

Autoreferat

Opis osiągnięć naukowych

Dr n med. Agnieszka Paradowska-Gorycka

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej

Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji

Warszawa 2016

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Paradowska-Gorycka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2010 doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Centrum Biostruktury Warszawski Uniwersytet Medyczny. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Występowanie polimorfizmów genu IL-1 β , TNF- α oraz IL-10 u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS)”. Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jan Krzysztof Łącki

2005 magister inżynier, specjalność: biotechnologia, Uniwersytet Przyrodniczy (dawna Akademia Rolnicza) w Poznaniu, Wydział Rolniczy

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

od 04.2016 Narodowy Instytut Geriatrii w Warszawie, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, p.o. Kierownika

2015 –2016 Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, adiunkt

2011 - 2015 Instytut Reumatologii w Warszawie, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, adiunkt

2006 – 2011 Instytut Reumatologii w Warszawie, Zakład Biochemii, mgr. biotechnologii

2005 –2006 Instytut Genetyki Człowieka w Lipsku, Niemcy, stażystka

2004 – 2005 Klinika Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, wolontariusz

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r.o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.nr 65, poz. 595 ze zm.)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wpływ czynników transkrypcyjnych i polimorfizmów genów je kodujących na rozwój oraz przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS).

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- 1) **Paradowska-Gorycka A**, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Próchnicka K, Manczak M, Maslinski S, Olesinska M. Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol 2015 Feb;42(2):170-80. 131381. **IF-3.187, KBN = 30**

Udział w pracy: kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (SONATA- NCN), stworzenie koncepcji pracy, organizacja i realizacja części etapów laboratoryjnych pracy, analiza i interpretacja wyników badań, zebranie i przegląd piśmiennictwa, a także przygotowanie manuskryptu. Udział procentowy:80%.

- 2) **Paradowska-Gorycka A**, Romanowska-Próchnicka K, Haladyj E, Manczak M, Maslinski S, Olesinska M. Association of the Smad3 and NFATc2 gene polymorphisms and their serum levels with susceptibility to rheumatoid arthritis in Polish cohorts. Clin Exp Immunol. 2015 Mar;179(3):444-53. IF- **3,04, KBN = 30**

Udział w pracy: kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (SONATA- NCN), stworzenie koncepcji pracy, organizacja i realizacja części etapów laboratoryjnych pracy, analiza i interpretacja wyników badań, zebranie i przegląd piśmiennictwa, a także przygotowanie manuskryptu. Udział procentowy: 80%.

- 3) **Paradowska-Gorycka A**, Stypinska B, Pawlik A, Romanowska-Prochnicka K, Haladyj E, Manczak M, Olesinska M. RORC2 Genetic Variants and Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17(4):488. **IF-2.862, KBN = 30**

Udział w pracy: kierowanie projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (SONATA- NCN), stworzenie koncepcji pracy, organizacja i realizacja części etapów laboratoryjnych pracy, analiza i interpretacja wyników badań, zebranie i przegląd piśmiennictwa, a także przygotowanie manuskryptu. Udział procentowy: 65%.

Całkowity Impact Factor (IF) prac wchodzących w osiągnięcie naukowe wynosi 9,641; suma punktów MNiSW wynosi 90

Badania zawarte w wyżej wymienionych pracach finansowane były z projektu badawczego nr 2011/01/D/NZ5/01396 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA pt. Analiza mutacji i polimorfizmów wybranych genów związanych z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg u chorych na reumatoidalne zapalenie” – **kierownik projektu dr n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka**

C. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl trzech prac oryginalnych poświęconych roli różnych wariantów genetycznych w genach kodujących czynniki transkrypcyjne, związane z funkcjonowaniem komórek Th17/Treg, w predyspozycji genetycznej do reumatoidalnego zapalenia stawów oraz w jego przebiegu klinicznym.

Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów, jako przewlekła choroba cywilizacyjna

Reumatoidalne zapalenie stawów - RZS (łac. polyarthritis reumatoidea, ang. rheumatoid arthritis) jest autoimmunizacyjną, wysoce heterogenną chorobą, której efekty są trudne do przewidzenia. Charakteryzującą się symetrycznym zapaleniem stawów, niszczeniem chrząstki stawowej i nasad kostnych oraz licznymi powikłaniami narządowymi. Przebieg choroby jest bardzo zmienny, z okresami zaostrzeń i remisji, i w swym naturalnym przebiegu prowadzi do stałego, postępującego uszkodzenia stawów, niepełnosprawności, kalectwa, pogorszenia jakości życia a także przedwczesnej śmierci. Wczesna faza choroby charakteryzuje się bólem oraz obrzękiem, natomiast niekontrolowany proces zapalny może doprowadzić do zniekształceń i niestabilności stawów. Przewlekły proces zapalny przyczynia się do rozrostu synowialnych linii komórkowych oraz jest odpowiedzialny za stymulację procesów chorobowych w stawach. Procesy powodujące uszkodzenie tkanek, chrząstki i kości w przebiegu RZS powstają na drodze interakcji pomiędzy autoreaktywnymi komórkami T oraz cytokinami prozapalnymi (TNF- α czy IL-6) doprowadzając do gromadzenia się komórek zapalnych, samo-utrwalenia zapalenie czy aktywacji osteoklastów [1- 3].

RZS klasyfikowane jest wśród chorób o podłożu autoimmunologicznym ze względu na obecność czynnika reumatoidalnego (rheumatoid factor; RF) i innych przeciwciał, takich jak przeciwciała przeciwko cytrulinowanemu peptydowi (anti-citrulined peptide; anti-CCP), które obecne są w surowicy i stawach chorych [4-6]. Klasyczny RF stwierdza się u ok. 60-85% chorych na RZS, jednakże podczas trzech pierwszych miesięcy choroby wykrywa się go tylko u ok. 30% pacjentów. Natomiast przeciwciała anti-CCP wykazują wyższą czułość (68%) i specyficzność (98%) dla RZS, dlatego też wydają się być użyteczne, jako idealny marker reumatoidalnego zapalenia stawów [5, 7].

Pomimo iż choroba atakuje wszystkie grupy etniczne, w każdym wieku, także dzieci (młodzieńcze przewlekłe zapalenie stawów – Juvenile inflammatory arthritis, JIA), to niektóre populacje wykazują niższą, a inne wyższą zachorowalność. Jednakże nie zależnie od rasy, kobiety chorują cztery razy częściej niż mężczyźni, a największa zachorowalność przypada między 35 a 55 rokiem życia [1, 8-10].

Występowanie reumatoidalnego zapalenia stawów jest względnie stałe w większości europejskich i północnoamerykańskich populacjach, i szacowane na poziomie 0,5-1%. Najwyższą zachorowalność na poziomie 5,3-6,8% odnotowano wśród kilku populacji rodowitych Indian Amerykańskich (Naive American-Indian), natomiast najniższą zachorowalność pomiędzy 0,2 a 0,3% wykazują populacje wiejskich Afrykanów z Południowej Afryki i Nigerii oraz populacje z regionów Południowej Azji [11]. W Polsce szacuje się zachorowalność na RZS na ok. 1% populacji dorosłych. Natomiast rodzinna postać RZS obserwowana jest u 10-30% chorych, 12-15% bliźniąt jednojajowych oraz 3-4% bliźniąt dwujajowych [12].

Stojąc na progu XXI wieku reumatoidalne zapalenie stawów nadal jest słabo scharakteryzowane oraz określane mianem zapaleń nieswoistych, ze względu na brak konkretnego czynnika przyczynowego, odpowiadającego za rozwój i rozprzestrzenianie się zmian zapalnych. Chociaż poznanie dokładnej etiologii RZS pozostaje w sferze bardzo intensywnych badań, to jednak ogólnie zostało przyjęte, że jest chorobą wieloczynnikową, której patogenезa uwarunkowana jest zarówno przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe [1]. Aktualny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że w rozwoju choroby dużą rolę odgrywa predyspozycja genetyczna (40-60%) [13, 14], za której udziałem przemawiają różnice rasowo – etniczne, rodzinne występowanie choroby oraz prowadzone na szeroką skalę badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) [15]. Ponadto, sugeruje się, iż wyłącznie specyficzne kombinacje odpowiednich czynników genetycznych u poszczególnych osób mogą określić przebieg choroby [13, 16]. Pierwszym locus podatności genowej dla reumatoidalnego zapalenia stawów jest region genów głównego układu zgodności tkankowej - MHC (Major Histocompatibility Complex). Obecnie

wiadomo, że o wrażliwości na chorobę decyduje krótka sekwencja aminokwasowa zlokalizowana w III nadzmiennym regionie łańcucha B antygenów HLA-DR, zwana wspólnym epitopem (shared epitope – SE). Niestety, podobnie jak w przypadku innych chorób wielogenowych, nie jest to jedyny fragment decydujący o wrażliwości i przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Badania GWAS doprowadziły do zidentyfikowania ponad 30 alleli podatności genetycznej u chorych na RZS, jednakże identyfikacja genów „promujących” chorobę oraz ich charakterystyka funkcjonalna nadal pozostają do zrealizowania [17]. Spowolniony postęp w badaniach genetycznych RZS wynika z wielogenowej/ wieloczynnikowej natury reumatoidalnego zapalenia stawów, heterogenności badanych populacji oraz z trudności związanych z interpretacją wyników GWAS, ponieważ większość wariantów genetycznych zlokalizowanych jest w regionach niekodujących [17].

Nierównowaga Th17/Treg w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów.

Związek czynników genetycznych, takich jak geny głównego układu zgodności tkankowej, z patogenezą RZS sugeruje, że choroba ta przynajmniej częściowo indukowana jest przez komórki T [18], a szczególnie T CD4+ stanowiące 30-40% wszystkich limfocytów T [19, 20]. Odkrycie, prawie cztery dekady temu, subpopulacji komórek T zdolnych do tłumienia odpowiedzi immunologicznej było przełomem w badaniach nad układem immunologicznym [21]. W przeciwieństwie do dokładnie określonego znaczenia mediatorów zapalenia, takich jak np. TNF- α czy IL-6 w patogenezie RZS, współdziałanie komórek T nie jest zbyt oczywiste i wymaga dokładniejszego poznania [18]. Nieprawidłowości o podłożu immunologicznym obserwowane u chorych na RZS dotyczą nadmiernie rozwiniętej odpowiedzi zapalnej, której towarzyszą zaburzenia mechanizmów kontroli zapalenia. Pomimo że, RZS dotyczy głównie stawów obwodowych, to jednak zaburzenia immunologiczne nie ograniczają się jedynie do miejsc indukujących proces zapalny, ale mają również charakter systemowy i obejmują komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC), wydzielające w nieprawidłowych ilościach cytokiny pro- i przeciw-zapalne. Dziewicze komórki T CD4+, w zależności od środowiska cytokinowego, w którym się aktualnie znajdują, różnicują się na typowe limfocyty pomocnicze (T helper; Th) Th1, Th2 i Th17 oraz limfocyty T regulatorowe (regulatory T cell; Treg) [22, 23] charakteryzujące się nie tylko przeciwstawnym profilem wydzielanych cytokin, ale również koordynowaniu różnych typów odpowiedzi immunologicznej [24]. Obecnie, komórki Th17 i Treg stanowią intrygującą kwestię poruszaną w patogenezie RZS. Ponieważ drogi różnicowania komórek Th17 oraz Treg są wzajemnie ze sobą powiązane, wpływa to na równowagę pomiędzy

nimi, która jest szczególnie istotna dla utrzymania homeostazy immunologicznej [22, 25]. W przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (zarówno w fazie indukcji, jak i progresji) można zaobserwować przesunięcie równowagi układu odpornościowego w kierunku subpopulacji limfocytów T prozapalnych (głównie Th17) na niekorzyść regulatorowych komórek działających przeciwzapalnie (Treg). Komórki Th17 stanowiące odrębną populację efektorowych limfocytów T pomocniczych o silnych właściwościach prozapalnych, promują reakcje zapalne w tkankach oraz rozwój chorób autoimmunizacyjnych, podczas gdy, komórki Treg są odpowiedzialne za hamowanie nadmiernej zdolności wielu typów komórek do proliferacji i/lub produkcji cytokin prozapalnych. Przywrócenie odpowiedniego balansu między komórkami Th17 a Treg u pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów mogłoby spowodować regresję choroby i poprawę jakości życia pacjentów.

Funkcjonalnie komórki Th17 (CD4+ T helper 17 cells) współuczestniczą w zorganizowaniu odpowiedzi skierowanej przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym, które nie zostały skutecznie usunięte poprzez wcześniejszą odpowiedź zależną od Th1 i/lub Th2 [26, 27]. Z drugiej jednak strony, są typowymi komórkami prozapalnymi promującymi reakcje zapalne w tkankach oraz rozwój chorób autoimmunologicznych [23]. Co więcej, są o wiele bardziej skuteczne w indukowaniu zapalenia niż komórki Th1 uznawane do tej pory za „głównego sprawcę” chorób autoimmunizacyjnych [28]. Komórki Th17 poprzez wydzielane cytokiny, IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF- α i GM-CSF, prowadzą nie tylko do zapoczątkowania i utrwalenia przewlekłego procesu zapalnego, ale także do uszkodzenia chrząstki, resorpcji kości oraz promowania osteoklastogenezy, co w konsekwencji przyczynia się do destrukcji stawów [24, 29-31]. Receptor dla IL-17 ulega ekspresji oraz inicjuje odpowiedź zapalną w wielu różnych typach komórek odgrywających ważną rolę w patogenezie RZS, włączając monocyty, makrofagi, fibroblasty, chondrocyty i osteoblasty [25]. IL-17 poprzez oddziaływanie ze swoim receptorem pobudza powyższe komórki do produkcji innych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α , promujących proces zapalny oraz rozwój komórek Th17. W ten sposób komórki Th17 obecne w stawie mogą zainicjować pozytywne sprzężenie zwrotne prowadzące do nieustannej aktywacji komórek T, co jest zdarzeniem krytycznym w generowaniu zjawisk autoimmunizacyjnych [32]. Komórki Th17 poprzez wydzielanie IL-21, odgrywają istotną rolę w patogenezie RZS, jako, że IL-21 jest jednym z podstawowych regulatorów produkcji IgG i odpowiedzi humoralnej zależnej od komórek T [33]. Ostatnie badania pokazują, iż komórki Th17 poprzez promowanie produkcji immunoglobulin klasy M i A, ale nie E, wpływają na modulowanie aktywności komórek B i ich napływ do miejsca toczącego się procesu zapalnego [34, 35].

W ostatnich latach zaczęto coraz więcej uwagi poświęcać roli regulatorowych limfocytów T (CD4+CD25+ Foxp3+T cells; Treg) w reumatoidalnym zapaleniu stawów i uważa się, że komórki te mogą pełnić funkcję potencjalnego regulatora odpowiedzi immunologicznej. Komórki Treg, stanowiące bardziej heterogenną subpopulację niż się początkowo wydawało [36], zaangażowane są w hamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, utrzymanie immunologicznej homeostazy i tolerancji na autoantygeny [22]. Jednakże precyzyjne mechanizmy związane z właściwościami supresorowymi komórek Treg nadal pozostają kwestią sporną [37]. W fazie kontrolowanej homeostazy komórki Treg poprzez swoje funkcjonowanie mogą określać czy choroba autoimmunizacyjna rozwinię się czy też nie. Natomiast w fazie chronicznego, przewlekłego zapalenia wzrost liczby tych komórek może być nawet szkodliwy, gdyż mogą doprowadzić do zahamowania naturalnego przebiegu efektywnej odpowiedzi immunologicznej, prowadząc w ten sposób do zmiany procesu zapalnego w chroniczne zapalenie autoimmunologiczne. Komórki Treg, w celu wyeliminowania autoreaktywnych klonów limfocytów efektorowych wykorzystują szereg różnych mechanizmów [36] włączając produkcję cytokin przeciwzapalnych (np. IL-10, TGF- β , IL-35) i czynników cytotoxicywnych, zaburzenia metaboliczne czy modulowanie dojrzewania i funkcji komórek prezentujących antygen (antygen presenting cell; APC) [38]. Pomimo iż frekwencja komórek Treg, u chorych na RZS, jest wyższa w płynie maziowym niż we krwi obwodowej, czyli w miejscu toczącego się procesu zapalnego w zajętej stawie, to jednak komórki te nie są zbyt efektywne w kontrolowaniu nieodpowiedniej aktywacji układu immunologicznego [18, 39-41]. Komórki Treg obecne w płynie stawowym chorych na RZS mają zwiększoną zdolność do tłumienia zarówno proliferacji komórek T, jak i produkcji cytokin prozapalnych (np. TNF- α , INF- γ), ale mimo to proces chorobowy nadal się toczy [38]. Może to wynikać z interakcji, do jakiej dochodzi pomiędzy komórkami Treg a cytokinami obecnymi w miejscu toczącego się procesu zapalnego. TNF- α , IL-6, IL-15 oraz IL-1 obecne w płynie stawowym z jednej strony zwiększają liczbę naciekających komórek Treg do zajętego stawu jednocześnie osłabiając ich właściwości supresorowe [36, 38]. Natomiast krążące komórki Treg posiadają zdolność hamowania proliferacji efektorowych komórek T, ale nie są zdolne do hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez aktywowane komórki T czy monocyty [38]. Możliwe jest również, że w warunkach utrzymującego się procesu zapalnego, komórki Treg pod wpływem bogatego w cytokiny prozapalne środowiska płynu stawowego stają się niestabilne i przekształcają się w komórki T o charakterze patogenicznym [38].

Komórki Th17 i Treg nie tylko wykazują przeciwstawne właściwości funkcjonalne, ale także charakteryzują się uprzywilejowaną ekspresją odmiennych czynników transkrypcyjnych: RORc2 dla Th17 i Foxp3 dla Treg. RORc2 ulega ekspresji zarówno na komórkach Th17, jak

i Treg, podczas, gdy ekspresję Foxp3 wykazują tylko komórki Treg. W limfocytach Treg, Foxp3 hamuje aktywność transkrypcyjną RORc2 poprzez bezpośrednią interakcję, tym samym doprowadzając do zahamowania różnicowania limfocytów Th17 [24, 42, 43].

Foxp3 (forkhead transcription factor), specyficzny marker molekularny komórek Treg, odgrywa istotną rolę w rozwoju komórek Treg w grasicy (nTreg), ale także wymagany jest do utrzymania właściwości supresorowych dojrzałych komórek Treg na obwodzie (iTreg) [44, 45]. Co więcej, ekspresja czynnika Foxp3 ważna jest także dla podtrzymania i regulacji prawidłowego funkcjonowania powyższych komórek [38]. Pomimo iż Foxp3 jest czynnikiem transkrypcyjnym jego dokładna funkcja oraz mechanizmy molekularne regulujące aktywność genów nie są do końca poznane [19, 46]. Przeprowadzone badania GWAS wykazały, że Foxp3 wiąże się do regionów promotorowych ok. 700 - 1100 różnych genów, z czego większość związana jest z drogą sygnałową receptora TCR [46]. Duża liczba genów związanych z Foxp3 podlega aktywowaniu bądź hamowaniu w komórkach Treg, co sugeruje, iż czynnik ten może odgrywać zarówno rolę wzmacniacza, jak i wyciszacza aktywności transkrypcyjnej genów docelowych [46]. Aktywność i stabilna ekspresja Foxp3 w komórkach Treg prowadzi, z jednej strony do aktywacji całego szeregu genów zaangażowanych w utrzymanie właściwości supresorowych Treg, ale z drugiej wycisza geny związane z komórkami efektorowymi. Natomiast zmniejszony poziom ekspresji Foxp3 wzmacnia odpowiedź autoimmunizacyjną poprzez zniesienie właściwości supresorowych komórek Treg i przekształcenie ich w komórki efektorowe [47, 48]. Aktywność transkrypcyjna genu Foxp3 kontrolowana jest przez elementy w obrębie promotora i trzech dystalnych enhancerów (wzmacniacz) tego genu [49]. Ostatnie badania pokazują, że czynniki transkrypcyjne NFATc2 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2) i Smad3 (SMAD family member 3) wymagane są do odpowiedniej aktywności enhancera genu Foxp3, acetylacji histonów oraz indukcji Foxp3, oraz wspólnie regulują rozwój komórek regulatorowych i produkcję określonych cytokin: IL-2, IL-9, IL-10, IL-35 oraz TGF- β , co w efekcie prowadzi do supresji immunologicznej efektorowych komórek T [49-51].

Smad3 i NFATc2 (NFAT1) przyłączają się do genu Foxp3 w tak zwanych miejscach wrażliwych na TGF- β i razem z Foxp3 regulują ekspresję innych genów w regulatorowych komórkach T [50]. NFATc2 przyłącza się do genu Foxp3 w odpowiedzi na aktywację receptora TCR, a Smad3 w wyniku aktywacji receptora TGF- β przez jego ligand. Czynniki transkrypcyjne NFAT oryginalnie zostały opisane, jako białka jądrowe przyłączające się i kontrolujące aktywność promotora IL-2 oraz promotora i sekwencji wzmacniających limfokin w limfocytach T. Jednakże białka NFAT ulegają ekspresji także na innych typach komórek, gdzie regulują aktywność transkrypcyjną wielu genów kontrolując prawidłowy rozwój poszczególnych

elementów serca, formowanie naczyń krwionośnych i zakończeń nerwowych, a także różnicowanie osteoklastów w trakcie formowania się kości. Spośród wszystkich pięciu czynników należących do rodziny NFAT aktywność czterech z nich (NFATc1, c2, c3 i c4) kontrolowana jest na drodze zależnej od kalcyneuryny, która poprzez fosforylację określonych miejsc w domenach białek NFAT doprowadza do ich przemieszczenia się do jądra komórkowego i przyłączenia do DNA określonych genów [52]. NFATc2, stanowiący 80-90% wszystkich białek rodziny NFAT, jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów proteinaz, cyklooksygenazy typu 2 (COX-2) oraz cytokin prozapalnych (np. IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α), który może prowadzić do dysfunkcji chondrocytów w stawie, różnicowania osteoklastów i uszkodzenia chrząstki [53]. NFATc2 indukuje ekspresję Foxp3 de novo w komórkach CD4⁺CD25⁻, a hamuje *in vitro*, co może świadczyć o tym, iż oba te czynniki transkrypcyjne działają w negatywnym sprzężeniu zwrotnym (negative-feedback loop) w komórkach nTreg. Niski poziom NFATc2 może być zaangażowany w utrzymanie powierzchniowej ekspresji TGF- β , jednakże niski poziom jądrowego NFATc2 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu odpowiedniej ekspresji Foxp3 w komórkach Treg. Równowaga w aktywności NFATc2 jest bardzo istotna dla prawidłowego przebiegu procesów transkrypcyjnych w regulatorowych komórkach T.

Białko Smad3 na skutek aktywacji receptora TGF- β i po utworzeniu kompleksu z Smad2 i Smad4 przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do DNA oraz innych czynników transkrypcyjnych (NFATc2, Foxp3), co w konsekwencji przyczynia się do zmiany aktywności transkrypcyjnej genów docelowych. Droga sygnałowa TGF- β /Smad3 wymagana jest do utrzymania chrząstki stawowej w cichej/biernej fazie poprzez tłumienie hipertroficznego różnicowania chondrocytów i regulację syntezy składników matrix. Defekty tego białka mogą prowadzić do osłabienia odpowiedzi immunologicznej, zmniejszenia gęstości mineralnej kości, zwiększenia ekspresji metaloproteinaz oraz wzrostu ekspresji cytokin prozapalnych i chemokin przez komórki Th1 i Th17 [54, 55]. Jak pokazują ostatnie badania białko Smad3 nie jest wymagane do funkcjonowania komórek Treg, jednakże w warunkach jego braku indukcja ekspresji Foxp3 przez TGF- β w naiwnych komórkach T jest dość znacznie zredukowana. Z drugiej jednak strony, niedobory Smad3 przyczyniają się do wzmocnienia różnicowania Th17 w warunkach *in vivo* i *in vitro* [56].

Ludzki czynnika transkrypcyjny RORc2 (retinoic acid receptor-related orphan receptor C; krótsza izoforma genu RORc), ortolog mysiego ROR γ t, wymagany jest do rozwoju i prawidłowego funkcjonowania komórek Th17. RORc2 kontroluje ekspresję genów docelowych poprzez wiązanie się z ich promotorami w miejscach określanych, jako ROREs (ROR-responsive elements). Nadmierna ekspresja RORc2 wyzwała wiele aspektów prozapalnych komórek Th17,

indukuje ekspresję cytokin prozapalnych, oraz prowadzi do zmniejszenia ekspresji mRNA i białka Foxp3 [49, 57]. RORc2 posiada możliwość zahamowania ekspresji Foxp3 poprzez wiązanie się do dwóch z czterech miejsc ROREs w promotorze genu Foxp3, jak również poprzez rywalizację z NFATc2 o miejsce wiązania, jako, że RORc2 wykazuje zdolność przyłączania się do miejsc wiążących NFAT hamując w ten sposób aktywność transkrypcyjną genu Foxp3 [58]. Wyeliminowanie czynnika transkrypcyjnego RORc przyczynia się do wzrostu poziomu Foxp3 i obniżenia ekspresji cytokin prozapalnych, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IFN- γ i TNF- α , co sugeruje, że rola RORc2 w rozwoju komórek Th17 związana jest nie tylko z indukcją genów charakterystycznych dla Th17, ale także z hamowaniem specyficznego programu regulatorowych komórek T [58]. Leczenie nakierowane na wyciszenie genu RORc w komórkach Th17 mogłoby stanowić przełom terapeutyczny w leczeniu nie tylko reumatoidalnego zapalenia stawów, ale również innych chorób o podłożu zapalnym [49].

Komórki Th17 oraz Treg są dwoma podzbiorami komórek przejawiających wiele przeciwstawnych właściwości. Do niedawna uważano, iż konwersja między Treg i Th17 jest „jednokierunkową ulicą”, gdzie możliwe jest tylko przekształcenie komórek Treg w Th17. Jednakże ostatnie badania [59] wykazały, że komórki Th17 mogą stracić zdolność do produkcji IL-17 i pewien procent komórek Th17 może nabywać właściwości charakterystyczne dla komórek Treg o fenotypie CD4 + Foxp3- Type 1 Treg (Tr1). Zachowanie odpowiedniej równowagi pomiędzy zapaleniem (Th17) a immunologiczną tolerancją (Treg) jest wyznacznikiem skutecznej obrony przed rozwojem chorób zapalnych czy autoimmunizacyjnych [22]. Natomiast przechylenie tej równowagi w kierunku komórek Th17 wywiera znaczący wpływ na przebieg procesu zapalnego promując jego rozwój w kierunku bardziej agresywnego [22]. Mechanizmy prowadzące do zachwiania równowagi pomiędzy komórkami Th17 a Treg nadal pozostają niewyjaśnione. Wypełnienie tej luki poprzez lepsze zrozumienie molekularnych i komórkowych podstaw związanych zarówno z rozwojem, jak i funkcjonowaniem obu tych subpopulacji komórek ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia kierunku utrzymania immunologicznej homeostazy, wzajemnej relacji pomiędzy Th17 i Treg oraz ich czynnikami transkrypcyjnymi – RORc2 i Foxp3 [43], ale także mogą mieć implikacje terapeutyczne dla chorych na RZS leczonych metodami skierowanymi na komórki Th17 lub ich produkty. Ponadto przywrócenie równowagi między komórkami Th17 a Treg u chorych na RZS może prowadzić do regresji choroby poprzez zastosowanie leczenia opartego na dowodach i poprawy jakości życia pacjentów.

Istotność badań asocjacyjnych w rozwoju, przebiegu oraz leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów.

Erę badań molekularnych poprzedzają badania epidemiologiczne na podstawie, których reumatoidalne zapalenie stawów zostało zakwalifikowane nie tylko do chorób wieloczynnikowych, ale również wielogenowych [60]. Pierwsze badania sprzężeń genetycznych przeprowadzone na małych lub średniej wielkości grupach nie umożliwiały wykrycia istotnych alleli ryzyka RZS, pomimo iż analizie były poddawane znaczne obszary genomu. Dopiero zwiększenie wielkości badanych grup kliniczno-kontrolnych, zastosowanie gęstszych map polimorficznych markerów oraz badanie ekspresji genów zaangażowanych w proces zapalny, spowodowały, że teraz jesteśmy w pozycji, w której genetyka molekularna jest istotnym wkładem w naszą wiedzę na temat patofizjologii RZS [60]. W celu scharakteryzowania „genetycznych współwinowajców” choroby zaczęto przeprowadzać genetyczne badania populacyjne - badania asocjacyjne, istotą, których jest znalezienie korelacji pomiędzy fenotypem choroby a polimorfizmem genetycznym w celu wyselekcjonowania genetycznych czynników ryzyka specyficznych dla danej jednostki chorobowej [61-63]. Na ogół to podejście obejmuje wybór genu kandydującego poprzez rozważenie różnych informacji, takich jak ocena mechanizmu zachorowania i patologii czy analiza wyników badań sprzężeń zarówno u ludzi, jak i w zwierzęcych modelach chorobowych [64]. Ponadto tego typu analizy stosuje się w przypadku genów o stosunkowo niewielkim wpływie na analizowany fenotyp i polegają one na przeprowadzeniu badań typu „case-control study”, w których grupę badaną (osoby chore) porównuje się z grupą kontrolną (osoby zdrowe). Natomiast interpretacja genetycznych powiązań na poziomie istotności może wskazywać na 1) bezpośredni związek analizowanego polimorfizmu z podatnością na chorobę, 2) SNP, które, pomimo iż są powiązane z chorobą, to w większości przypadków zmienione nukleotydy niekoniecznie sprawczo związane są z wystąpieniem schorzenia, a jedynie mogą pozostawać w nierównowadze sprzężeń (linkage disequilibrium; LD) z innym, mniej lub bardziej oddalonym polimorfizmem, który ma znaczenie czynnościowe (związek pośredni) [65], 3) obserwacje fałszywie pozytywne (stratyfikacja populacji) [61].

Historycznie, termin polimorfizm oznacza wystąpienie dwóch lub więcej form allelicznych w danym locus chromosomu [63]. Technicznie rzecz biorąc zmiana taka musi być obserwowana u więcej niż 1% populacji ogólnej i najczęściej określana jest, jako polimorfizm pojedynczego nukleotydu (single nucleotide polymorphism; SNP) [62]. W rzeczywistości, mechanizmy molekularne chorób złożonych, włączając RZS, mogą być o wiele bardziej wyrafinowane niż to, co mamy do zobrazowania. Z jednej strony, pojedyncze cechy fenotypu

choroby mogą wynikać z mutacji w różnych genach, czyli z tzw. różnorodności genetycznej, a z drugiej strony jeden gen może również wpływać na wiele różnych fenotypów i wówczas mówimy o plejotropizmie genetycznym [66]. W definicji plejotropia opisuje wpływ pojedynczego genu na kilka różnych cech fenotypowych, które występuje, gdy nowa mutacja/polimorfizm w genie może mieć wpływ na niektóre lub wszystkie cechy jednocześnie lub może powodować różne efekty patologiczne w chorobach wieloczynnikowych [66].

W ciągu ostatnich lat, coraz więcej uwagi poświęca się polimorfizmom genetycznym mediatorów zapalenia, które mogą być pomocne w wyjaśnieniu różnic w przebiegu reakcji immunologicznych i zapalnych, a także mogą służyć, jako geny podatności dla stanów patologicznych. Co więcej, polimorfizmy te stały się standardowymi markerami genetycznymi wykorzystywanymi do poszukiwania alleli sprzężonych z daną jednostką chorobową. Identyfikacja funkcjonalnych polimorfizmów jest ważna nie tylko dla określenia efektu genetycznej zmienności ekspresji i funkcji mediatorów zapalenia, ale również umożliwia manipulowanie genetycznym wpływem na choroby autoimmunizacyjne. Dzięki badaniom asocjacyjnym u chorych na RZS udało się zidentyfikować wiele genów niosących allele ryzyka, jednak identyfikacja genów promujących proces chorobowy oraz ich dokładna charakterystyka pozostaje nadal niezrealizowana [60]. Dlatego tak istotne jest, aby stale rozszerzać panel analizowanych genów. Warto również podkreślić, iż analiza tła genetycznego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów niesie za sobą podwójne korzyści. W ujęciu modelowym tego typu badania dostarczają wielu informacji pomocnych w zrozumieniu patogenezы procesów prowadzących do zapalenia/autoimmunizacji. Natomiast z klinicznego punktu widzenia mogą być pomocne w typowaniu markerów genetycznych/prognostycznych wykorzystywanych do oceny ryzyka i/lub przebiegu choroby, ale także skuteczności zastosowanego leczenia – medycyna personalizowana [16, 67, 68].

Cel pracy

W pracach stanowiących osiągnięcie naukowe prezentowanego Autoreferatu oceniane było znaczenie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach czynników transkrypcyjnych istotnych dla komórek Th17/Treg a także surowiczego stężenia produktów białkowych tych genów dla rozwoju i przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej z wykorzystaniem populacyjnych badań asocjacyjnych.

Cel ten został zrealizowany poprzez:

1. Porównanie rozkładu genotypów polimorfizmów -3279C/A i -924 A/G genu Foxp3; rs9826 A/G, rs1204588 T/C, i rs9017 G/A genu RORC2; rs6494629 C/T i rs2289263T/G genu Smad3; rs880324 G/A genu NFATc2 u chorych na RZS w odniesieniu do grupy zdrowych ochotników w populacji polskiej, celem sprawdzenia czy mogą być one czynnikami ryzyka zachorowania na RZS;
2. Określenie związku analizowanych polimorfizmów powyższych genów z przebiegiem choroby u pacjentów z RZS w oparciu o wybrane parametry kliniczne, laboratoryjne oraz radiologiczne;
3. Określenie związku analizowanych polimorfizmów genów Foxp3, NFATc2, Smad3, RORC2 i IL-23p19 z występowaniem powikłań pozastawowych i chorób układu krążenia u chorych na RZS;
4. Ocenę ekspresji białek syntetyzowanych przy udziale analizowanych genów w surowicy chorych na RZS i w grupie kontrolnej, w powiązaniu z badanymi polimorfizmami oraz parametrami klinicznymi RZS.

Powyższe czynniki transkrypcyjne zostały wybrane ze względu na ich istotność zarówno w regulacji odpowiedzi immunologicznej, jak i w generowaniu fenotypu komórek Th17 i Treg [23+]. Prezentowane prace stanowią wstęp do naszych dalszych badań nad funkcjonalnością komórek Th17/Treg u chorych nie tylko RZS, ale także z innymi układowymi zapalnymi chorobami tkanki łącznej. Uważam, iż tylko wielokierunkowo podjęte badania w patogenezie RZS, począwszy od zmian epigenetycznych, poprzez ekspresję mRNA, do określenia liczby komórek T i ich profilu cytokinowego w materiale pochodzącym od jednego pacjenta, pozwolą nam jednoznacznie przewidzieć potencjalne biomarkery RZS. W kolejnych etapach badań nad patogenezą RZS planowane są badania funkcjonalne z wykorzystaniem zarówno hodowli

w warunkach *in vitro* (stymulowane m.in. czynnikami transkrypcyjnymi/cytokinami z różnymi wariantami genetycznymi oraz miRNA), jak i badań na myszach z indukowanym zapaleniem stawów. Wytypowane na podstawie tych badań, istotne z punktu klinicznego i molekularnego, zmiany genetyczne/epigenetyczne będą stanowić podstawę do dalszy analiz związanych z poszukiwaniem potencjalnych inhibitorów i/lub aktywatorów powyższych czynników w celu przesunięcia równowagi w kierunku komórek Treg. W dalszych badaniach będziemy również wykonywać analizy korelacji zmian w czynnikach transkrypcyjnych i w komórkach T ze skutecznością stosowanych terapii. Zakładam, iż zaproponowane czynniki transkrypcyjne mogą być potencjalnym punktem odniesienia do opracowania nowego leku dla chorób zapalnych/autoimmunologicznych.

Wyniki

Polimorfizmy genetyczne czynnika transkrypcyjnego Foxp3 u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.

W fazie kontrolowanej homeostazy komórki Treg poprzez swoje funkcjonowanie mogą określać czy choroba autoimmunizacyjna się rozwine czy też nie. Natomiast w fazie chronicznego, przewlekłego zapalenia wzrost liczby tych komórek może być nawet szkodliwy, gdyż mogą doprowadzić do zahamowania naturalnego przebiegu efektywnej odpowiedzi immunologicznej, prowadząc w ten sposób do zmiany procesu zapalnego w chroniczne zapalenie autoimmunizacyjne. Pomimo iż komórki Treg wykazują ekspresję kilku markerów, to jednak najbardziej dla nich charakterystycznym/specyficznym jest Foxp3, który wymagany jest do utrzymania przez komórki Treg właściwości supresorowych nie tylko w grasicy, ale także na obwodzie. Ludzki gen Foxp3, zlokalizowany na chromosomie Xq11.23-Xq13.3, należy do rodziny regulatorów transkrypcji Fox i koduje białko Foxp3 charakteryzujące się konserwatywną 110-aminkwasową domeną odpowiedzialną za wiązanie do DNA. Foxp3 działa, jako aktywator transkrypcji genów, których ekspresja jest zazwyczaj podwyższona w komórkach nTreg, a to z kolei powoduje represję transkrypcji genów charakterystycznych dla subpopulacji komórek Th1 i Th2. Nabycie fenotypu przez komórki nTreg wydaje się wymagać wysokiej i trwałej ekspresji Foxp3 w celu ustabilizowania i wzmocnienia programu genetycznego komórek Treg. Ponadto, polimorfizmy zlokalizowane w genie Foxp3 mogą prowadzić do zarówno zaburzenia ekspresji genu Foxp3, jak i zmiany liczby oraz właściwości funkcjonalnych komórek

Treg, co sugeruje, że mogą odgrywać istotną rolę w zapoczątkowaniu i utrzymanie przewlekłych stanach zapalnych zależnych od komórek Treg. W celu przetestowania tej hipotezy analizie zostały poddane dwa funkcjonalne polimorfizmy genu *Foxp3* w pozycji -3279 C/A (rs3761548) oraz -924 A/G (rs2232365) i określono ich związek z podatnością i z przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów. Oba analizowane polimorfizmy zlokalizowane są w miejscu przyłączania się czynników transkrypcyjnych do promotora genu *Foxp3*: -3279 C/A w miejscu wiązania Sp-1, natomiast -924 A/G w miejscu wiązania GATA-3.

Dane z badań epidemiologicznych wykazały wyraźną różnicę w rozkładzie obu analizowanych polimorfizmów w różnych grupach etnicznych. Porównanie naszych danych z bazą HapMap (International HapMap Projekt) ujawniło, że frekwencja allelu *Foxp3* -3279A była wyższa w populacji polskiej (34%) niż w populacjach afrykańskiej, japońskiej czy chińskiej (od 4% do 26%), ale jednocześnie niższa niż w innych populacjach europejskich (41%). Różnice w częstości genotypów pomiędzy populacjami/badaniami mogą być spowodowane niejednorodnością analizowanych chorób, różnicami etnicznymi i geograficznymi, jak i wielkością badanych grup.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że rozkład genotypów i alleli dla genu *Foxp3* w pozycji -3279 C/A oraz w pozycji -925 A/G wykazał istnienie różnic statystycznie w rozkładzie kliniczno-kontrolnym. Analiza rozkładu genotypów została przeprowadzona w czterech różnych modelach genetycznych: kodominującym, dominującym, recesywnym i naddominującym, co umożliwia wykrycie z dużym prawdopodobieństwem tzw. „alleli przyczynowych”. W modelu kodominującym (CC vs CA vs AA) i dominującym (CC vs CA+AA) genotypy -3279 CA i AA występowały znacznie częściej u chorych na RZS niż w grupie kontrolnej ($p=0.0004$ i $p=0.037$ oraz $p=0,0004$; odpowiednio). W modelu naddominującym (CC+AA vs CA) zaobserwowano, iż występowanie genotypu -3279 CA było istotnie częstsze (47% vs 35%; $p=0.003$), a genotypów -3279 CC + AA rzadsze (53% vs 65%) w grupie chorych na RZS niż w grupie kontrolnej. Natomiast w modelu recesywnym (CC+CA vs AA) rozkład genotypów nie wykazał różnic pomiędzy chorymi na RZS a grupą kontrolną. W przypadku drugiego analizowanego polimorfizmu zaobserwowano, że genotyp -924 AG występował znacznie częściej u chorych na RZS niż w grupie kontrolnej w modelu kodominującym (AA vs AG vs GG; $p=0.00001$), w modelu dominującym (AA vs AG+GG; $p=0.00001$) oraz w modelu naddominującym (AA+GG vs AG; $p=0.00004$). W modelu recesywnym nie wykazano różnic na poziomie istotności pomiędzy badanymi grupami. Uzyskane wyniki sugerują, że polimorficzne allelu obu analizowanych wariantów genetycznych (-3279 A oraz -924 G) mogą być domniemanymi czynnikami zwiększonej predyspozycji

do reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej ($p=0,003$ i $p=0.0036$; odpowiednio). Za pomocą programu SHEsis sprawdzono również czy badane polimorfizmy genu Foxp3 znajdują się w nierównowadze sprzężeń (LD). W tym celu obliczono wskaźnik r^2 i D' . Z wykonanych analiz wynika, że loci obu analizowanych polimorfizmów są ze sobą słabo sprzężone i z małym prawdopodobieństwem dziedziczą się razem ($D'=0.481$; $r^2 = 0.225$).

Ponieważ analizowane warianty genetyczne w genie Foxp3 wykazały związek z rozwojem RZS w populacji polskiej, przeanalizowana została również korelacja pomiędzy badanymi polimorfizmami a poszczególnymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi

Analizując wyniki rozłożenia częstości genotypów polimorfizmu -3279 C/A Foxp3 w badanej populacji chorych na RZS stwierdzono znamienne wyższą średnią skali ocen zmian radiologicznych (Larsen) oraz współczynnika VAS (Visual analogue scale; wizualna skala aktywności choroby) u pacjentów z genotypem CC w porównaniu z pacjentami z genotypem CA lub AA ($p=0,01$, $p=0.03$). Natomiast liczba kobiet będących nosicielami genotypu Foxp3 -3279 CC była istotnie niższa niż liczba kobiet z genotypem CA lub AA (89% vs 96%; $p=0,04$). U nosicieli polimorficznego allelu -3279A zaobserwowano również istotnie częstsze występowanie czynnika reumatoidalnego (RF) w porównaniu do nosicieli allelu dzikiego -3279C ($p=0.03$).

Poziom białka Foxp3 w surowicy krwi obwodowej pacjentów z RZS i zdrowych ochotników oznaczono metodą immunoenzymatyczną przy użyciu standardowych testów ELISA. Wcześniejsze badania opisują poziom ekspresji mRNA Foxp3, co jest zrozumiałe i oczywiste, gdyż Foxp3 jest czynnikiem transkrypcyjnym i z założenia powinien działać w jądrze komórkowym. Natomiast nasze badania chcieliśmy przeprowadzić w sposób odmienny i mniej konwencjonalny. I pomimo, iż w literaturze światowej brak informacji na temat roli/udziału/znaczenia czynników transkrypcyjnych w surowicy, w naszych badaniach zdecydowaliśmy się zbadać jego poziom w surowicy chorych i w grupie kontrolnej. Ku naszemu zdziwieniu okazało się, że białko Foxp3 obecne było w surowicy zarówno osób chorych, jak i zdrowych. Być może ich obecność świadczy o pewnych stanach patologicznych, w których znalazły się komórki (nekroza). Na podstawie wykrytych poziomów Foxp3 próbki podzieliliśmy na pozytywne (poziom Foxp3 > 0,121 ng / ml) i negatywne (poziom Foxp3 < 0,121 ng / ml). Okazało się, że w grupie chorych na RZS występuje istotny wzrost stężenia białka Foxp3 w porównaniu z wartościami tego czynnika w grupie kontrolnej (51% RA vs 18% kontroli, $p=0.0001$), co może być odzwierciedleniem trwającego procesu zapalnego u chorych oraz podejmowaniem próby utrzymania go pod kontrolą. Poziomy białka Foxp3 w surowicy zostały również skorelowane z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi. Wykazano, że u pacjentów

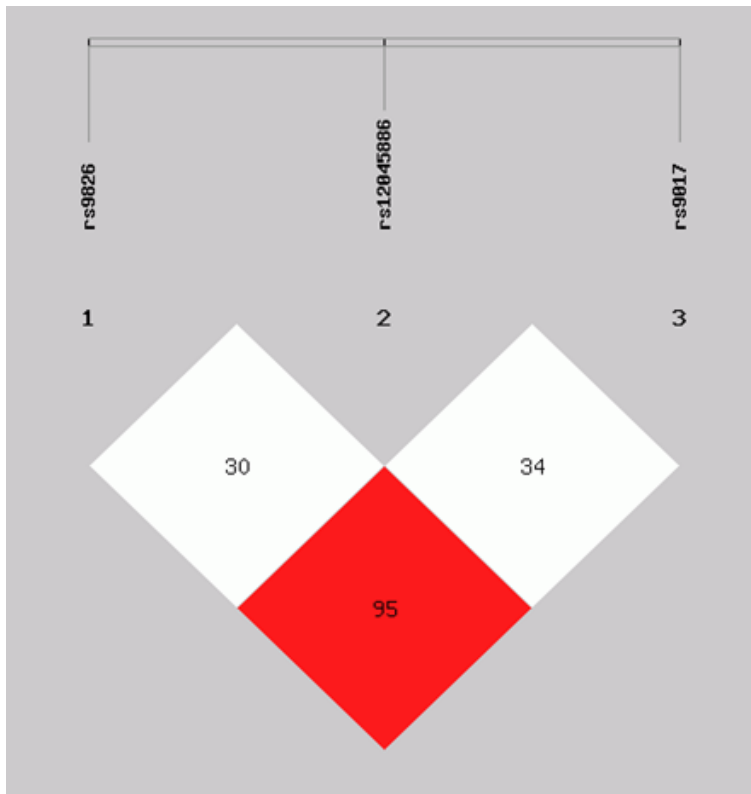
Foxp3-pozytywnych, średnia wartość DAS28-CRP, średni poziom białka CRP i płytek krwi, jak również obecność objawów narządowych były niższe niż u pacjentów Foxp3-ujemnych. Uzyskane wyniki wskazują, że pacjenci Foxp3-pozytywni mają niższą aktywność choroby i prawdopodobnie mogą mieć większą liczbę komórek Treg niż pacjenci Foxp3-ujemni i osoby z grupy kontrolnej. Ponadto, jak wykazano we wcześniejszych badaniach, komórki Treg izolowane od pacjentów z aktywnym RZS charakteryzowały się niską ekspresją mRNA Foxp3 i zmniejszoną zdolnością do tłumienia proliferacji i wydzielania cytokin przez komórki efektorowe. W związku z tym, możemy zakładać, że zwiększona liczba komórek Treg, a tym samym zwiększona ekspresja Foxp3 w surowicy pacjentów z RZS może być oznaką antagonizmu pomiędzy komórkami Th17 i Treg i wpływać na przesunięcie równowagi w kierunku komórek Treg (cel kolejnych badań). Ponadto polimorfizmy zlokalizowane w regionie promotorowym genu Foxp3 mogą stać się potencjalnym celem terapeutycznym umożliwiającym kontrolowanie ekspresji genów. **Wyniki te są pionierskie na skalę światową i zostały opublikowane w pracy pt. „Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with Rheumatoid Arthritis” (J Rheumatol 2015).**

Znaczenie wariantów genetycznych RORc2 dla zachorowania i przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej.

Komórki Th17 będące dominującym typem komórek efektorowych związanych z indukcją procesu autoimmunizacyjnego, są znacznie bardziej skuteczne w wywoływaniu zapalenia niż komórki Th1, a zatem uznawane są obecnie za "głównym sprawcą" chorób autoimmunizacyjnych.

Głównym czynnikiem transkrypcyjnym charakterystycznym dla komórek Th17 jest RORc2, będący ortologiem mysiego ROR γ t. Gen dla RORc2 zlokalizowany jest długim ramieniu chromosomu 1 w pozycji 1q21-q23 i koduje białko, które jest czynnikiem transkrypcyjnym wiążącą DNA i jest członkiem podrodziny jądrowych receptorów NR1. Wyeliminowanie czynnika RORc2 przyczynia się do wzrostu poziomu Foxp3 i obniżenia ekspresji cytokin prozapalnych, co sugeruje, że jego rola w rozwoju komórek Th17 związana jest nie tylko z indukcją genów charakterystycznych dla Th17, ale także z hamowaniem specyficznego programu komórek Treg. Badanie zaprezentowane w pracy pt.: „**RORC2 Genetic Variants and Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis**” (**Internation Journal of Molecular Science, 2016**) zostało zmotywowane pytaniem czy czynnik transkrypcyjny RORc2, odgrywający

istotną rolę w różnicowaniu komórek Th17 oraz komórek Treg produkujących IL-17, może być również silnym markerem molekularnym/genetycznym dla zachorowania i przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. W tym celu został oceniony związek polimorfizmów rs9826 A/G (3'UTR), rs12045886 T/C (3'UTR) i rs9017 G/A (intron) genu RORc2 z częstością zachorowania oraz z przebiegiem klinicznym reumatoidalnego zapalenia stawów. Polimorfizmy zlokalizowane w regionie 3'UTR genu mogą zakłócać proces translacji mRNA, jak i wpływać na jego stabilność, co z kolei może mieć przełożenie na funkcjonalność wyprodukowanego białka. W celu określenia korelacji pomiędzy polimorfizmami genów RORc2 a ryzykiem rozwoju RZS rozkład częstości genotypów i alleli wśród chorych i w grupie kontrolnej został przeanalizowany w trzech modelach genetycznych kodominujący, dominujący i recesywny. Jednakże analiza każdego z polimorfizmów oddzielnie nie wykazała korelacji na poziomie istotności z podatnością na RZS w naszej populacji. Stosunkowo niewielka grupa badana (591 osób z RZS) mogła uniemożliwić wykrycie rzeczywistych asocjacji. Ponadto, udział niektórych polimorfizmów w predyspozycji genetycznej do reumatoidalnego zapalenia stawów może zostać „przytłumiony” poprzez czynniki środowiskowe lub/i inne specyficzne czynniki genetyczne uczestniczące w sygnalizacji komórkowej. Natomiast, kiedy analizowano wszystkie SNPs razem w celu zbadania LD pomiędzy nimi i utworzenia haplobloku (ryc 1.) zaobserwowano, iż haplotyp ATA (rs9826/rs12045886/rs9017) zmniejsza ryzyko rozwoju RZS w naszej populacji i potwierdza, iż wpływ czynnika genetycznego na ryzyko rozwoju choroby nie może ograniczać się do pojedynczego SNP.



Rycina 1. Nierównowaga sprzężeń pomiędzy SNPs genu RORc2.

Analiza korelacji pomiędzy polimorfizmami w genie RORc2 a fenotypem reumatoidalnego zapalenia stawów wykazała dodatnią asocjację polimorfizmu rs9826 A/G z czasem trwania choroby, średnimi wartościami białka CRP i kreatyniny oraz ze współczynnikiem VAS (wizualna skala aktywności choroby, ang. Visual Analogue Scale). Nosiciele polimorficznego genotypu rs9826 GG charakteryzowali się znacząco dłuższym czasem trwania choroby w porównaniu z nosicielami allelu dzikiego rs9826 A ($p=0.017$). Z drugiej strony nosiciele allelu rs9826A wykazywali wyższe średnie wartości CRP i kreatyniny oraz wyższe wartości współczynnika VAS ($p=0.0005$, $p=0.02$, $p=0.006$, odpowiednio). Zaobserwowano również, iż nosiciele allelu rs9017A mieli bardziej zaawansowaną chorobę, wyższy DAS-28 (Disease Activity Score) oraz HAQ (Health Assessment Questionnaire), niż nosiciele allelu rs9017 G, sugerując, że polimorfizm ten może być związany z większą aktywnością procesu chorobowego. Co więcej, badanie pokazało, że polimorfizmy rs9826 RORc2 A/G, rs12045886 T/C oraz rs9017 G/A w genie RORc2 mogą wpływać na różny poziom jego ekspresji. Wykazano, iż u chorych na RZS z genotypami rs9826AA, rs12045886TT i TC, oraz rs9017AA poziom białka RORc w surowicy jest znacznie wyższy niż u osób z grupy kontrolnej z tymi samymi genotypami. W badaniu zaobserwowano również, że pacjenci z wyższym poziomem białka RORc w surowicy mieli bardziej zaawansowaną chorobę, większą

liczbę opuchniętych stawów, wyższy HAQ, CRP oraz DAS-28. Naszym zdaniem poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych w komórkach docelowych jest odbiciem procesów transkrypcji, podczas gdy w surowicy są odzwierciedleniem biernie przebiegającej regulacji. Co więcej, uważamy, że analiza poziomu czynników transkrypcyjnych w surowicy może dostarczyć nam informacji o pewnych sytuacjach patologicznych, w których znalazły się komórki, co doprowadziło do uwolnienia ich zawartości na zewnątrz. Uważamy, że poziom RORc może wzrastać wraz z postępem choroby, gdyż jego ekspresja związana jest z komórkami Th17, których procent oraz aktywność wzrasta w silnie prozapalnym środowisku, które z kolei jest efektem postępu chorobowego. **Wyniki te są pionierskie na skalę światową.**

Rola czynników transkrypcyjnych genu Foxp3 i RORc2 w rozwoju zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym.

W kolejnym badaniu asocjacyjnym „**Association of the Smad3 and NFATc2 gene polymorphisms and their serum levels with susceptibility to rheumatoid arthritis in Polish cohorts**” (*Clinical and Experimental Immunology*, 2015) analizie zostały poddane warianty genetyczne zlokalizowane w genach Smad3 i NFATc2 odgrywających kluczową rolę w aktywacji transkrypcji/regulacji komórek T. **Wyniki te są pionierskie na skalę światową.** Rozkład genotypów polimorfizmu genu Smad3 w pozycji rs6494629 C/T w grupie chorych na RZS wykazał różnice na poziomie istotności w stosunku do grupy kontrolnej w modelu recesywnym (CC+CT vs TT) i naddominującym (CC+TT vs CT). W modelu recesywnym częstość występowania genotypu TT była istotnie wyższa w grupie pacjentów z RZS w porównaniu do grupy kontrolnej (OR=1.57, CI=1.09-2.24; p=0.014). Natomiast w modelu naddominującym genotyp heterozygotyczny CT był znacznie częściej obserwowany w grupie kontrolnej niż w grupie chorych na RZS (OR=0.64, CI=0.47-0.89; p=0.008). W pozostałych dwóch modelach, dominującym i kodominującym, nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą chorych na RZS a grupą kontrolną. Analiza polimorfizmu rs2289263 T/G genu Smad3 nie wykazała różnic znamiennej statystycznie tylko w modelu dominującym (TT vs TG+GG). W modelu kodominującym i recesywnym (TT+TG vs GG) częstość występowania genotypu GG była znamiennej częstsza w grupie chorych niż w grupie kontrolnej (OR=1.72, CI=1.03-2.86; p=0.037 i OR=1.90, CI=1.16-3.11; p=0.010, odpowiednio). Podobnie w modelu naddominującym (TT+GG vs TG) zmienności były na poziomie istotności statystycznej; genotyp heterozygotyczny TG znacznie częściej był obserwowany w grupie

zdrowych ochotników niż w grupie chorych na RZS (OR=0.68, CI=0.48-0.97; p=0.034). Jednakże, ani w przypadku polimorfizmu rs6494629 C/T, ani rs2289263 T/G nie były widoczne różnice w rozkładzie częstości alleli pomiędzy badanymi grupami. Natomiast u nosicieli obu polimorficznych alleli rs6494629 T/rs2289263G ryzyko zachorowania na RZS oraz poziom tego białka w surowicy był znacznie wyższe niż, w jakimkolwiek innym przypadku. Ponadto zaobserwowaliśmy, że nosiciele polimorficznego allelu rs6494629 T mieli wyższe parametry choroby niż nosiciele allelu dzikiego, co może sugerować na związek tego SNP ze zwiększoną aktywnością procesu chorobowego. Sugerujemy, iż polimorfizmy genu Smad3 mogą prowadzić do zaburzeń w szlaku sygnałowym TGF- β /Smad, który odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi komórek T. Pod wpływem pewnych wariantów genetycznych w genie Smad3 może dojść do zahamowania ekspresji/aktywności czynnika TGF- β , i z jednej strony do zahamowania ekspresji Fox3 i rozwoju komórek Treg, a z drugiej do wzrostu ekspresji RORc2 i nadmiernego rozwoju komórek Th17.

Główne osiągnięcia pracy habilitacyjnej:

- Są to pionierskie badania analizujące, po raz pierwszy, zależności pomiędzy różnymi wariantami genetycznymi w genach Foxp3, Smad3, RORc2 i NFATc2 oraz poziomami ekspresji produktów białkowych tych genów w surowicy krwi, a rozwojem i przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej.
- Wykazano, że czynniki transkrypcyjne Foxp3, RORc2, Smad3 i NFATc2 związane z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg mogą odgrywać rolę w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Wykazano, że stężenia surowiczego poziomu białek Foxp3, Smad3, NFATc2 i RORc2 były istotnie statystycznie wyższe u chorych na RZS niż w grupach kontrolnych. Ponadto analiza związku poszczególnych badanych polimorfizmów z poziomami białka wykazała, że zależność pomiędzy poziomem białka a analizowanymi genotypami była najlepiej widoczna w grupie chorych na RZS. Polimorfizmy genu Foxp3 -3279C/A i -924 A/G, Smad3 rs6494629 C/T i rs2289263T/G mogą prowadzić do wzrostu ekspresji białka Foxp3 i Smad3, który z kolei przyczynia się do bardziej zaawansowanego stadium choroby. Ponadto, podwyższony poziom ekspresji tych czynników w surowicy chorych na RZS może odzwierciedlać stopień zaawansowania procesu zapalnego toczącego

się w chorym stawie, przyczynić się do lepszego poznania etiopatogenezy choroby, a także mieć istotne implikacje terapeutyczne.

- Wyniki badań wydają się potwierdzać hipotezę odnośnie roli czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem/funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg w etiopatogenezie RZS. W szczególności potwierdzono związek występowania wariantu genetycznego -3279C/A i -924 A/G genu Foxp3 oraz rs6494629 C/T i rs2289263 T/G genu Smad3 z rozwojem RZS, a także dodatnią korelację haplotypu Foxp3 -3279A /-924G i haplotypu Smad3 rs6494629 T/rs2289263 G z występowaniem tego powikłania. Powyższe polimorfizmy mogą kandydować do roli markera zwiększającego ryzyko zachorowania na reumatoidalne zapalenie stawów w populacji polskiej.
- Uzyskane wyniki dotyczące częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów genu NFATc2 nie wskazują na ich bezpośredni związek z ryzykiem rozwoju i przebiegiem RZS.
- Analiza nierównowagi sprzężeń (LD) badanych polimorfizmów wykazała istnienie różnic w LD polimorfizmów genu Smad3 rs6494629 C/T i rs2289263 T/G pomiędzy grupą chorych na RZS a grupą kontrolną. Tendencja do częstszego występowania haplotypu TG genu Smad3 zawierającego dwa zmutowane allele powyższych polimorfizmów wskazuje na sumowanie się wpływu tych alleli w zwiększeniu ryzyka rozwoju RZS.
- Wykazano korelację pomiędzy polimorfizmami genów Smad3 a fenotypem reumatoidalnego zapalenia stawów. Badania pokazują, że polimorfizmy genu Smad3 rs6494629 C/T oraz rs2289263 T/G mogą być związane z większą aktywnością procesu chorobowego u chorych na RZS.
- Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany na poziomie DNA mogą odgrywać rolę w zwiększonej predyspozycji do rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej.

Uporządkowanie danych biologicznych w jasną i przejrzystą sieć pozwoli nam jeszcze lepiej poznać/zrozumieć nie tylko patogenezę reumatoidalnego zapalenia stawów, ale także inne choroby uwarunkowane wielogenowo. Zrozumienie struktury oraz dynamiki molekularnej sieci jest niezwykle ważne dla zrozumienia tych chorób, a ich dalsze analizy nie tylko dają wsparcie w badaniach nad chorobami autoimmunologicznymi, ale również pozwalają zoptymalizować ich leczenie. Reumatoidalne zapalenie stawów jest zespołem chorobowym, w którym wiele różnych elementów układu immunologicznego ulega aktywacji. Proces zapalny toczący się w przebiegu RZS wywoływany jest przez cytokiny i inne geny związane z układem immunologicznym tworzące ściśle powiązaną sieć, której elementy wzajemnie się kontrolują i regulują, przez co

wpływają na zachowanie odpowiedniej równowagi w poziomie określonych białek, co jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu. Dlatego też znalezienie genetycznego podłoża zaburzeń autoimmunologicznych może stanowić krok na drodze do poznania immunologii procesu patogenetycznego prowadzącego do zachorowania i umożliwić zapobieganie występowania określonego zaburzenia. Jak wiadomo, identyfikacja oraz zrozumienie wpływu poszczególnych czynników genetycznych zarówno na rozwój i ciężkość choroby, jak i skuteczność stosowanych terapii jest w dużej mierze ciągle przed nami. Zrozumienie mechanizmów regulujących funkcje genów biorących udział w patogenezie RZS może stanowić alternatywę dla leków biologicznych celujących w indywidualne cytokiny. Jednak obok przywrócenia równowagi w ekspresji czynników pro- i przeciwzapalnych w organizmie, w proponowanych nowych strategiach leczenia wykorzystujących terapię genową uwzględnia się również precyzyjne celowanie w określone geny lub geny będące kluczowymi regulatorami wielu mechanizmów w komórkach istotnych w patogenezie RZS. Ponadto lepsze zrozumienie funkcjonowania komórek T w układzie autoimmunologicznym oraz zidentyfikowanie farmakologicznych narzędzi pozwalających na zwiększenie (Treg) bądź zmniejszenie (Th17) ich poziomu w komórce jest istotnym kierunkiem prowadzonych obecnie badań nad strategią terapeutyczną bólu. Ostatecznie ma to na celu doprowadzenie m.in. do „genetycznej synowektomii”, zakłócenia przekazywania sygnału na ścieżkach sygnałowych istotnych z terapeutycznego punktu widzenia, hamowania angiogenezy i procesów związanych z degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej. W przyszłości prawdopodobnie analizy genetyczne obejmujące badania polimorfizmów genetycznych, analizę całego genomu, czy ekspresji miRNA pozwolą na wyznaczenie nowych biomarkerów w diagnostyce RZS oraz rozwój skutecznych metod profilaktyki i terapii RZS. Będzie to podstawą do zastosowanie farmakogenomiki w chorobach reumatycznych i być może pozwoli na rozwój terapii indywidualnej w tej grupie chorych.

Piśmiennictwo (wybrane pozycje na potrzeby autoreferatu):

1. Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med* 2016; 31:210-218.
2. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4(suppl 3): S265-S272.
3. Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E et al. IL-23 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Scand J Immunol*. 2010; 71:134-45.

4. Paradowska A, Maslinski W, Grzybowska-Kowalczyk A et al. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp* 2007; 55:329–34.
5. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:206.
6. Layh-Schmitt G, Colbert RA. The interleukin-23 / interleukin-17 axis in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20:392–7.
7. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 774–87.
8. Kelly M. Robert Bridges: Pioneer in rheumatology. *Med Hist* 1961; 5:297-9.
9. Cobb S, Kasl SV. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *A.J.P.H.* 1966; 56: 1657-1663.
10. Williams EA, Fye KH. Rheumatoid arthritis. *Postgrad Med* 2003; 114(5): 19-28.
11. Sangha O. Epidemiology of rheumatic disease. *Rheumatology* 2000; 39(suppl.2): 3-12.
12. Reveille JD. Genetics studies in the rheumatic disease: present status and implications for the future. *J Rheumatol* 2005; 32 (Suppl. 72):10–3.
13. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursor to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009; 21:pp.489-498.
14. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW et al. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011; 63:459-466.
15. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9:141–153.
16. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A et al. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia – present and future. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11:375-379.
17. Glant TT, Mikecz K, Rauch TA. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Medicine* 2014, 12:35.
18. Andersson AK, Li C, Brennan FM. Recent developments in the immunology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10:204.
19. Li B, Samanta A, Song X et al. Foxp3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol Rev* 2006, 212:99-113.
20. Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G et al. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2015; 6:384.
21. Boissier MC, Assier E, Biton J et al. regulatory T cells (treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2009; 76:10-14.
22. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmune Rev* 2014; 13:668-677.

23. Bettelli E, Korn T, Oukka M et al. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nat Rev* 2008; 453:1051-1057.
24. Pernis AB. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Intern Med* 2009; 265:644-652.
25. Alunno A, Manetti M, Caterbi S et al. Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:751793
26. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:652-657.
27. Mirshafiey A, Asghari B, Ghalamfarsa G et al. The significance of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014; 14:e13-25.
28. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 2008; 41:84-91.
29. Peck A, Mellins ED (2009) Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 132: 295-304.
30. Bettelli E, Korn T, Oukka M et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453: 1051-1057.
31. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F et al. Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat Rev Rheum* 2009; 5:325-331.
32. Crome SQ, Wang AY, Kang CY et al. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2009; 39: 1480-1493.
33. O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A et al. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect* 2009; 11:599-611.
34. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 159: 109-119.
35. Unutmaz D. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur J Immunol* 2009; 39: 1452-1455.
36. Alunno A, bartoloni E, Nocentini G et al. Role of regulatory T cells in rheumatoid arthritisL facts and hypothesis. *Autoimmun Highlights* 2010; 1:45-51.
37. Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. Tger-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheum* 2014; 10:543-551.

38. Chavela KM, Ehrenstein MR. regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS letters* 2011; 585:3603-3610.
39. Byng-Maddick R, Ehrenstein MR. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2015; 54:768-775.
40. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2775-2785.
41. Cao D, Malmstrom V, Becher-Allan C et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003; 33:215-223.
42. Olivito B, Simonini G, Ciullini S et al. Th17 transcription factor RORC2 is inversely correlated with FOXP3 expression in the joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2009; 36:2017-2024.
43. Chen Z, Lin F, Gao Y et al. Foxp3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11:536-542.
44. Nik Tavakoli NN, Hambly BD, Sullivan DR et al. Forkhead box protein 3: essential immune regulatory role. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:2369-2373.
45. Darce J, Rudra D, Li L et al. An N-terminal mutation of the Foxp3 transcription factor alleviates arthritis but exacerbates diabetes. *Immunity.* 2012; 36:731-741.
46. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol.* 2009; 70:326-336.
47. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007; 445:766-770.
48. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.*; 8:277-284.
49. Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y et al. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity.* 2009; 31:932-940.
50. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of foxp3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 2009; 9:83-89.
51. Campbell DJ, Ziegler SF. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:305-310.
52. Sitara D, Aliprantis AO. Transcriptional regulation of bone and joint remodeling by NFAT. *Immunol rev* 2010; 233:286-300.
53. Wang J, Gardner BM, Lu Q et al. Transcription factor Nfat1 deficiency causes

- osteoarthritis through dysfunction of adult articular chondrocytes. *J Pathol.* 2009; 219:163-172.
54. Yao JY, Wang Y, An J et al. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11:714-717.
 55. Anthoni M, Fyhrquist-Vanni N, Wolff H et al. Transforming growth factor-beta/Smad3 signalling regulates inflammatory responses in a murine model of contact hypersensitivity. *Br J Dermatol.* 2008; 159:546-554.
 56. Martinez GJ, Zhang Z, Chung Y et al. Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem.* 2009; 284:35283-35286.
 57. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 159:109-119.
 58. Burgler S, mantel PY, Bassin C et al. RORc2 is involved in T cell polarization through interaction with the foxp3 promoter. *J Immunol* 2010; 184:6161-6169.
 59. Gagliani N, Amezcuca Vesely MC et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature.* 2015; 523: 221-225.
 60. Reynard LN, Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev Mol Med.* 2013; 15:e2.
 61. Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012; 2012:297-306.
 62. A.S. Foulke., *Applied Statistical Genetics with R: For Population-based Association Studies, Use R* 2009
 63. Lunetta KL. Genetic Association Studies. *Circulation.* 2008; 118:96-101.
 64. Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorder. *Immune Rev* 2002; 190: 169–181.
 65. Raychaudhuri S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22:109–118.
 66. Zheng W and Rao S. Knowledge-based analysis of genetic associations of rheumatoid arthritis to inform studies searching for pleiotropic genes: a literature review and network analysis. *Arthritis Research & Therapy* 2015; 17:202.
 67. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genetics* 2013; 14:39.
 68. Pratt AG, Isaacs JD. Genotyping in rheumatoid arthritis: a game changer in clinical management? *Expert Rev Clin Immunol.* 2015; 11:303-305.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

A. Analiza bibliometryczna dorobku na podstawie danych dostępnych w bazie "Thomson Reuters Web of Science" – stan na dzień 21 czerwca 2016 r.:

Mój dorobek naukowy obejmuje 24 publikacje w tym, 17 jako pierwszy autor, umieszczonych w czasopismach polskich i zagranicznych. Analiza bibliometryczna mojego dorobku wykazała, że łączny Impact Factor wynosi 41,763. Prace oryginalne stanowią 11 pozycji o łącznym IF 27,079. Prace pogładowe obejmują 13 pozycji o łącznym IF 11,77. Pełnotekstowe publikacje w suplementach czasopism stanowią 2 pozycje o łącznym IF 2,914. Ponadto jestem autorem lub współautorem 27 streszczeń zjazdowych, z czego 20 było prezentowane na zjazdach międzynarodowych.

Sumaryczny dorobek (bez prac umieszczonych w suplementach czasopism) określany przez ilość punktów KBN/MNiSW to 427 punktów, natomiast wyliczony Index Copernicus to 82,79 punktów.

Łączna liczba cytowań prac pełnotekstowych wynosi 178 (bez autocytowań) według ISI Web of Science z dnia 21 czerwca 2016. Indeks Hirscha z dnia czerwca 2016 stanowi 8.

B. Tematyka pozostałych prac badawczych

W Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji zatrudniona jestem od roku 2006. Od samego początku swej pracy zaangażowana byłam w projekty naukowo-badawcze z dziedziny biologii molekularnej.

Od kilku lat prowadzę własną grupę badawczą, która realizuje projekty naukowo-badawcze finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, naukową Fundację Polpharmy oraz w ramach planów statutowych NIGRiR. Tematyka prac naukowo-badawczych realizowanych pod moim kierunkiem związana jest z badaniem patogenezy układowych zapalnych chorób tkanki łącznej (CTD), włączając reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), mieszaną chorobę tkanki łącznej (MCTD), toczeń rumieniowaty układowy (TRU), zespół antyfosfolipidowy (APS) oraz twardzinę układową (TU). Należą one do chorób, gdzie predyspozycja genetyczna, działanie stymulujące czynników środowiskowych oraz zaburzenia w regulacji immunologicznej są w różnym stopniu odpowiedzialne za powstawanie oraz rozprzestrzenianie się zmian zapalnych. Ze względu na złożoną etiologię, trudności diagnostyczne i znaczenie prawidłowego rozpoznania dla rokowania, istotne jest zdefiniowanie

czynników zarówno warunkujących etiopatogenezę i powikłania charakterystyczne dla RZS, TRU, APS, TU czy MCTD, jak i różnicujących poszczególne jednostki chorobowe między sobą. Głównym zadaniem prowadzonych przeze mnie badań jest próba wyjaśnienia, czy takim czynnikiem może być naturalna zmienność (polimorfizm) sekwencji genów zaangażowanych w inicjowanie i modulację przewlekłego zapalenia w CTD. Pomimo, iż istnieją kontrowersje dotyczące udziału czynników genetycznych w etiologii CTD, to jednak chciałabym znaleźć odpowiedź na pytanie czy nadatki bądź ubytki w genomie, mające wpływ na ekspresje genów, mogą być łączone z rozwojem/przebiegiem/fenotypem CTD. Prowadzone przeze mnie badania skupiają się w dużej mierze na analizie korelacji pomiędzy występowaniem tych chorób, ich fenotypem a podłożem genetycznym/epigenetycznym i immunologicznym. Prowadzone badania koncentrują się na określeniu zmienności genetycznej w obrębie analizowanych genów, analizie ekspresji poszczególnych genów na poziomie RNA i białka, analizie ekspresji miRNA oraz na określeniu relacji genotyp-fenotyp.

Jednym z kierunków moich badań jest znalezienie odpowiedzi na pytanie jak zmiany genetyczne i epigenetyczne oraz funkcjonalne oddziaływanie między mRNA a miRNA (badania rozpoczęto w 2016 roku) korelują z fenotypem komórek T oraz predyspozycją do rozwoju i przebiegiem układowych zapalnych chorób tkanki łącznej. W tym celu analizie zostały poddane czynniki transkrypcyjne: Foxp3, RORC2, NFATc2, Smad oraz cytokiny: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-23R, IL-27, TNF- α , TGF- β , IFN związane z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg. Zakładam, że zaburzenia w funkcjonowaniu powyższych czynników mogą mieć potencjalne znaczenie w dalszym rozwoju i przebiegu tych jednostek chorobowych. Przypuszczam, iż polimorfizmy w genach powyższych czynników i cytokin, zmiany w sekwencji genów miRNA, poziomie ekspresji mRNA/miRNA/białek oraz profil zmian metylacji DNA mogą przyczynić się do zmiany poziomu wydzielanych cytokin pro- i anty-zapalnych oraz zaburzenia równowagi pomiędzy komórkami T, a zatem potencjalnie mogłyby odgrywać istotną rolę w podatności i przebiegu klinicznym CTD.

Wpływ polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) wybranych cytokin na predyspozycje do rozwoju oraz przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów.

Polimorfizmy w genach dla cytokin odgrywają bardzo ważną rolę nie tylko na poszczególnych etapach procesu zapalnego toczącego się w reumatoidalnym stawie, ale także mogą mieć wpływ na sam przebieg RZS, jak i jego leczenie. IL-1 β , TNF- α oraz IL-10 uznawane są nie tylko za markery prognostyczne RZS, ale również odpowiedzialne są za aktywację

enzymów w płynie stawowym, które wywołują degradację kości. IL-17 odgrywa prawdopodobnie znaczącą rolę w patogenezie RZS, ponieważ indukuje destrukcję chrząstki i tkanki kostnej oraz pełni istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Natomiast IL-12 oraz IL-27 biorą udział między innymi w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej różnych subpopulacji limfocytów Th oraz pełnią szczególną rolę w regulacji równowagi pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą. We współpracy z zespołem pana profesora Andrzeja Pawlika z Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie udało nam się przeprowadzić analizy genetyczne na dość licznej grupie chorych na RZS. Przeprowadzane badania wykazały, że **1)** polimorfizmy genu IL-10 w pozycji -1082G/A i -592C/A mogą być związane ze zwiększoną predyspozycją do rozwoju RZS w populacji polskiej, **2)** polimorfizm genu IL-10 w pozycji -1082G/A może być związany z większą aktywnością procesu chorobowego u chorych na RZS oraz z pogarszaniem się ich sprawności fizycznej, **3)** rzadsze występowanie genotypu IL-1 β -511CT oraz allelu IL-1 β +3953C w populacji polskiej chorych na RZS może wskazywać na ich protekcyjną rolę w rozwoju choroby, **4)** polimorfizm genu IL-1 β w pozycji -511C/T i +3953C/T może być związany z bardziej aktywną postacią RZS, **5)** żaden z analizowanych polimorfizmów genu IL-1 β oraz IL-10 nie wykazał wyraźnej korelacji z występowaniem powikłań pozastawowych i chorób układu krążenia u chorych na RZS w populacji polskiej **6)** polimorfizmy genu IL-17F nie wykazały związku z podatnością na RZS, natomiast wariant IL-17F His161Arg korelował z parametrami aktywności choroby, takimi jak liczba bolesnych stawów ($p=0,03$), DAS-28-CRP ($p=0,06$) oraz HAQ ($p=0,08$), natomiast wariant Glu126Gly IL-17F wykazał związek z czasem trwania choroby, który był dłuższy u nosicieli polimorficznego allelu G ($p=0,07$) - nasze badania **po raz pierwszy** przedstawiają korelację polimorfizmów genu IL-17F z rozwojem i przebiegiem RZS **7)** częstsze występowanie genotypu IL-27 -924GG i allelu -924G u pacjentów z RZS w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0.008$ and $p = 0.004$, odpowiednio), **8)** pomiędzy polimorfizmami genu IL27 -924A/G i 4730 T/C zaobserwowano silną nierównowagę sprzężeń ($D'-0,607$, $r^2 - 0,195$), **9)** analiza genotyp-fenotyp wykazały istotny związek pomiędzy polimorfizmem IL-27 4730 T/C a średnią wartością HAQ i OB, oraz wykazała, że osoby z polimorficznym allelem IL-27 -924G mieli bardziej zaawansowaną postać choroby niż nosiciele allelu dzikiego IL-27-924 A, **10)** polimorfizm genu TNF +489 G/A może być istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu krążenia u pacjentów z RZS **11)** genotyp IL-12B +1188 CC może być związany ze zwiększoną predyspozycją do wystąpienia reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji polskiej **12)** poziom IL-12 w surowicy krwi był znacznie wyższy w grupie chorych na RZS w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,0001$) **13)** podwyższony poziom IL-12 w surowicy korelował z wyższą liczbą bolesnych i obrzękniętych stawów, z większą liczbą

objawów pozastawowych (ExRA) oraz wyższym poziomem hemoglobiny, CRP i PLT. Również wyższy poziom IL-12 w surowicy obserwowano u pacjentów z RZS z nadciśnieniem tętniczym - te wyniki wskazują na rolę IL-12 w podatności i nasileniu procesu chorobowego u pacjentów z RZS.

RZS jest chorobą heterogenną, i coraz bardziej staje się oczywiste, że poszczególne interakcje pomiędzy cytokinami odgrywają znaczącą rolę w patogenezie choroby. Ponadto polimorfizmy w genach dla cytokin stały się standardowym markerem genetycznym do identyfikacji alleli powiązanych z chorobą. W związku z tym, poszerzanie naszej wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych RZS, jak również innych zaburzeń autoimmunologicznych to krok na drodze do opisanego patogenezy procesu zapalnego prowadzącego do choroby oraz możliwość zastosowania zdobytej wiedzy w badaniach profilaktycznych, terapeutycznych i epidemiologicznych dotyczących RZS.

- 1) **Paradowska-Goryca A**, Trefler J, Maciejewska-Stelmach J, Lacki JK. IL-10 gene polymorphisms in Polish rheumatoid arthritis patients. *Int J Immunogenetics* 2010; 37(4):225-31, IF – 1,620, KBN = 15
- 2) **Paradowska-Gorycka A**, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki JK, Maslinski S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2010; 72(2):134-41, IF – 2,230, KBN = 15
- 3) **A. Paradowska-Gorycka**, B. Raszkievicz, M. Jurkowska, A. Felis-Giemza, K. Romanowska-Próchnicka, M. Mańczak, M. Olesinska. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL27 gene with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2014; 80(4):298-305 IF- 2,230, KBN = 15
- 4) **Paradowska A**, Łacki JK. Pro-inflammatory cytokines gene polymorphisms in Rheumatoid Arthritis. *Centr Eur J Immunol* 2006;31(3-4):117-122. IF – 0,451, KBN = 15
- 5) **Paradowska A**, Maśliński W, Grzybowska-Kowalczyk A, Łacki JK. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007;55:329-334. IF-2,541, KBN = 25
- 6) Jakub Trefler, **Agnieszka Paradowska-Gorycka**, Ewa Matyska-Piekarska, i wsp.. Wpływ czynników genetycznych na rozwój i ciężkość przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów.”- czesc I. *Pol Merk Lek* 2009; 27(158): 157-60. KBN= 7
- 7) Jakub Trefler, **Agnieszka Paradowska-Gorycka**, Jan K. Łacki. Wpływ czynników genetycznych na rozwój i ciężkość przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów.”- czesc II. *Pol Merk Lek* 2009; 27(158): 161-5. KBN= 7

- 8) **Paradowska-Gorycka A**, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Scand J Immunol, 2010; 71(3): 134-145. IF-2,230, KBN = 15
- 9) Tarnowski M, **Paradowska-Gorycka A**, Dabrowska-Zamojcin E, Czerewaty M, Sluczanska-Glabowska S, Pawlik A. The effect of gene polymorphisms on patient responses to rheumatoid arthritis therapy. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2015 Nov 26; IF-2,831 KBN =30
- 10) **A. Paradowska-Gorycka**, A.Sowinska, B. Stypińska, E. Haladyj, A. Pawlik, K. Romanowska-Próchnicka, M. Olesinska. IL-12B Gene Polymorphisms and IL-12 p70 serum levels among patients with Rheumatoid Arthritis. Autoimmunity [w recenzji]

Udział cytokin, alleli HLA-DRB1, U1-RNP oraz receptorów TLR w predyspozycji do rozwoju oraz obrazie klinicznym mieszanej choroby tkanki łącznej (MCTD).

Historia MCTD, jako oddzielnej jednostki chorobowej rozpoczęła się przed 40 laty, w wyniku wieloletniej obserwacji chorych z objawami przypominającymi jednocześnie toczenia rumieniowatego układowego (TRU), twardzinę układową (TU), zapalenie wielomięśniowe (PM) i skórno-mięśniowe (DM) oraz reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Choroba ma heterogenny obraz kliniczny i przebieg. Ze względu na złożoną etiologię, trudności diagnostyczne i znaczenie prawidłowego rozpoznania dla rokowania, istotne jest zdefiniowanie czynników zarówno warunkujących etiopatogenezę i powikłania charakterystyczne dla MCTD, jak i różnicujących MCTD z innymi chorobami zapalnymi tkanki łącznej.

Nasza strategia badawcza, ma na celu identyfikację i ustalenie zależności pomiędzy charakterystyką genetyczną i epigenetyczną a podatnością na zachorowanie i przebieg MCTD. Identyfikacja polimorfizmów funkcjonalnych jest ważna nie tylko dla określenia efektu genetycznej zmienności ekspresji i funkcji mediatorów zapalenia, ale również umożliwia manipulowanie genetycznym wpływem na choroby autoimmunologiczne. Poznanie genetycznych uwarunkowań tych schorzeń może prowadzić nie tylko do poznania jej patogenezy, ale również do praktycznych zastosowań zdobytej wiedzy, w perspektywie obejmującej nawet indywidualizację leczenia zależną od informacji zawartej w genomie pacjenta. Dla zdecydowanej większości badanych przez nas markerów brak jest opublikowanych danych dotyczących MCTD, co czyni z naszych badań **badania pionierskie**. Ponieważ mieszana choroba tkanki łącznej jest choroba bardzo rzadka (ok. 1 przypadek na 100.000 osób) w celu uzyskania bardziej

wiarygodnych wyników została podjęta współpraca z zespołem pana profesora Zbigniewa Zdrojewskiego z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Przeprowadzone badania wykazały, że **1)** polimorfizmy genu IL-10 (-592C/A i -1082G/A) oraz IL-17 His161Arg mogą mieć wpływ na rozwój MCTD w populacji polskiej, **2)** polimorfizm genu IL-10 w pozycji -1082G/A wpływa na nasilenie objawów klinicznych, **3)** polimorfizm IL-12 (+1188A/C) nie wykazał związku zarówno z rozwojem, jak i objawami klinicznymi MCTD. W wyniku przeprowadzonych badań, na jednej z największej (do tej pory) populacji pacjentów z MCTD (103 chorych w naszych badaniach vs 24-69 w innych), **po raz pierwszy** wykazano możliwy związek allelu HLA-DRB1 *15: 01 z podatnością na MCTD. Okazało się, że obecność alleli HLA-DRB1*15:01 i *04 w populacji polskiej może odgrywać rolę „głównego allelu” ryzyka MCTD (w obu przypadkach $p < 0,0001$). Ponadto, allel HLA-DRB1 *09:01, który jest rzadko obserwowany w populacji polskiej, wykazał również związek z podatnością na chorobę w naszej populacji ($p = 0,002$). W przeciwieństwie do innych alleli, obecność allelu HLA-DRB1 * 07: 01 może być związana ze zmniejszoną podatnością na ryzyko rozwoju MCTD. Wyniki naszych badań wykazują, iż MCTD jest odrębną jednostką chorobową nie tylko pod względem klinicznym, ale i genetycznym.

- 1) **Paradowska-Gorycka A**, Jurkowska M, Czuszyńska Z, Felis-Giemza A, Mańczak M, Zdrojewski Z, Olesinska M. IL-10, IL-12B and IL-17 gene polymorphisms in patients with mixed connective tissue disease. *Mod Rheumatol.* 2014 Aug 27;1-3, IF – 2,206, KBN = 20
- 2) **A.Paradowska-Gorycka**, B.Stypińska, M.Olesińska, A.Felis-Giemza, M.Mańczak, Z.Czuszyńska, Z.Zdrojewski, J.Wojciechowicz, M.Jurkowska. Association of HLA-DRB1 alleles with susceptibility to mixed connective tissue disease (MCTD) in Polish patients. *Tissue Antigens* 2015; IF - 2.137, KBN = 20
- 3) **Agnieszka Paradowska-Gorycka**. U1-RNP and TLR receptors in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. Part I. The U1-RNP complex and its biological significance in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Reumatologia* 2015; 53, 2: 94–101 KBN = 14
- 4) **Agnieszka Paradowska-Gorycka**. U1-RNP and Toll-like receptors in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. Part II. Endosomal TLRs and their biological significance in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. *Reumatologia* 2015; 53, 3: 1–9 KBN = 14

Wpływ polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genach dla cytokin na predyspozycje do rozwoju i przebieg toczenia rumieniowatego układuowego.

Toczeń rumieniowaty układuowy (TRU) jest chorobą autoimmunizacyjną charakteryzującą się niekontrolowaną produkcją autoprzeciwciał, cytokin prozapalnych, zapaleniem tkanek oraz uszkodzeniem wielu narządów jednocześnie. Powszechnie przyjmuje się, że dezorganizacja układu odpornościowego w przebiegu toczenia odbywa się w wyniku rozregulowanego funkcjonowania limfocytów T. Dodatkowo, cytokiny są częściowo odpowiedzialne za utrzymanie właściwej równowagi pomiędzy komórkami prozapalnymi i przeciwzapalnymi. Etiopatogeneza TRU, podobnie jak pozostałych chorób reumatycznych pozostaje ciągle nieodkryta. Natomiast wiemy, że bardzo istotną rolę odgrywają złożone interakcje pomiędzy czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Ostatnie badania GWAS wykazały istnienie ok. 50 loci podatności genowej, związanych zarówno z fazą odporności wrodzonej, jak i nabytej. Mimo to znaczenie różnych wariantów polimorficznych w etiopatogenezie TRU pozostaje nadal do wyjaśnienia. Ponadto, częstość występowania TRU waha się zależnie od grupy etnicznej i wiadomo, że pacjenci o różnym profilu genetycznym mogą mieć różny przebieg choroby i odmienny fenotyp kliniczny.

We współpracy z zespołem pana profesora Pawła Jagodzińskiego z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, **po raz pierwszy**, przeprowadzono korelację pomiędzy polimorfizmem genu IL-23A (703 G/A; rs11171806) a ryzykiem rozwoju i obrazem klinicznym toczenia rumieniowatego układuowego. Zaobserwowaliśmy, że ten wariant genetyczny nie odgrywają istotnej roli w predyspozycji do rozwoju oraz przebiegu klinicznym SLE. Wykazaliśmy również, że polimorfizmy genu IL-17F rs763780 A/G, IL-23R rs1884444 G/T oraz IL-12B -6415 CTCTAA/GC (rs17860508) mogą być związane ze zwiększoną predyspozycją do rozwoju TRU w naszej populacji. Ponadto zaobserwowano, że nosiciele haplotypu IL-27 rs181206C/rs153109G mogą mieć również podwyższone ryzyko rozwoju TRU w porównaniu do osób z innymi kombinacjami genetycznymi. Analiza genotyp-fenotyp wykazała związek pomiędzy 1) SNP IL-17F rs2397084 A/G a średnią wartością hemoglobiny ($p = 0,01$); 2) SNP IL-17F rs763780 A/G a wiekiem ($p = 0,008$); 3) IL 23 rs11171806 a stężeniem mocznika ($p = 0,08$) i składnika C3 dopełniacza ($p = 0,03$); 4) pomiędzy polimorfizmem IL-12B rs3212227 A/C a liczbą płytek krwi, stężeniem mocznika i składnikiem C3 5) wariant genetyczny IL-12B rs17860508 wykazał korelację ze średnią liczbą płytek krwi, czasem protrombinowym i poziomem alkalicznej fosfatazy, 6) natomiast genotyp IL23R rs10489629 AA wykazał pozytywną korelację ze składnikiem C4. Przedstawione wyniki zostały zaprezentowane w poniższych publikacjach.

- 1) **Paradowska-Gorycka A**, Sowinska A, Stypinska B, Grobelna M.K, Walczyk M, Olesinska M, Piotrowski P, Jagodzinski P.P. Genetic variants in IL-12B and IL-27 in the Polish patients with systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol 2016; 84:49-60. IF – 2,230, KBN = 15
- 2) **Paradowska-Gorycka A**, Sowinska A, Stypinska B, Grobelna M.K, Walczyk M, Olesinska M, Piotrowski P, Jagodzinski P.P. Impact of the IL-17F, IL-23 and IL-23R on susceptibility and phenotype of systemic lupus erythematosus. Autoimmunity 2016; 19:1-10.
- 3) B. Stypinska, **A. Paradowska-Gorycka**. Cytokines and microRNAs as new biomarkers for SLE. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 24194-24218 IF-2.862, KBN = 30

Innym kierunkiem moich badań jest także ocena znaczenia polimorfizmów różnych czynników angiogennych (FLT1 (VEGFR1), PLGF, VEGF, KDR (VEGFR2)), a także ich ekspresji na poziomie mRNA i białka dla rozwoju i przebiegu RZS, SLE i MCTD. W chorobach tkanki łącznej charakterystyczne są nacieki zapalne wokół naczyń krwionośnych, którym towarzyszą zaburzenia procesu angiogenezy. Proces ten, jest nieodłącznym zjawiskiem patogenezy innych chorób zapalnych i nowotworowych. Zmiany naczyniowe w przebiegu CTD, jako główna przyczyna zwiększonej umieralności w przebiegu tych chorób, stają się możliwym celem terapeutycznym. Uważa się, że w wyniku niedotlenienia wewnątrzstawowo pojawia się początkowo czynnik indukowany przez niedotlenienie (HIF), którego wzmożoną ekspresję wykazują synowioocyty i limfocyty T wyodrębnione z nacieków błony maziowej. Pod jego wpływem są uwalniane czynniki proangiogenne, z których głównymi i najlepiej dotąd poznanymi są białka z rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (vascular endothelial growth factor; VEGF) oraz łożyskowego czynnika wzrostu (PLGF). Wierzę, że na podstawie przeprowadzonych badań uda nam się wytypować z puli znanych czynników, potencjalne biomarkery zapalnych chorób tkanki łącznej. Dotychczas stosowane markery genetyczne dla chorób reumatycznych nie są dostatecznie specyficzne, aby mogłyby być stosowane w praktyce klinicznej. Prawidłowe funkcjonowanie genu zależy również od odpowiedniego działania mechanizmów epigenetycznych, które są odmienne dla różnych typów komórek i tkanek, oraz dla różnych etapów ich rozwoju. Zdefiniowanie głównych czynników odpowiadających za patogenezę zapalnych układowych chorób tkanki łącznej pozwoli też na profilaktykę u osób podwyższonego ryzyka genetycznego oraz opracowanie i stosowanie leczenia celowanego skierowanego na przywrócenie równowagi immunologicznej. Poznanie patogenezy chorób zapalnych tkanki łącznej ma szczególne znaczenie w kontekście relatywnie młodego wieku zachorowania, przewlekłego charakteru choroby oraz powikłań prowadzących do

niepełnosprawności i przedwczesnego zgonu. Koszty ekonomiczne i społeczne tych relatywnie rzadkich chorób są ogromne.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Analiza bibliometryczna dorobku na podstawie danych dostępnych w bazie "Thomson Reuters Web of Science" – dostęp do baz w dniu 21 czerwca 2016 r.:

- Sumaryczny IF: 41,763
- Sumaryczna liczba punktów KBN/MNiSW: 427
- Liczba cytowań wszystkich publikacji bez autocytowań: 178
- Indeks-h: 8
- Łączna liczba publikacji naukowych (umieszczonych i nieumieszczonych na liście JCR): 24, w tym
 - ✓ 11 prac oryginalnych
 - ✓ 13 prac poglądowych
 - ✓ 17 jak pierwszy autor
- Doniesienia konferencyjne: 27, w tym
 - ✓ 9 prezentacje ustne
 - ✓ 18 prezentacje posterowe

Agnieszka Panadłowska-Gonycka