonatologii AM w Poznaniu. Badania dotyczyły wcześniaków urodzonych ≤ 30 tygodnia ciąży. Wykazano istotną i niezależną rolę genotypów *ACE ID* i *DD* w warunkowaniu postępu retinopatii wcześniaków (ROP) u dzieci pochodzących z ciąży pojedynczych. Potwierdza to i poszerza obserwacje uzyskane przez Heidera i współpracowników, którzy wykazali wyższą częstość genotypu *ACE DD* w grupie dzieci z ROP wymagających leczenia w porównaniu do dzieci, u których wystąpiła samoistna remisja.

Poszukiwanie genów ulegających ekspresji w komórkach tętniaków aorty brzusznej oraz w zespole Leriche'a.

(A. Korcz, J. Mikołajczak-Stecyna, K. Waliszewski, A. Pawlak, R. Słomski)

Kontynuowano badania ekspresji genów metodą makromacierzy Atlas oraz analizę polimorfizmu insercyjno-delecyjnego genu *ACE* (konwertaza angiotensynowa) w tętniaku aorty brzusznej (AAA) i zespole Leriche'a. Do badań metodą makromacierzy wyizolowano RNA od 50 pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej lub zespołem Leriche'a. Wyniki są w trakcie analizy. W badaniach polimorfizmu genu *ACE* zakończono badania prowadzone przez ostatnie 3 lata w wyniku, których zbadano łącznie 829 prób DNA: 133 od chorych z AAA, 152 od chorych z zespołem Leriche'a, 152 od osób z grupy kontrolnej oraz 392

z losowo wybranej grupy populacyjnej. Związek między występowaniem AAA a allelem D genu ACE obserwowano tylko przy jednoczesnym współwystępowaniu nadciśnienia u chorych (chorzy z nadciśnieniem i AAA w stosunku do grupy populacyjnej: $OR=2.56$; $95\% CI 1.27-5.16$, $p=0.0066$). Nie stwierdzono związku między występowaniem allele D a zespołem Leriche'a.

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

(A.Kowalska)

W ciągu ostatniego roku wspólnie z Kliniką Neurologii AM w Poznaniu (prof. M. Wender, prof. W. Kozubski) oraz Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Ciborzu (dr G. Rossa) wyselekcjonowano do badań kolejne rodziny z otępieniemczołowo-skroniowym (FTD). W ramach współpracy z Prince of Wales Medical Research Institute w Sydney (Australia, prof. P.R.Schofield), rozpoczęto badania zmierzające w kierunku wykrycia nowych genów związanych z patogenezą FTD. Trwa skринing mutacji w regionie ramienia krótkiego chromosomu 9, wyłonił wcześniej w analizie sprzężeń przeprowadzonej w kilku dużych rodowodach australijskich. Projekt ma charakter międzynarodowy, obejmuje analizę materiału klinicznego z różnych grup etnicznych i jest realizowany w kilku ośrodkach europejskich.

W celu opracowania strategii identyfikacji osób z podwyższonym prawdopodobieństwem rozwoju sporadycznej postaci choroby Alzheimerera (AD) opartej na wynikach genotypowania znanych czynników ryzyka, podjęto próbę kompleksowej analizy statystycznej uzyskanych w poprzednich latach danych z wykorzystaniem następujących metod matematycznych: regresja logistyczna, analiza dyskryminacji, adaptacja klasycznej analizy regresji do zmiennych porządkowych oraz drzew poszukiwań binarnych (we współpracy z Zakładem Statystyki i Bioinformatyki AM w Poznaniu). Wstępne wyniki sugerują istotne różnice w przydatności w/w metod w ocenie ryzyka AD u osób tym zainteresowanych.

3. MOLEKULARNO-GENETYCZNE ASPEKTY CHOROÓB NOWOTWOROWYCH I AUTOIMMUNIZACYJNYCH

Analiza mutacji i polimorfizmów w genie *NBS1* u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną.

(M. Mosor, D. Januszkiewicz-Lewandowska, I. Ziótkowska, J. Nowak)

W przeprowadzonych badaniach określono częstość występowania mutacji i polimorfizmów w genie *NBS1* u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). W grupie 135 dzieci z ALL przeanalizowano wszystkie 16 eksonów genu *NBS1*. Analiza sekwencyjna na automatycznym sekwenatorze potwierdziła wykryte mutacje i polimorfizmy. W grupie dzieci z ALL stwierdzono 9 germinalnych mutacji w genie *NBS1*, wykryto 3 nowe rzadkie warianty sekwencji genu w intronach 7 i 15, zidentyfikowano nowy polimorfizm w eksonie 14 genu *NBS1*. Wszystkie wykryte mutacje były mutacjami germinalnymi. Ponadto wykazano brak różnic częstości występowania polimorfizmów genu *NBS1* pomiędzy ALL i grupą kontrolną. Uzyskane wyniki wskazują, że germinalna mutacja I171V jest czynnikiem ryzyka w ostrej białaczce limfoblastycznej (5/135 vs 1/195; $p=0,0438$) natomiast mutacja słowiańska

prawdopodobnie nie ma znaczenia w predyspozycji do ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci (1/135 vs 1/195).

Amplifikacja i ekspresja genów *TERT* i *TERC* a długość telomerów w wybranych nowotworach.

(J. Nowak, D. Januszkiewicz-Lewandowska, K. Lewandowski, M. Zawada, K. Nowicka, M. Pernak, J. Rembowska)

We wszystkich przypadkach ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i nielimfoblastycznej (ANLL) stwierdzono ekspresję *hTERT* i *hTERC* oraz wysoką aktywność telomerazy (*hTERT*). Badania z zastosowaniem techniki FISH wykazały amplifikację genów *hTERT* (od 4 do 60 kopii) i *hTERC* (od 4 do 12 kopii) w komórkach białaczkowych. 81% prawidłowych limfocytach krwi obwodowej wykazywało dwie kopie *hTERT*, 18% komórek 4 kopie *hTERT*, a 1% komórek 6 kopii genu *hTERT*. Uzyskane wyniki wskazują, że wysoka aktywność i ekspresja telomerazy w komórkach nowotworowych najprawdopodobniej jest spowodowana amplifikacją genów *hTERT* i *hTERC*. Chemiluminescencyjna detekcja TRF (terminal restriction fragments) z DNA komórek białaczkowych wykazała zróżnicowany wzór długości telomerów. Komórki ALL posiadały zarówno długie jak i krótkie telomery, w przeciwieństwie do prawidłowych limfocytów wykazujących jedynie krótkie telomery. Komórki ANLL posiadały głównie krótkie telomery, pomimo wysokiej aktywności i ekspresji telomerazy. Przeprowadzone badania wykazały, że wysoka aktywność i ekspresja telomerazy w blastach białaczkowych nie koreluje z długością telomerów.

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

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

W grupie 119 pacjentek z cukrzycą ciężarnych u 11 (9%) 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 kobiet (n=210), u których nie obserwowano hiperglikemii nie zidentyfikowano żadnej z opisanych zmian. W genie *GCK* zidentyfikowano również opisane w literaturze polimorfizmy Y215Y i IVS9+C>T. Uzyskane wyniki wskazują, że częstość cukrzycy MODY2 w badanej grupie kobiet z cukrzycą ciężarnych jest niska. Identyfikacja zmian w genie glukokinazy u potomstwa i członków rodzin pacjentek z cukrzycą ciężarnych umożliwia wczesne wykrycie cukrzycy typu MODY2 i objęcie chorych celowaną opieką diabetologiczną.

Badanie amplifikacji *MYCN*, *TERT* oraz ekspresji *MYCN*, *TERT*, *TERC*, *TRK-A*, *TRK-B* i *TRK-C* a stopień złośliwości i zróżnicowania neuroblastoma.

(M. Pernak-Schwarz, D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Zawada, J. Nowak)

Przy użyciu techniki hybrydyzacji in situ (FISH) wykazano w komórkach guza amplifikację powyżej 10 kopii genu *MYCN* w 12/13 przypadkach. W 7/13 dzieci stwierdzono obecność amplifikacji powyżej 10 kopii genu *MYCN* w komórkach szpiku kostnego. W 10 przebadanych przypadkach neuroblastoma z IV stopniem zaawansowania w 9 wykazano

podwyższoną względną ekspresję hydroksylazy tyrozynowej, a w 4 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 w porównaniu z ekspresją dekarboksylazy dopaminy jest bardziej przydatnym markerem wskazującym na zajęcie szpiku kostnego w przebiegu neuroblastoma. Obserwowana zmienność ekspresji badanych genów Trk-A, Trk-B, Trk-C i dekarboksylazy dopaminy wskazuje na heterogenność zwojaka zarodkowego współczulnego.

Poszukiwanie nowych translokacji z udziałem genów *TCR* delta i *MLL* w ostrych białaczkach. (G. Przybylski, R. Polański, E. Pawleta)

Przy wykorzystaniu techniki ligation-mediated PCR (LM-PCR) zidentyfikowano nową rearanżację w T-ALL, pomiędzy segmentem zróżnicowania genu delta receptora limfocytów T (*TRDD3*) i regionem na długim ramieniu chromosomu 5-tego (5q35.1), położonym pomiędzy genami *NKX2-5/CSX* (*NK2 transcription factor related, locus 5*) i *BNIP1* (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein gene*) Metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) wykazano w badanej próbce T-ALL bardzo silną ekspresję genu *NKX2-5*, który w prawidłowych warunkach ulega ekspresji podczas embriogenezy w progenitorowych komórkach myokardiogennych i jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju serca. Nie stwierdzono ekspresji *NKX2-5* w normalnych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej od sześciu zdrowych dawców, ani w sortowanych populacjach ludzkich tymocytów, odpowiadającym różnym stadium dojrzałości: podwójnie negatywne (CD34+CD1A- i CD34+CD1A+), niedojrzałe pojedynczo pozytywne (CD3-CD4+), podwójnie pozytywne (CD3-CD4+CD8+ i CD3+CD4+CD8+) i dojrzałe pojedynczo pozytywne (CD3+CD4+ and CD3+CD8+). Identyfikacja kolejnego genu homotetycznego, aktywowanego w T-ALL, potwierdza hipotezę, że ektopowa ekspresja genów homeotycznych ma udział w leukemioogenezie w pierwotnych T-ALL. Biologiczne konsekwencje ektopowej ekspresji *NKX2-5* w komórkach hematopoetycznych pozostają do wyjaśnienia.

Występowanie sekwencji *pol*, *gag* i *env* retrowirusa związanego ze stwardnieniem rozsianym oraz sekwencji wirusa TT w genomie człowieka i zwierząt.

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

Przeprowadzono analizę sekwencji *pol*, *gag* i *env* wirusa MSR/V u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM). Stwierdzono, że sekwencja *pol* MSR/V u chorych na SM występuje na chromosomach 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 17, i X. Ponadto, u pacjentów z SM zaobserwowano aberracje chromosomowe add(1)(q34), del(1)(q34), add(2)(p25), del(2)(p25), del(2)(q35), del(3)(p26), add(4)(p16), add(5)(p15), add(7)(p22), add(10)(q26), i(17)(q10), add(X)(q28), chromosomy markerowe. Zaobserwowano obecność sekwencji *pol* MSR/V w mikrojądrach u osób ze stwardnieniem rozsianym. Stwierdzono trzykrotnie wyższą liczbę mikrojąder u osób z SM niż u osób zdrowych. U 20 pacjentów z SM i 10 osób zdrowych wykazano obecność sekwencji *gag* MSR/V w ilości 2-4 kopii na jądro interfazowe. Nie wykazano tandemowego charakteru tej sekwencji. Nie zaobserwowano sekwencji *gag* MSR/V w mikrojądrach. Ponadto wykazano na włóknach chromatynowych obecność sekwencji TTV w genomie człowieka. Tandemowo powtórzona sekwencja TTV ORF1 została zlokalizowana na chromosomach człowieka w regionach heterochromatynowych 1q12, 1q31, 1q41, 9q12,

16q11.2 i Yq12. Stwierdzono homologię TTV ORF1 człowieka, myszy i chomika. Nie wykazano homologii TTV ORF1 człowieka i psa.

4. BADANIA GENETYCZNE NIEPŁODNOŚCI ORAZ MECHANIZMY PATOFIZJOLOGII ROZRODU

Badania ekspresji wybranych genów w spermatogenezie człowieka. (D. Fiszer, N. Rozwadowska, M. Bialas, W. Kosicki, P. Jędrzejczak, M. Kurpisz)

Techniką PCR w czasie rzeczywistym badano poziom ekspresji aktywujących izoform genu CREM: CREM θ 1, CREM θ 2 and CREMt2+Ex- γ we frakcjach komórkowych izolowanych ze zdrowej gonady i w homogenatach tkankowych z biopsji jąder z azoospermia i w nowotworach jąder. Spośród trzech badanych izoform najwyższą ekspresję wykazano dla izoformy CREM θ 1 w zdrowej gonadzie, a także w próbkach z azoospermii i nowotworach jąder. W porównaniu z transkryptem CREM θ 2 był to poziom 100 razy wyższy. Udowodniono po raz pierwszy obecność transkryptów genu CREM zawierających równocześnie egzon τ 2 i egzon γ (CREMt2+Ex- γ) w komórkach gametogenicznych prawidłowej spermatogenezy. Dotychczas taki transkrypt został opisany jedynie w azoospermii. Spośród trzech badanych typów transkryptów CREM θ 2 wykazywał najniższy poziom ekspresji. Wyniki te sugerują, że w ludzkiej gonadzie (zdrowej i patologicznej) aktywniejszy jest promotor P3 niż P4. Wykazano minimalną ekspresję aktywatorów CREM w SCOC (brak komórek gametogenicznych), która wzrastała w różnych rodzajach azoospermii w zależności od etapu bloku spermatogenezy (na poziomie spermatocytów, na poziomie spermatyd). W azoospermii obstrukcyjnej (AO – obecne są komórki wszystkich stadiów różnicowania nabłonka plemnikotwórczego) poziom ekspresji był podobny jak we frakcji komórek gametogenicznych prawidłowej spermatogenezy. Różnice w ilościach mRNA pomiędzy frakcją komórek gametogenicznych i blokami spermatogenezy (za wyjątkiem AO) były istotne statystycznie dla wszystkich trzech typów badanych transkryptów. Nie wykryto mRNA dla CREM w limfocytach krwi obwodowej, które stanowiły kontrole negatywną. Powyższe wyniki potwierdzają, że komórki gametogeniczne (przede wszystkim postmeiotyczne) są głównym miejscem transkrypcji aktywatorów CREM. Brak transkryptów lub ich obniżony poziom nie koniecznie musi być interpretowany jako powód bloku spermatogenezy, może być wynikiem braku komórek typowych dla transkrypcji aktywatorów CREM (okrągłe spermatydy).

Konstrukcja fagowej biblioteki fragmentów Fab swoistych dla antygenów plemników ludzkich.

(D. Fiszer, M. Pupecka, K. Schmidt, N. Rozwadowska, M. Kamieniczna, B. Grygielska, E. Wiland, M. Kurpisz)

Uzyskano bibliotekę cDNA o wielkości 6×10^6 cfu. Biblioteką tą transformowano bakterie XL-1Blue w celu uzyskania ekspresji fragmentów Fab na powierzchni faga., a w końcowym etapie wolnych fragmentów Fab. Z tej biblioteki wyselekcjonowano trzy klony, których sekwencja została określona przy pomocy bazy sekwencji zmiennych ludzkich immunoglobulin V-BASE. Dla tych trzech klonów uzyskano wolne fragmenty Fab zgromadzone w przestrzeni periplazmatycznej bakterii XL-1Blue. Potwierdzono obecność tych fragmentów w lizacie bakteryjnym metodą blotowania typu Western. Wykonano również

barwienie immunohistochemiczne na komórkach plemnikowych uzyskując odczyn w regionie akrosomalnym. Istniejąca biblioteka stanowi bazę do selekcjonowania następnych fragmentów Fab i może być źródłem wielu klonów o interesujących swoistościach antygenowych.

Epidemiologiczne badania niepłodności męskiej.

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

Patologia jąder (wnętrostwo, skręt jądra, jądra ruchome) w wieku przedpokwitaniowym doprowadza do zaindukowania przeciwciał przeciwplemnikowych, które mogą utrzymywać się aż do wieku dojrzałego. Udowodnienie i dokładne zbadanie interakcji zachodzących pomiędzy układem immunologicznym a rozrodczym, na wczesnych etapach rozwoju osobniczego, może być kluczowe dla zmniejszenia ryzyka wystąpienia niepłodności męskiej z przyczyn immunologicznych, ponieważ daje możliwość wczesnej terapii. Brak adekwatnych badań epidemiologicznych wynika między innymi z konieczności dokonywania monitorowania pacjentów w kilku- kilkunastoletnim okresie czasu. Pośrednim testem IBT (Indirect Immunobead Binding Test) zbadano 101 surowic od chłopców przed pokwitaniem, głównie z wnętrzem. Badaną populację stanowili w 78% chłopcy będący w I fazie dojrzewania płciowego wg skali Tannera. Przeciwciała przeciwplemnikowe występowały u 5% badanych. W jednym przypadku stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgA, a w pozostałych przeciwciała klasy IgM. Ocena topografii wiązania przeciwciał pokazała, że przeciwciała klasy IgA wiązały się do główki plemnika, natomiast przeciwciała klasy IgG wiązały się do końcowego odcinka wity. 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.

Mechanizm stresu tlenowego jako przyczyna niepłodności męskiej

(M. Frączek, G. Dworacki, M. Kurpisz)

Badano proces apoptozy w plemnikach przy użyciu dwóch różnych zestawów testów firmy R&D Systems: metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem barwienia TUNEL oraz metodą elektroforezy pojedynczych komórek w żelu (*comet assay*). Spośród mediatorów zapalnych, wybrano leukocyty, dwie kombinacje cytokin prozapalnych (IL-6+IL-8 oraz IL-12+IL-18) oraz dwa szczepy bakteryjne (*Escherichia coli* oraz *Bacteroides ureolyticus*).

Przy braku obecności mediatorów stanu zapalnego, plemniki o najlepszej seminologii wykazywały najmniejszy odsetek komórek TUNEL-pozytywnych, a najwyższy procent komórek z pofragmentowanym DNA stwierdzono we frakcji plemników o najniższych parametrach seminologicznych. Inkubacja gamet męskich z leukocytami wiązała się z silnym wzrostem poziomu fluorescencji, zwłaszcza w plemnikach o najlepszej ruchliwości i morfologii, co potwierdzano długością komet. Z przeprowadzonych badań wynika, że w trakcie stresu oksydacyjnego, niektóre cytokiny prozapalne, np. IL-18 (prawdopodobnie wspomagana przez IL-12) mogą być silnym bodźcem kierującym dojrzałe gamety na drogę apoptozy. Wstępne wyniki wskazują również na możliwość indukcji apoptozy w wyniku bezpośredniego kontaktu plemników z bakteriami lub ich toksynami, nawet bez pośrednictwa RFT.

Genetyczne podłoże męskiej niepłodności. *(E. Wiland, M. Żegała, A. Midro, M. Kurpisz)*

Od kilku lat we współpracy z zespołem pod kierunkiem prof. Midro (AM w Białymstoku) prowadzone są badania dotyczące analizy wzorów segregacji mejotycznej u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW). Wyniki tych badań sugerują, że w przypadku braku informacji rodowodowych, co często ma miejsce, dane z kariotypowania plemników nosiciela TCW mogą być bardzo pomocne w przewidywaniu indywidualnego ryzyka niepowodzeń rozrodu. Ustalono wzór segregacji mejotycznej u nosicieli dwóch TCW: $t(1;7)(p34.1;q32)$ oraz $t(9;14)(p13;q13)$. W obydwóch przypadkach brak było wiarygodnych danych rodowodowych, natomiast powodem ustalania kariotypu somatycznego był brak koncepcji (bez poronień). Stwierdzono, że u nosiciela $t(1;7)(p34.1;q32)$ większość (68%) plemników miała prawidłowe lub zrównoważone kariotypy, odsetek plemników po segregacji przyległej I wynosił 9,9%, po przyległej II 5,1 %, po 3:1 13,4%. Niedawno nosiciel ten szczęśliwie został ojcem zdrowej dziewczynki. U nosiciela $t(9;14)(p13;q13)$ większość plemników (62,8%) miała niezrównoważone kariotypy. Jedynie 37.1% plemników wykazywało prawidłowy lub zrównoważony kariotyp. Odsetek plemników po segregacji przyległej I wynosił 20,8%, po przyległej II 23,5 %, po 3:1 14,7%.

Badanie komórek macierzystych człowieka dla celów terapii narządowej. *(M. Seidel, N. Rozwadowska, W. Rucinski, M. Krupka, M. Kurpisz)*

Zawał serca prowadzi do nagłej śmierci kardiomiocytów. Mioblasty, pochodzące z autologicznego mięśnia szkieletowego wskazywane są przez wielu naukowców jako bezpieczne pod względem immunologicznym źródło komórek do przeszczepów. Dla polepszenia współpracy pomiędzy przeszczepionymi komórkami a kardiomiocytami uzyskano metodą transfekcji linią mioblastów wykazującą przejściową ekspresję genu koneksyny 43 (Cx43). W trakcie doświadczeń przygotowano konstrukcję genową zawierającą ORF genu koneksyny 43 wklonowaną do plazmidu umożliwiającego późniejszą transfekcję komórek eukariotycznych (pCiNeo - Promega). Zoptymalizowano również warunki elektroporacji komórek linii C2C12 uzyskując linie transfekowanych plazmidem pIRES-GFP mioblastów mysich. Przygotowano konstrukcje genowe zawierające ORF genu Ec-SOD (zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa) w plazmidzie pCiNeo mające na późniejszym etapie doświadczeń zapewnić efekt cytoprotekcji przeszczepianych komórek ze względu na zdolność tego enzymu do usuwania ROS na wczesnym etapie zawału mięśnia sercowego jak i w późniejszej odpowiedzi organizmu na transplantowane mioblasty. Z kolei konstrukcja genowa zawierająca ORF genu VEGF (czynnik naczyniowy wzrostu śródbłonna) została przygotowana z myślą o promocji procesu angiogenezy zarówno w obszarze blizny pozawałowej jak i w miejscu przeszczepu mioblastów potencjalnie zwiększając ich szansę na zasiedlenie tkanki blizny. Dodatkowo utworzono konstrukcję genową VEGF/FGF4 i stabilnie stransfekowano nią mysia linię mioblastów C2C12.

5. GENETYCZNE ASPEKTY PODATNOŚCI NA NOWOTWORY

Analiza utraty heterozygotyczności u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani. (K. Kiwerska, M. Wierzbicka, K. Szyfter)

Kontynuowano prace nad utratą heterozygotyczności w płaskonabłonkowych rakach krtani w regionach znanych lub domniemanych genów supresorowych. Badania uzupełniono o kolejne polimorficzne markery mikrosatelitarne: d17s520, d17s945 oraz d17s1796 (częsty region utraty 17p13.1, lokalizacja genu *p53*). Analizy prowadzono na DNA od 65 pacjentów wyizolowanym z krwi obwodowej, guza, tkanki marginesu i 1-2 makroskopowo niezmiennych wycinków błony śluzowej pobranych z punktów najbardziej odległych od guza w preparacie operacyjnym (nagłośnia, tchawica). Dla wszystkich trzech markerów przeprowadzono reakcję PCR wszystkich pacjentów. Ponadto przeprowadzono kontrolę follow-up w celu przebadania pod kątem wystąpienia wznowy lokalnej lub innej choroby nowotworowej. Od 12 pacjentów, w zależności od wcześniejszego zabiegu chirurgicznego, pobrano: wymaz z gardła dolnego lub materiał złuszczonej z okolicy tracheostomy. Po elucji DNA przeprowadzono PCR z zastosowaniem primerów do 15 markerów mikrosatelitarnych stosowanych we wcześniejszych badaniach. Uzyskane produkty PCR są aktualnie w trakcie analizy fragmentów z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora typu ALF Express II.

Analiza mutacji genu *p16* w raku krtani.

(K. Kiwerska, M. Rydzanicz, M. Pastok, A. Antkowiak, K. Szyfter, A. Kram, W. Domagała)

p16 jest genem supresorowym, pełniącym istotną funkcję w regulacji cyklu komórkowego. Jego inaktywacja wskutek delekcji, mutacji lub metylacji jest często obserwowana w wielu typach nowotworów, w tym też krtani. Celem projektu jest analiza mutacji tego genu w grupie 500 pacjentów z nowotworem krtani. Do chwili obecnej wyizolowano DNA ze wszystkich uzyskanych skrawków parafinowych. Jako metodę przesiewową wykorzystywano analizę SSCP. Analizowano eksony 1 i 2, każdy w dwóch fragmentach (1a, 1b, 2a i 2b) tak, by wielkości produktów były optymalne do reakcji SSCP. Dla fragmentu 1a przeanalizowano 472 próby (6 zmian w układzie konformerów), dla fragmentu 1b przeanalizowano 475 prób (15 zmian w układzie konformerów), dla fragmentu 2a przeanalizowano 210 prób (2 zmiany w układzie konformerów), natomiast dla fragmentu 2b przeanalizowano 462 próby (61 zmian w układzie konformerów). Próby ze zmienionym wzorem konformerów poddawane były sekwencjonowaniu. Do chwili obecnej wykryto 104 mutacje potwierdzone w reakcji sekwencjonowania.

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, J. Kaczmarek, K. Szyfter)

Zmiany przednowotworowe lub przedrakowe 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 potencjałem do szybkiej przemiany złośliwej w nowotwory inwazyjne tj. próba odpowiedzi na pytanie czy wykrywane zmiany molekularne mogą mieć znaczenie i zastosowanie jako czynnik prognostyczny. Stosowane techniki molekularne: PCR oraz analizę utraty

heterozygotyczności z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w ramionach 3p, 8p, 9p, 13q oraz 17p, w obrębie których utrata materiału genetycznego występuje we wczesnych i pośrednich etapach onkogenezy krtani. Do chwili obecnej zgromadzono materiał kliniczny pochodzący od 25 osób zdiagnozowanych pod kątem wystąpienia zmian od hiperplazji do carcinoma *in situ* (w sumie 70 skrawków parafinowych). Ze względu na małe ilości materiały przedrakowego w pierwszym etapie opracowano optymalizację izolacji DNA. Przetestowano trzy zestawy do izolacji DNA, jako optymalny wybrano zestaw QiaAmp DNA Mini Kit firmy Qiagen. Obecnie prowadzona jest optymalizacja reakcji DOP-PCR w celu namnożenia uzyskanej puli DNA.

Wpływ ligandów receptora Ah na ekspresję genów związanych z tym receptorem. (D. Brauze, T. Karpiński, K. Szyfter)

Z uwagi na znaczenie AhR w kancerogenezie wywoływanej niektórymi węglowodorami aromatycznymi oraz dioksynami kontynuowaliśmy badania wpływu ligandów AhR na ekspresję związanych z tym receptorem genów. Jednym z takich genów bezpośrednio regulowanych przez receptor Ah może być polimeraza DNA kappa, która przeprowadza replikację mimo obecności adduktów benzo(a)piren:DNA. Mimo wcześniejszych doniesień, nie stwierdziliśmy indukcji mRNA polimerazy kappa w wątrobie szczurów Sprague-Dawley traktowanych ligandami receptora Ah (metylocholanren, β -naftoflawon, α -naftoflawon, TCDD). Równocześnie obserwowaliśmy znaczną indukcję mRNA cytochromu P450 1B1, genu, o którym wiadomo, że jest bezpośrednio regulowany przez AhR i który w naszym badaniu służył jako pozytywna kontrola. Na obecnym etapie badań trudno stwierdzić, czy brak indukcji polimerazy kappa przez ligandy AhR związany jest z różnicami międzygatunkowymi (poprzednią pracę wykonano na myszach) czy innymi czynnikami.

Kontynuowaliśmy również badania zmierzające do korelacji występujących w populacji polskiej polimorficznych wariantów AhR z inicjacją procesu nowotworowego oraz długością przeżycia pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani.

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

(M. Rydzanicz, M. Wróbel, M. Kostrzevska-Poczekaj, D. Brauze, K. Szyfter)

Osoby z mutacją w mitochondrialnym genie *12S rRNA* już przy dawkach terapeutycznych antybiotyku aminoglikozydowego stają się bardziej narażone na utratę słuchu. Celem prowadzonych badań jest identyfikacja zmian w obrębie genu *12S rRNA* oraz próba wskazania mutacji potencjalnie związanych z hiperwrażliwością na ototoksyczne działanie aminoglikozydów.

W ramach kontynuacji badań rozszerzono grupę badaną (osoby z upośledzeniem słuchu po leczeniu AG) i kontrolną (osoby leczone AG z prawidłowym słuchem) odpowiednio do 60 i 50 osób, zebrano również pełną grupę populacyjną (100 osób).

W celu identyfikacji zmian na niskim poziomie heteroplazmii (poniżej 30% zmienionego mtDNA) oraz wstępnej selekcji prób do późniejszej analizy sekwencyjnej, zaprojektowano 4 amplikony do analizy dHPLC (współpraca: Katedra i Zakład Biologii i Genetyki AM, Gdańsk). Po optymalizacji warunków reakcji PCR i rozdziału dHPLC dla każdego z 4 amplikonów wysłano próby do analizy. W grupie kontrolnej zidentyfikowano jedną zmianę C722T w układzie homoplazmicznym, która zgodnie z naszą wiedzą nie była jak dotąd opisywana. Analiza dHPLC nie została jeszcze zakończona.

Identyfikacja i analiza sekwencji genu/ 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 pozostaje nieokreślona a rozważa się udział czynników genetycznych i środowiskowych. W wysokiej rodzinnej krótkowzroczności (poniżej -6,0 dioptrii) czynnik genetyczny wydaje się dominować. Wskazano kilka *loci* sprzężonych z występowaniem wysokiej krótkowzroczności, jednakże genu wysokiej rodzinnej krótkowzroczności dotąd nie zidentyfikowano.

Ustalono 50 rodowodów od rodzin polskich z wysoką rodzinną krótkowzrocznością i przeprowadzono na ich podstawie analizy symulacyjne. Analiza rodowodów wskazuje na typ dziedziczenia autosomalny dominujący. Zebrane rodowody posiadają wystarczającą moc statystyczną dla przeprowadzenia analizy genomu i analizy sprzężeń.

Wyizolowano genomowy DNA od 341 osób, w tym od 115 z wysoką krótkowzrocznością. Dla 23 rodzin (136 osób) przeprowadzono badania wstępne, poprzedzające analizę całego genomu, których celem było wykluczenie w analizowanych rodzinach zespołów Sticklera, Marfana i Knoblocha oraz analiza sprzężeń z uprzednio proponowanymi *loci* w następujących regionach chromosomowych: 7q36 (*MYP4*), 12q21-23 (*MYP3*), 18p11.31 (*MYP2*), 17q21-23 (*MYP5*), 2q37, 4q22-4q27, 10q i 22q12 (*MYP6* locus, szkolna krótkowzroczność).

Wykluczono występowanie zespołów Sticklera, Marfana i Knoblocha w badanych rodzinach oraz nie wykazano sprzężenia wysokiej krótkowzroczności w rodzinach polskich z żadnym z proponowanych wcześniej *loci*. Rozpoczęto analizę genomu z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych umiejscowionych przeciętnie co 8cM w genomie.

Identyfikacja i charakterystyka uszkodzeń chromosomów w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina i płaskonabłonkowym raku krtani.

(*M. Giefing, K. Szyfter, R. Siebert*)

Kontynuowano badania nad delecjami homozygotycznymi zidentyfikowanymi w liniach komórkowych chłoniaka Hodgkina. Precyzyjnie określono wielkość wszystkich 39 znalezionych delecji, sprawdzono jakie geny leżą w owych regionach i oszacowano ich ewentualne znaczenie dla patogenezy chłoniaka Hodgkina. Na podstawie otrzymanych wyników oraz dostępnej analizy ekspresji genów, wybrano dwa: *GADD45B* oraz *CHD2* do dalszych badań. Rozpoczęto sekwencjonowanie owych genów w materiale pochodzącym z linii komórkowych chłoniaka Hodgkina, w których nie znaleziono delecji homozygotycznych owych genów. Tym samym sprawdzano, czy inne mechanizmy, np. mutacje, nie prowadzą do deaktywacji wybranych genów. Ponadto, wykonano analizę array-CGH (Agilent - Human Genome CGH 44k) trzech linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani. Po przeanalizowaniu wyników zidentyfikowano szereg regionów z potencjalnymi delecjami homozygotycznymi. Zaprojektowano i zamówiono primery specyficznym amplifikujące te regiony w celu weryfikacji delecji homozygotycznych.

Ocena przydatności komórek macierzystych w leczeniu upośledzenia słuchu.

(*M. Wróbel, M. Rydzanicz, M. Kurpisz, W. Szyfter*)

Badania prowadzono na modelu mysim. Prowadzono dalszą analizę audiometryczną myszy, którym podawano antybiotyki aminoglikozydowe w celu uzyskania populacji myszy niesłyszących. Do tego celu wykorzystano kanamycynę - podawaną podskórnie, gentamycynę – podawaną na obwód i miejscowo (ucho środkowe) oraz neomycynę podawaną miejscowo. Po uśpieniu myszy i dekapitacji pobierano w całości kości skroniowe, utrwalano preparat w 4% formaldehydzie, dekaptyfikowano i wykonywana skrawki do dalszych badań – głównie oceny histologicznej.

Na tym etapie optymalizowano metody pobierania tkanek ucha wewnętrznego – głównie ze ślimaka w celu prowadzenia dalszych analiz w kierunku ekspresji genów związanych z programowaną śmiercią komórek. Ze względu na lokalizacją ślimaka oraz minimalne ilości materiału wymagają dalszych prób.

Do dalszych analiz funkcjonalnych wytypowano geny: Bax, Bac, Caspaza 3 i 9 bezpośrednio związane z apoptozą, zaprojektowano startery i podjęto próby ustawienia reakcji polimerazy łańcuchowej.

Ocena właściwości genotoksycznych substancji stosowanych w terapii.

(*M. Arndt, M. Kostrzewska-Poczekaj, T. Karpiński, K. Cywińska*)

Kontynuowano badania nad genotoksycznością anestetyków przenosząc ciężar badań z anestetyków wziewnych na anestetyki lokalne stosowane w zabiegach stomatologicznych (mepiwakaina, bupiwakaina, lidokaina, artekaina). Korzystając z dotychczasowego doświadczenia określono warunki doświadczalnego testowania genotoksyczności *in vitro* (stężenia, czas działania, usuwanie uszkodzeń). Za pomocą testu elektroforezy żelowej pojedynczych komórek (comet assay) wykazano potencjał genotoksyczny bupiwakainy i lidokainy w granicach stężeń terapeutycznych.

We współpracy z IChBiorg PAN przeprowadzono ocenę genotoksyczności produktów naturalnych izolowanych z firmowego preparatu Vilca cora. Równolegle oceniano potencjał genotoksyczny preparatów uzyskiwanych przy pomocy frakcyjnej izolacji wodnej i alkoholowej. Poza identyfikacją jednoniciowych przerw w strukturze DNA leukocytów krwi obwodowej oceniono także poziom przeżywalności (barwienie trypan blue) komórek nowotworowych (linia komórek białaczkowych HL60) eksponowanych na działanie preparatu Vilca cory.