

AUTOREFERAT

dr n. med. Katarzyna Skonieczna

Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej

Katedra Medycyny Sądowej

Wydział Lekarski

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, 2019

Spis treści

1. Imię i Nazwisko.	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.	4
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. 2017 r. poz. 1789)	4
a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:	4
b) publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)	4
c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania - cytowania umieszczono w spisie piśmiennictwa.	6
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych).	26
5.1. Osiągnięcia naukowo – badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.	27
5.2. Osiągnięcia naukowo – badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.	28

1. Imię i Nazwisko.

Katarzyna Skonieczna

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

05.07.2005 – tytuł zawodowy licencjata biotechnologii – Zakład Genetyki; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; kierunek biotechnologia; tytuł pracy dyplomowej: Białka szoku cieplnego i homologi genów *dnaj*. Promotor: dr Grażyna Dąbrowska (obecnie dr hab.)

04.07.2007 - tytuł zawodowy magistra biotechnologii – Zakład Genetyki; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; kierunek biotechnologia; tytuł pracy dyplomowej: Influence of phosphorylation of p53 at Ser315 on post-translational modification and transcriptional activity of p53. Promotor: dr hab. Anna Goc (obecnie prof. UMK); praca badawcza wykonana w Ludwig Institute for Cancer Research; University College London, obecnie University of Oxford (Zjednoczone Królestwo Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej) pod kierunkiem prof. Xin Lu, kierownik Tumour suppression group

27.06.2012 – stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej – Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej; Katedra Medycyny Sądowej; Wydział Lekarski; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł rozprawy doktorskiej: Mutacje w mitochondrialnym DNA w nowotworach jelita grubego. Promotor: prof. dr hab. n. med. Tomasz Grzybowski

27.06.2012 – dyplom ukończenia 4-letniego programu doktorskiego w międzynarodowym Studium Medycyny Molekularnej, administrowanym przez Warszawski Uniwersytet Medyczny

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

04.10.2011 – 04.09.2013 - asystent - Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej; Katedra Medycyny Sądowej; Wydział Lekarski; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

05.09.2013 – obecnie - adiunkt - Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej; Katedra Medycyny Sądowej; Wydział Lekarski; Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

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. 2017 r. poz. 1789)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

„Zmienność genomu mitochondrialnego w raku jelita grubego w świetle wyników wielkoskalowego sekwencjonowania DNA (MPS)”

b) publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie poniżej wymienionych prac znajduje się w Załączniku nr 4. Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5. Kopie publikacji znajdują się w Załączniku nr 6.

Wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor (IF) wg JCR oraz punktację wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) dla poszczególnych artykułów podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, z wyjątkiem artykułów opublikowanych w roku 2018 oraz 2019, dla których przyjęto IF oraz punktację MNiSW, jak w roku 2017.

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem **czterech** artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR). We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem, a w trzech autorem korespondencyjnym.

1. **Katarzyna Skonieczna**, Boris Malyarchuk, Arkadiusz Jawień, Andrzej Marszałek, Zbigniew Banaszkiwicz, Paweł Jarmocik, Marcelina Borcz, Piotr Bała, Tomasz Grzybowski, 2015, Heteroplasmic substitutions in the entire mitochondrial genomes of human colon cells detected by ultra-deep 454 sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 15: 16 – 20.
IF = 4,988; MNiSW = 45

2. **Katarzyna Skonieczna**, Boris Malyarchuk, Arkadiusz Jawień, Andrzej Marszałek, Zbigniew Banaszkiwicz, Paweł Jarmocik, Tomasz Grzybowski, 2018, Mitogenomic differences between the normal and tumor cells of colorectal cancer patients. *Human Mutation*, 39: 691 – 701.
IF = 5,359; MNiSW = 40

3. **Katarzyna Skonieczna**, Arkadiusz Jawień, Andrzej Marszałek, Tomasz Grzybowski, 2019, *TP53* somatic mutations are associated with somatic mitogenome substitutions but not indels in colorectal cancer cells. *The Journal of Gene Medicine*, 21:e3063. doi: 10.1002/jgm.3063
IF = 2,524; MNiSW = 20

4. **Katarzyna Skonieczna**, Arkadiusz Jawień, Andrzej Marszałek, Tomasz Grzybowski, 2019, opublikowany online, Mitogenome germline mutations and colorectal cancer risk in Polish population. *Archives of Medical Science*, doi: <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80893>
IF = 2,344; MNiSW = 30

Sumaryczny IF osiągnięcia = 15,215

Liczba punktów MNiSW = 135

- c) **omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania** - cytowania umieszczono w spisie piśmiennictwa.

Wprowadzenie

Materiał genetyczny w postaci DNA zlokalizowany jest u człowieka nie tylko w jądrze komórkowym, ale również poza jego obszarem, na terenie mitochondriów. Ludzki genom mitochondrialny składa się z 16 569 par zasad (pz), a jego sekwencja nukleotydowa została w pełni scharakteryzowana w 1981 r. przez Andersona i wsp. [1981] oraz poprawiona przez Andrews i wsp. [1999] i od tamtej pory używana jest jako sekwencja referencyjna (numer dostępu w bazie GenBank: NC_012920), znana również pod nazwą „rCRS” (ang. revised Cambridge Reference Sequence). Genom mitochondrialny człowieka zawiera geny kodujące 13 białek łańcucha oddechowego, 22 cząsteczki tRNA oraz 2 cząsteczki rRNA (podjednostki 12S oraz 16S) [Anderson i wsp., 1981]. Region kontrolny mtDNA (tzw. pętla D) zbudowany jest z 1122 pz (pozycje 1 – 576 oraz 16024 – 16569) i zawiera najmniej stabilne ewolucyjnie pozycje w mtDNA [Anderson i wsp. 1981; van Oven i Kayser, 2009]. W pojedynczym mitochondrium znajduje się do ok. 11 cząsteczek mitochondrialnego DNA (mtDNA) [Cavelier i wsp., 2000]. W komórkach budujących różne narządy wewnętrzne człowieka obserwuje się zróżnicowaną liczbę mitochondriów [D'Erchia i wsp., 2015]. Im większe jest zapotrzebowanie energetyczne komórek tym większa jest liczba występujących w nich mitochondriów [D'Erchia i wsp., 2015]. W konsekwencji w pojedynczej komórce somatycznej liczba kopii mtDNA może wynosić nawet ok. 10 000 [za Lightowlers i wsp., 1997]. Warto przy tym zwrócić uwagę na znaczne dysproporcje w liczbie cząsteczek mtDNA znajdujących się w komórkach rozrodczych człowieka. W istocie, w dojrzałym, ludzkim oocyocie występuje ponad 100 000 kopii mtDNA [Chen i wsp., 1995], a w plemniku ok. 1000 [Diez-Sanchez i wsp., 2003]. Ta przewaga ilościowa cząsteczek mtDNA między komórkami rozrodczymi żeńskimi a męskimi jak również molekularne mechanizmy selektywnej degradacji mitochondriów obecnych w plemniku leżą u podstaw dziedziczenia mitochondrialnego DNA w linii matczynej. Odstępstwa od ww. sposobu dziedziczenia mtDNA polegające na przekazywaniu potomstwu ojcowskiego mtDNA łącznie z matczynym raportowano w bardzo nielicznych przypadkach chorób związanych z dysfunkcjami mitochondriów [Schwartz i Vissing, 2002; Luo i wsp., 2018]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że prace, w których przeprowadzono *a posteriori* filogenetyczną analizę opublikowanych już danych z tego zakresu poddają w wątpliwość wiele z tych doniesień wskazując na liczne błędy proceduralne tam zawarte (np. zanieczyszczenie próbki egzogennym

DNA, zmieszanie próbek itp.) [Bandelt i wsp., 2005; Lutz-Bonengel i Parson, 2019]. Tym samym nadal trwa ożywiona dyskusja dotycząca ewentualnej możliwości patologicznego przekazywania mtDNA dzieciom nie tylko przez matkę, ale również przez ojca [Luo i wsp., 2019; Lutz-Bonengel i Parson, 2019].

Ze względu na dużą ilość cząsteczek mtDNA w pojedynczej komórce, mutacje mogą mieć charakter homoplazmatyczny (wszystkie cząsteczki mtDNA w komórce zawierają dany wariant mtDNA) lub heteroplazmatyczny (różne cząsteczki mtDNA zawierają różne warianty sekwencji mtDNA). Należy przy tym zauważyć, że sekwencja ludzkiego mtDNA wykazuje duże zróżnicowanie w populacjach ludzkich [van Oven i Kayser, 2009]. W istocie, średnia częstość mutacji mtDNA jest ok. dziesięciokrotnie wyższa niż jądrowego DNA [Brown i wsp., 1979; 1982]. Uznaje się, że wynika to z dużej ekspozycji na reaktywne formy tlenu (RFT), braku ochrony w postaci białek histonowych oraz mniej sprawnych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA [Richter i wsp., 1988]. Na przestrzeni setek tysięcy lat częste zmiany w sekwencji mtDNA, utrwały się w określonych subpopulacjach i tworzyły coraz to nowe linie „rodowe”. Tym samym, obserwowane w dzisiejszych czasach haplotypy mtDNA (sekwencje z zidentyfikowanymi zmianami nukleotydowymi) charakteryzujące się obecnością specyficznego panelu mutacji oddziedziczonych od wspólnego przodka tworzą monofiletyczne grupy, tzw. haplogrupy lub kłady.

Pierwsze doniesienia dotyczące heteroplazmii ludzkiego mtDNA ukazały się około 30 lat temu i wskazywały na obecność mutacji heteroplazmatycznych u osób z zespołem MERRF (ang. Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) czy mitochondrialnymi miopatiami [Holt i wsp., 1988; Wallace i wsp., 1988]. Wraz z upowszechnieniem i zautomatyzowaniem techniki sekwencjonowania dideoksy wzrastała liczba prac opisujących zjawisko heteroplazmii w ludzkim mitochondrialnym DNA. Liczne badania wskazały na obecność wariantów heteroplazmatycznych nie tylko u pacjentów, u których zdiagnozowano choroby mitochondrialne, ale również u osób zdrowych zasiedlających różne regiony geograficzne [Crespillo i wsp., 2000; Tagliabracci i wsp., 2001; Vanecek i wsp., 2004; Santos i wsp., 2008; Irwin i wsp., 2009]. W znakomitej większości badania koncentrowały się na bardzo niewielkim fragmencie regionu kontrolnego, stanowiącym zaledwie ok. 6% całego genomu mitochondrialnego. Jedno z największych tego typu badań, przeprowadzone na ponad 5000 osób z ogólnej populacji ludzkiej wykazało, że heteroplazmatyczne substytucje występują w regionie kontrolnym mtDNA z częstością ok. 6%, natomiast polimorfizm długości fragmentów powtórzonych z częstością ok. 52% (z czego ok. 87% dotyczyło regionu pomiędzy nukleotydami 303 – 309) [Irwin i wsp., 2009]. Heteroplazmatyczne substytucje obserwowane

były w 114 z 1122 przeanalizowanych pozycjach mitochondrialnego regionu kontrolnego [Irwin i wsp., 2009]. Najczęściej notowane były w wysoce niestabilnej pozycji 16093 (dot. 0,8% wszystkich analizowanych osób), natomiast zmienność w łącznie 48 pozycjach mtDNA obserwowano niezależnie u co najmniej dwóch osób [Irwin i wsp., 2009]. W znakomitej większości przypadków (ok. 90%) były to heteroplazmatyczne tranzycje [Irwin i wsp., 2009]. U przeważającej liczby osób (ok. 97%) heteroplazmatyczne substytucje obserwowane były tylko w jednej pozycji nukleotydowej [Irwin i wsp., 2009]. Należy przy tym zaznaczyć, że heteroplazmia występowała poza miejscami specyficznymi dla haplogrupy, do której zaklasyfikowano haplotyp danej osoby [Irwin i wsp., 2009].

Z uwagi na wysokie koszty badań analiza spektrum heteroplazmii w pełnych genomach mitochondrialnych podejmowana była sporadycznie. Jedno z takich badań przeprowadzono na 101 niespokrewnionych, zdrowych osobach z populacji hiszpańskiej [Ramos i wsp., 2013]. Heteroplazmatyczne substytucje stwierdzono u ok. 24%, natomiast delecje lub insercje u ok. 49% osób [Ramos i wsp., 2013]. Poza dwiema zmianami (w pozycjach 152 oraz 16189) heteroplazmatyczne substytucje występowały w różnych miejscach w mtDNA [Ramos i wsp., 2013]. Większość (ok. 72%) dotyczyła pozycji zlokalizowanych w regionie kodującym [Ramos i wsp., 2013]. Heteroplazmatyczne zmiany w długości sekwencji obserwowano w 7 różnych regionach w mtDNA, przy czym w znakomitej większości przypadków (ok. 95%) występowały one w regionie kontrolnym [Ramos i wsp., 2013].

Należy jednak zauważyć, że analizy zmian heteroplazmatycznych prowadzone przy użyciu sekwencjonowania dideoksy, ograniczone są do detekcji wariantu mniejszościowego na poziomie nie mniejszym niż 10% [Irwin i wsp., 2009]. Tymczasem postęp w technologii sekwencjonowania jaki dokonał się w ciągu ostatniej dekady umożliwił równoległą analizę milionów sekwencji DNA w tym samym czasie [Harismendy i wsp., 2009]. Dzięki wielkoskalowemu sekwencjonowaniu (ang. Massively Parallel Sequencing, MPS) znacznie wzrosła czułość detekcji wariantów mniejszościowych. W istocie, poprzez zastosowanie odpowiednio dużego pokrycia sekwencji DNA w analizie za pomocą MPS możliwe stało się wykrycie wariantów nukleotydowych znajdujących się na poziomie znacznie poniżej 10%, tj. czułości detekcji tradycyjnego sekwencjonowania dideoksy [Irwin i wsp., 2009]. W konsekwencji nowoczesna technologia MPS znalazła wykorzystanie w genetyce medycznej, do identyfikacji mutacji somatycznych w mtDNA na poziomie nieuchwytnym przez tradycyjne sekwencjonowanie [He i wsp., 2010; Avital i wsp., 2012; Ju i wsp., 2014; McMahon i LaFramboise, 2014]. Jedno z pierwszych doniesień wykorzystujących MPS koncentrowało się wokół spektrum mutacji w mtDNA w raku jelita grubego (RJG), w którym możliwa była

detekcja wariantu mniejszościowego już na poziomie ok. 1,6% [He i wsp., 2010]. W wyniku ww. badań zaobserwowano liczne warianty mniejszościowe nie tylko w komórkach zmienionych nowotworowo, ale również w pełnych genomach mitochondrialnych komórek niezmiennych chorobowo uzyskanych od wszystkich dziesięciu pacjentów [He i wsp., 2010]. Doniesienia te zostały jednak zakwestionowane przez międzynarodowe środowisko ekspertów z dziedziny genetyki populacyjnej i filogenetyki. Przeprowadzona *a posteriori* analiza filogenetyczna haplotypów opublikowanych przez He i wsp. [2010] wykazała brak w każdym z nich wielu mutacji diagnostycznych dla znanych haplogrup mtDNA [Bandelt i Salas 2012, Skonieczna i wsp., 2012]. Tym samym jednoznacznie udowodniono, że dane opublikowane przez He i wsp. [2010] obarczone są mankamentami [Bandelt i Salas 2012, Skonieczna i wsp., 2012]. Kolejne próby zaimplementowania MPS do ustalania haplotypów ludzkiego mtDNA również wskazywały na powszechność występowania heteroplazmii mtDNA u osób zdrowych. W szczególności, analiza MPS pozwalająca wykryć wariant mniejszościowy już na poziomie 1%, które uzyskano w ramach „1000 Genomes Project” wykazała obecność mutacji heteroplazmatycznych u ok. 90% osób badanych [Ye i wsp., 2014]. Szczególnie intrygującym wynikiem analiz przeprowadzonych przez Ye i wsp. [2014] była obserwacja bardzo dużej liczby wariantów heteroplazmatycznych zidentyfikowanych u pojedynczych osób. Dla przykładu, u jednego z uczestników projektu „1000 Genomes Project” zidentyfikowano aż 71 mutacji heteroplazmatycznych [Ye i wsp., 2014]. Jednakże wnikliwa analiza danych opublikowanych przez Ye i wsp. [2014], która została przeprowadzona w oparciu o wiedzę z zakresu filogenezy ludzkiego mitochondrialnego DNA jednoznacznie wykazała szereg błędów, zwłaszcza kontaminacji próbek egzogennym materiałem genetycznym [Just i wsp., 2014]. Tym samym, również wyniki badań Ye i wsp. [2014] zostały podważone, a międzynarodowe środowisko specjalistów z zakresu genetyki populacyjnej i sądowej wskazało jednoznacznie na **konieczność zdefiniowania właściwych, optymalnych kryteriów analizy, które zapewniłyby wysoką jakość otrzymanych danych MPS** i umożliwiłyby detekcję wariantów mniejszościowych w mtDNA na bardzo niskim poziomie [Bandelt i Salas 2012, Just i wsp., 2014].

Należy zauważyć, że heteroplazmia mtDNA ma ogromne znaczenie interpretacyjne w genetyce medycznej (przy rozpoznawaniu oraz leczeniu chorób mitochondrialnych) [za Schon i wsp., 1997; Rossignol i wsp., 2003; Wallace, 2005], jak również w genetyce sądowej (do formułowania wniosków w postępowaniach procesowych np. z zakresu indywidualizacji śladów biologicznych czy identyfikacji osób) [za Carracedo i wsp., 2000; Parson i wsp., 2014]. Tym samym **niezwykle ważnym jest ustalenie i charakterystyka rzeczywistego spektrum**

mutacji heteroplazmatycznych występujących w mtDNA osób zdrowych, niezbędnego do poprawnego wnioskowania w zakresie genetyki medycznej czy sądowej.

Heteroplazmia mtDNA w komórkach somatycznych może być odziedziczona lub powstać „*de novo*”. Wcześniejsze badania wykazały, że w komórkach macierzystych nabłonka jelita grubego, pobranych z fragmentów tkanek niezmiennych chorobowo od kilku pacjentów z nowotworem jelita grubego często zostają wprowadzone „*de novo*” mutacje (zarówno homoplazmatyczne jak i heteroplazmatyczne) w mtDNA, które następnie zostają przekazane komórkom potomnym budującym krypty jelita grubego [Taylor i wsp., 2003; Greaves i wsp., 2006]. Tym, samym można oczekiwać, że mutacje heteroplazmatyczne będą często obserwowane w mtDNA komórek nabłonka jelita grubego. Jednocześnie fragmenty tkanek jelita grubego wydają się być doskonałym materiałem do analizy wariantów mniejszościowych w mtDNA i tym samym do walidacji metody MPS. **Należy przy tym zauważyć, że nieznanym pozostaje spektrum mutacji heteroplazmatycznych w komórkach jelita grubego.** W istocie, badania mtDNA krypt jelitowych niezmiennych chorobowo były do tej pory prowadzone na próbkach uzyskanych od zaledwie kilku osób [Taylor i wsp., 2003; Greaves i wsp., 2006].

Ze względu na potrzebę scharakteryzowania spektrum mutacji heteroplazmatycznych w pełnych genomach mitochondrialnych z możliwie największą czułością detekcji wariantów mniejszościowych, po raz pierwszy przeprowadzone zostały badania na niezmiennych chorobowo fragmentach tkanek jelita grubego z wykorzystaniem technologii MPS, które zostały zaprezentowane w pracy nr 1 cyklu wykazanego jako osiągnięcie naukowe.

Praca nr 1 (*Forensic Sci Int Genet.* 2015; 15:16-20)

Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach pracy nr 1 było zoptymalizowanie jednej z metod MPS (sekwencjonowania 454) oraz scharakteryzowanie spektrum mutacji heteroplazmatycznych w pełnych genomach mitochondrialnych komórek jelita grubego. Badania zostały przeprowadzone na niezmiennych nowotworowo fragmentach tkanek jelita grubego (co potwierdzono za pomocą analizy histopatologicznej), które zabezpieczono od 50 pacjentów z rakiem jelita grubego (RJG) z populacji polskiej. Pełne genomy mitochondrialne zostały zamplifikowane zgodnie z protokołem Fendt i wsp. [2009], a ich sekwencja została ustalona z wykorzystaniem sekwencjonowania 454 przy użyciu odczynników z serii Titanium (Roche Diagnostics) na instrumencie Genome Sequencer FLX (Roche Diagnostics). Średnie pokrycie każdej pozycji nukleotydowej wynosiło około 1591 razy. Warianty mniejszościowe w mtDNA ustalone z wykorzystaniem metody 454 identyfikowano, gdy zmieniony nukleotyd występował w co najmniej dwudziestu unikalnych odczytach, a co najmniej 35% z wszystkich

odczytów dla wariantu mniejszościowego było z nici wiodącej lub opóźnionej. Ponadto warianty mniejszościowe wskazywano, gdy stosunek odczytów z nici wiodącej do opóźnionej nie różnił się statystycznie od tego skalkulowanego dla wariantu większościowego. Przytoczone wyżej kryteria analizy bioinformatycznej umożliwiły wskazanie wszystkich zmian heteroplazmatycznych na poziomie powyżej 10%, które zostały potwierdzone poprzez resekwencjonowanie dideoksy. Tym samym, pozytywnie zweryfikowano poprawność laboratoryjnej procedury ustalania sekwencji mtDNA z wykorzystaniem metody 454 oraz przyjętych kryteriów diagnostyki wariantów mniejszościowych. Dzięki **zastosowaniu metody wiarygodnego, wysokoprzepustowego sekwencjonowania 454, zoptymalizowanego po raz pierwszy dla całego mtDNA w ramach pracy nr 1 możliwe stało się wskazanie autentycznych wariantów mniejszościowych już na poziomie ok. 1%**. Poprawność sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych ustalonych z wykorzystaniem zoptymalizowanej metody 454 została potwierdzona w wyniku analizy filogenetycznej.

Zoptymalizowana metoda sekwencjonowania 454 została następnie wykorzystana do **przeprowadzenia po raz pierwszy analizy spektrum mutacji heteroplazmatycznych w mtDNA komórek niezmiennych nowotworowo jelita grubego** uzyskanych od 50 pacjentów z RJG. Zidentyfikowane w ramach pracy nr 1 warianty mniejszościowe stanowiły od ok. 2% do ok. 43% wariantu większościowego, a aż ponad połowy z nich (ok. 57%) nie można było wykryć za pomocą tradycyjnego sekwencjonowania dideoksy (stanowiły mniej niż 10% wariantu większościowego). Przeprowadzone badania wykazały, że **heteroplazmatyczne substytucje (wszystkie w postaci tranzycji) w niezmiennych chorobowo komórkach jelita grubego występują u ok. 32% osób z badanej populacji i lokalizują w różnych pozycjach genomu mitochondrialnego**. W większości (ok. 63%) w pojedynczej próbce identyfikowano jedną heteroplazmatyczną substytucję. Największą liczbę pozycji z wariantami mniejszościowymi, w postaci trzech heteroplazmatycznych substytucji zaobserwowano w jednej próbce (ok. 2%). Heteroplazmatyczne substytucje lokalizowały z podobną częstością w regionie kontrolnym co kodującym (odpowiednio 57% i 43%). **Znakomita większość (ok. 78%) z heteroplazmatycznych substytucji lokalizowała w pozycjach zmiennych, znanych w filogenezie ludzkiego mtDNA, a żadna z nich nie występowała w bazach danych wariantów zasocjowanych z chorobami mitochondrialnymi**.

Podsumowując, w pracy nr 1 zoptymalizowano protokół sekwencjonowania 454 dla pełnych genomów mitochondrialnych i zdefiniowano optymalne kryteria analizy zapewniające wysoką jakość otrzymanych danych MPS. **Podkreśleniem metodycznych walorów pracy jest fakt opublikowania wyników w Forensic Science International: Genetics, czasopiśmie z listy**

JCR najwyżej notowanym w zakresie nauk sądowych, które w sposób szczególnie wyraźny akcentuje konieczność zachowania najwyższych standardów analizy mtDNA, ze względu na możliwe aplikacje dla celów sądowych. Ponadto, zoptymalizowana metoda 454 pozwoliła wykryć warianty mniejszościowe w mtDNA już na poziomie ok. 1% i ustalić wiarygodne spektrum heteroplazmatycznych substytucji w pełnych genomach mitochondrialnych niezmiennych chorobowo komórek jelita grubego.

Praca nr 2 (*Hum Mutat.* 2018; 39: 691-701)

Badania zmienności genomu jądrowego w komórkach nowotworowych wykazały, że niektóre dziedziczne typy nowotworów są związane z mutacjami w genach kodujących białka mitochondrialne [za Brandon i wsp., 2006]. Późniejsze prace wskazały także na obecność licznych mutacji somatycznych w mitochondrialnym DNA (mtDNA) w raku jelita grubego [He i wsp., 2010]. Jednak dokonana wybiórczo ocena ich autentyczności wykazała liczne błędy zasygnalizowane we wcześniejszej części autoreferatu [Bandelt i Salas 2012, Skonieczna i wsp., 2012]. Pozostawało niejasnym, czy w trakcie karcynogenezy dochodzi do zmian w sekwencji mtDNA? Brak rzetelnych danych dotyczących zmienności sekwencji mitochondrialnego DNA w raku jelita grubego stał się przyczynkiem do podjęcia badań już w ramach mojej rozprawy doktorskiej [Skonieczna, 2012]. W ww. pracy badaniu zostało poddanych 50 pacjentów z RJG, jednakże sekwencje mtDNA zostały ustalone z wykorzystaniem tradycyjnego sekwencjonowania metodą dideoksy. Mutacje somatyczne w mtDNA, z których znakomita większość (ok. 90%) obserwowana była w stanie heteroplazmatycznym zostały wykryte u 35 pacjentów [Skonieczna, 2012]. Po przeprowadzeniu badań w ramach pracy nr 1 z niniejszego cyklu publikacji jasnym stało się, że mniejszościowe warianty heteroplazmatyczne (stanowiące mniej niż 10% wariantu większościowego) mogły nie zostać wykryte metodą dideoksy w ramach badań zaprezentowanych w mojej rozprawie doktorskiej - nie tylko w niezmiennych chorobowo komórkach jelita grubego (ok. 57% mutacji heteroplazmatycznych), ale również w komórkach RJG. Tym samym **autentyczne spektrum mutacji somatycznych w mtDNA w raku jelita grubego pozostawało nadal nieznanne**. W związku z tym, podjęte zostały nowe badania nad zmiennością sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych w raku jelita grubego wykorzystujące zoptymalizowaną w ramach pracy nr 1 metodę wysokoprzepustowego sekwencjonowania 454.

Głównym celem analiz opublikowanych w ramach pracy nr 2 było ustalenie spektrum mutacji somatycznych w pełnych genomach mitochondrialnych jelita grubego oraz zbadanie na podstawie analiz *in silico* ich potencjalnego zaangażowania w karcynogenezę. Badaniem

objęto 100 pacjentów z rakiem jelita grubego zrekrutowanych z populacji polskiej. Sekwencje pełnych genomów mitochondrialnych ustalone zostały metodą 454, a ich poprawność została potwierdzona z wykorzystaniem metod filogenetycznych. Czułość detekcji wariantu mniejszościowego w mtDNA wynosiła ok. 1%. Na podstawie porównań haplotypów całych genomów mitochondrialnych ustalonych dla tkanki niezmienionej i zmienionej nowotworowo indywidualnego pacjenta wskazano mutacje somatyczne. Somatyczne zmiany w długości sekwencji mtDNA (insercje lub delecje, określane jako „indel”) występowały u 45% pacjentów z RJG. W większości (ok. 89% przypadków) zmiany te lokalizowały w regionie powtórzeń cytozyny pomiędzy nukleotydami 303 – 315 (tzw. regionie D310). Z kolei, obecność łącznie 148 somatycznych substytucji w mtDNA stwierdzono u 76% pacjentów z rakiem jelita grubego. **Somatyczne substytucje lokalizowały w różnych pozycjach w genomie mitochondrialnym**, i tylko zaledwie ok. 7% z nich występowała niezależnie u dwóch pacjentów z RJG. Przeważająca większość (ok. 96%) mutacji somatycznych w mtDNA komórek RJG występowała w postaci zmian heteroplazmatycznych. Ponad 23% z nich charakteryzowała się obecnością wariantu mniejszościowego na poziomie poniżej 10%, tj. granicy detekcji tradycyjnego sekwencjonowania dideoksy. **Około połowa z heteroplazmatycznych substytucji (~47%) występowała poza miejscami polimorficznymi ludzkiego mtDNA, a ok. 53% występowało w bazach danych pozycji zasocjowanych z chorobami mitochondrialnymi.** Somatyczne substytucje (ok. 94% transycje i ok. 6% transwersje) w mtDNA komórek RJG lokalizowały głównie w regionie kodującym (ok. 81%). Ok. 53% z wszystkich somatycznych substytucji występowało w mitochondrialnych genach kodujących białka, ok. 18% w genach rRNA, a ok. 10% w genach tRNA. Ok. 75% z mutacji somatycznych zlokalizowanych w genach kodujących białka prowadziła do zmian w sekwencji aminokwasowej i większość z nich (ok. 70%) dotyczyła wysoce stabilnych ewolucyjnie pozycji w polipeptydzie. **Somatyczne mutacje niesynonimiczne w znakomitej większości (ok. 73%) charakteryzowały się współczynnikiem patogeniczności wyższym niż ten oszacowany dla mutacji zasocjowanych z chorobami mitochondrialnymi, sugerując ich potencjalnie szkodliwy wpływ na metabolizm komórki.**

Pomimo potencjalnie patogennego wpływu mutacji somatycznych w mtDNA (w szczególności substytucji w regionie kodującym) zidentyfikowanych w RJG, analizy statystyczne wykazały **brak związku pomiędzy ich obecnością, a cechami klinicznymi pacjentów, takimi jak stadium zaawansowania choroby (wg. klasyfikacji TNM), czy przerzuty do węzłów chłonnych.** Ponadto, zaobserwowano brak istotnych statystycznie

zależności pomiędzy obecnością somatycznych mutacji (substytucji lub zmian typu indel) w mtDNA a wiekiem, płcią czy lokalizacją guza w jelicie grubym.

Analiza wzorca mutacji somatycznych w mtDNA komórek raka jelita grubego sugeruje, że **mogą być one wynikiem działania reaktywnych form tlenu (RFT) lub azotu (RFA)**. Z kolei, przeprowadzone testy selekcji na pełnych genomach mitochondrialnych komórek niezmiennych i zmienionych nowotworowo wykazały **osłabienie nacisku selekcji negatywnej na mtDNA komórek RJG**. W konsekwencji w komórkach raka jelita grubego można obserwować zmiany somatyczne nawet w miejscach silnie konserwowanych ewolucyjnie, których *de facto* nie obserwuje się w filogenezie ludzkiego mtDNA.

Podsumowując, analiza spektrum mutacji somatycznych w mtDNA przeprowadzona w ramach w pracy nr 2 wykazała wysoką zmienność tego materiału genetycznego w raku jelita grubego. Mutacje somatyczne w postaci zmian w długości sekwencji (mutacje typu indel) lokalizują najczęściej w regionie D310, natomiast somatyczne substytucje dotyczą różnych pozycji w genomie mitochondrialnym. Somatyczne substytucje występują najczęściej w postaci heteroplazmatycznych zmian, a ok. 23% ze zidentyfikowanych wariantów mniejszościowych można wskazać wyłącznie za pomocą sekwencjonowania MPS, gdyż znajdują się na poziomie poniżej 10%, tj. limitu detekcji tradycyjnego sekwencjonowania dideoksy. Konsekwentna analiza *in silico* somatycznych substytucji w mtDNA w RJG wskazała, że większość z nich może mieć potencjalnie szkodliwy wpływ na metabolizm komórki. Badania przeprowadzone w pracy nr 2 sugerują również, że RFT lub RFA mogą przyczyniać się do powstania somatycznych substytucji, a do ich akumulacji w mtDNA komórek RJG dochodzi na skutek osłabienia nacisku selekcji negatywnej. Ponadto wykazano, że mutacje somatyczne w mtDNA nie są zasocjowane z cechami klinicznymi pacjentów z rakiem jelita grubego z populacji polskiej.

Praca nr 3 (*J Gene Med.* 2019; 21:e3063)

Niesprawne systemy naprawy mogą spowodować, że podczas replikacji błędnie wprowadzony nukleotyd nie zostanie usunięty z nowopowstającej nici mtDNA. Tym samym, niewłaściwie funkcjonujące mechanizmy naprawy uszkodzeń w mitochondrialnym DNA mogą przyczyniać się do powstawania mutacji somatycznych w szybko dzielących się komórkach raka jelita grubego. Przeprowadzone do tej pory badania wskazują, że w mitochondriach funkcjonują proste mechanizmy naprawy mtDNA tj. systemy naprawy z wycinaniem zasad (ang. Base Excision Repair, BER) czy systemy naprawy niedopasowanych nukleotydów (ang. Mismatch Repair, MMR). Głównym enzymem uczestniczącym w replikacji i naprawie błędów w sekwencji mtDNA jest polimeraza gamma. Tym samym mutacje w genie kodującym

polimerazę gamma, które prowadziłyby do jej dezaktywacji lub osłabienia funkcji naprawy błędnie wprowadzonych nukleotydów mogłyby przyczynić się do przekazania powielanym cząsteczkom mutacji somatycznych wprowadzonych do mtDNA komórek RJG. Jednak wcześniejsze badania zmienności sekwencji genu *POLG* (kodującego polimerazę gamma) wykazały brak istotnych statystycznie zależności pomiędzy mutacjami w tym genie, a obecnością mutacji somatycznych w genomie mitochondrialnym pacjentów z RJG w populacji polskiej [Linkowska i wsp., 2015]. Badania przeprowadzone w ostatnim czasie wskazują, że jednym z białek uczestniczących w naprawie mtDNA typu BER jest p53 [Bakhanashvili i wsp., 2008]. Warto przy tym zauważyć, że mutacje w genie *TP53* (powodujące unieczynnienie kodowanego przez ten gen czynnika transkrypcyjnego p53) są jednymi z kluczowych w karcynogenezie jelita grubego i obserwuje się je w ok. 34% – 45% przypadków [za Russo i wsp., 2005]. Najczęściej (w ok. 90% przypadków) zmiany somatyczne w genie *TP53* w RJG lokalizują w eksonach 4 – 8, kodujących aminokwasy wchodzące w skład domeny wiążącej DNA [za Russo i wsp., 2005]. Można zatem zaproponować **hipotezę, że zmienność sekwencji genu *TP53* (w szczególności w regionie obejmującym eksony 4 – 8) jest związana z występowaniem mutacji somatycznych w genomach mitochondrialnych komórek raka jelita grubego.**

W związku z powyższym **głównym celem badań opublikowanych w ramach pracy nr 3** było **ustalenie sekwencji nukleotydowej fragmentu genu *TP53* obejmującego eksony 3 – 9 i zbadanie, czy jej zmienność w komórkach raka jelita grubego jest zasocjowana z występowaniem mutacji somatycznych w pełnych genomach mitochondrialnych.** Analizom poddano 67 pacjentów z RJG, dla których pełne genomy mitochondrialne ustalono w ramach pracy nr 2 wchodzącej w skład niniejszego cyklu publikacji. Do badań użyto ekstrakty DNA wykorzystane do ustalenia sekwencji mtDNA w pracy nr 2 (z badań wyłączono 33 pacjentów z RJG dla których ekstrakty DNA z tkanki zmienionej i/lub niezmienionej nowotworowo zużyto w całości w ramach wcześniejszych badań). Fragmenty DNA zawierające eksony 3 – 9 genu *TP53* zamplifikowano w trzech niezależnych reakcjach PCR i zsekwencjonowano metodą dideoksy. Analiza ustalonych fragmentów sekwencji genu *TP53* dla komórek niezmienionych nowotworowo pozwoliła zidentyfikować dziewięć dziedzicznych polimorfizmów, które nie były zasocjowane z cechami klinicznymi pacjentów z RJG (tj. lokalizacja guza w jelicie grubym, przerzuty do węzłów chłonnych, wiek czy płeć) jak również z występowaniem somatycznych substytucji i/lub zmian typu indel w mtDNA komórek RJG. U ok. 36% pacjentów zidentyfikowano 42 somatyczne mutacje w oznaczonym dla komórek raka jelita grubego fragmencie genu *TP53*. Zidentyfikowane zmiany somatyczne nie były zasocjowane z

cechami klinicznymi pacjentów tj. wiek, płeć, lokalizacja guza czy obecność przerzutów do węzłów chłonnych. Stwierdzono natomiast **istotne statystycznie zależności pomiędzy występowaniem mutacji somatycznych w oznaczonym fragmencie genu *TP53* a obecnością somatycznych substytucji, ale nie zmian typu indel w genomie mitochondrialnym komórek RJG**. W komórkach RJG zawierających mutacje somatyczne w oznaczonym fragmencie genu *TP53* (komórki *TP53mut+*) spektrum mutacji somatycznych w mtDNA było zbliżone do tego obserwowanego w komórkach RJG bez mutacji w *TP53* (komórki *TP53mut-*). Należy jednak zauważyć, że **somatyczne mutacje niesynonimiczne w mtDNA obserwowane w komórkach *TP53mut+* charakteryzowały się ponad dwukrotnie wyższym współczynnikiem patogeniczności**. Tym samym przeprowadzone w ramach pracy nr 3 badania sugerują, że mutacje somatyczne w genie *TP53* komórek raka jelita grubego mogą potencjalnie zmieniać właściwości białka p53 np. uniemożliwiając jego translokację do mitochondriów lub prowadząc do niewłaściwego funkcjonowania naprawy mtDNA typu BER. W konsekwencji wprowadzone do mtDNA błędy podczas replikacji (spowodowane np. RFT lub RFA) przyczyniają się do powstania mutacji somatycznych.

Podsumowując, w pracy nr 3 wykazano po raz pierwszy, że **obecność mutacji somatycznych (ale nie dziedzicznych) w fragmencie genu *TP53* obejmującym eksony 3 – 9 jest zasocjowana z występowaniem somatycznych substytucji, ale nie zmian typu indel w mtDNA komórek raka jelita grubego**.

Praca nr 4 (*Arch Med Sci.* 2019, opublikowany online;

<https://doi.org/10.5114/aoms.2018.80893>)

Analizy genetyczne, w tym badania asocjacyjne w skali genomu (ang. Genome-Wide Association Study, GWAS) pozwoliły wskazać ok. 100 wariantów nukleotydowych zlokalizowanych w jądrowym DNA, których występowanie zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego [za Peters i wsp., 2015; Schmit, i wsp., 2018; Huyghe i wsp., 2019]. Obecność ww. wariantów obserwuje się zaledwie u ok. 16% pacjentów z RJG [za Peters i wsp., 2015]. Warto zauważyć, że białka kodowane przez geny mitochondrialne mogą mieć potencjalnie wpływ na przebieg procesów istotnych dla rozwoju raka, tj. produkcja RFT, czy programowana śmierci komórki (apoptoza) [za Brandon i wsp., 2006]. W związku z tym **istotnym było podjęcie badań zmierzających do ustalenia czy dziedziczne warianty w mtDNA mogą mieć wpływ na ryzyko rozwoju raka jelita grubego?** Wcześniejsze analizy z tego zakresu dotyczyły wybranych pozycji nukleotydowych, które stanowiły zaledwie ok. 10% całej cząsteczki genomu mitochondrialnego i często prowadziły do sprzecznych konkluzji [Webb i wsp., 2008; Li i wsp., 2015; Mohammed i wsp., 2015; Guo i wsp., 2016; Govatati i

wsp., 2017; Kumar i wsp., 2017]. Należy przy tym zauważyć, że w żadnej z ww. prac nie zastosowano się do międzynarodowych rekomendacji wskazanych przez ekspertów i dotyczących analiz asocjacji pomiędzy dziedzicznymi mutacjami w mtDNA, a występowaniem jednostek chorobowych [Zhang i wsp., 2011; Wang i wsp., 2012; Zhang i wsp., 2014; Bi i wsp., 2015; Fachal i wsp., 2015; Salas i Elson, 2015]. Tym samym, nie można wykluczyć, że ww. badania asocjacyjne mtDNA w RJG zawierają podobne błędy, jak te wskazane w przypadku raka piersi [Salas i wsp., 2014]. Koniecznym zatem było podjęcie nowych badań obejmujących analizę asocjacji pomiędzy mutacjami dziedzicznymi w pełnych genomach mitochondrialnych a RJG, która zostałaby przeprowadzona zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi.

W związku z powyższym głównym celem analiz podjętych w pracy nr 4 było zbadanie czy dziedziczne mutacje w pełnych genomach mitochondrialnych lub przynależność haplogrupowa są zasocjowane z występowaniem raka jelita grubego w populacji polskiej. Analizom statystycznym poddano sto pacjentów z rakiem jelita grubego (grupa badana) oraz sto osób zdrowych (grupa kontrolna I), dla których wiarygodne sekwencje pełnych genomów mitochondrialnych (co potwierdziła analiza filogenetyczna) ustalono w toku wcześniejszych badań [odpowiednio Skonieczna i wsp., 2018 oraz Malyarchuk i wsp., 2017]. Zarówno grupa badana jak i kontrolna obejmowała osoby z populacji polskiej, pochodzące z regionu Kujawsko – Pomorskiego. Ponadto dla celów porównawczych wykorzystano również haplotypy regionu kontrolnego mtDNA ustalone i poprawnie zweryfikowane za pomocą narzędzi filogenetycznych w toku wcześniejszych badań [Grzybowski i wsp. 2007; Malyarchuk i wsp., 2002; Malyarchuk i wsp., 2017; Mielnik-Sikorska i wsp., 2013] dla łącznie 1353 osób z populacji polskiej (grupa kontrolna II). Osoby ujęte w grupie kontrolnej II zrekrutowano z populacji: okolic Pomorza Gdańskiego, Kujawsko – Pomorskiego, Kaszub, Suwalszczyzny, Podhala oraz Górnego Śląska [Grzybowski i wsp. 2007; Malyarchuk i wsp., 2002; Malyarchuk i wsp., 2017; Mielnik-Sikorska i wsp., 2013]. Analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA) na poziomie głównych haplogrup mtDNA wykazała brak ukrytego rozwarstwienia w populacji polskiej. Przeprowadzone badania pełnych genomów mitochondrialnych pozwoliły zidentyfikować 605 pozycji polimorficznych. W 128 pozycjach obserwowana zmienność nukleotydowa w mtDNA osób z grupy kontrolnej I oraz grupy badanej występowała z częstością powyżej 4%. Porównanie częstości alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną I wykazało, że tymina w pozycjach 12705 oraz 16223 występowała ok. czterokrotnie częściej u osób z populacji kontrolnej niż u pacjentów z RJG (odpowiednio $p = 0,0052$ oraz $p = 0,0046$). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie po zastosowaniu poprawki Bonferroniego ($p_B = 1,000$ dla obydwu porównań), co w przypadku pozycji 16223

zostało potwierdzone również na podstawie analiz względem grupy kontrolnej II ($p = 0,0489$ oraz $p_B = 1,000$). Częstości alleli w pozostałych pozycjach polimorficznych w mtDNA nie różniły się istotnie statystycznie. Z kolei analiza częstości haplogrup wykazała, że klad R występował istotnie statystycznie częściej w populacji pacjentów z RJG niż w ogólnej populacji polskiej ($p = 0,0066$ względem grupy kontrolnej I oraz $p = 0,0387$ względem grupy kontrolnej II). Jednak zastosowanie poprawki Bonferroniego wykazało brak asocjacji pomiędzy przynależnością do makrohaplogrupy R, a występowaniem RJG (odpowiednio $p = 0,4644$ oraz $0,0792$). Częstości pozostałych kładów mtDNA nie różniły się istotnie statystycznie. Warto przy tym zwrócić uwagę, że większość osób z grupy kontrolnej, których zaklasyfikowano do haplogrup innych niż klad R należało do różnych, pozaeuropejskich linii mtDNA. Ponadto częstość występowania pojedynczej linii (wśród których występowały klady typowe dla Afryki czy Azji) nie dominowała nad innymi. Na uwagę zasługuje fakt, że częstość zachorowania na RJG jest niższa w krajach afrykańskich czy azjatyckich niż europejskich [Arnold i wsp., 2017]. Tym samym, uzyskane w ramach pracy nr 4 wyniki badań mogą sugerować, że inne czynniki niż dziedziczna zmienność sekwencji mtDNA (w tym mutacje dziedziczne w DNA jądrowym) mają wpływ na ryzyko zachorowania na RJG.

Przeprowadzone analizy wykazały również brak istotnych statystycznie różnic w częstości alleli (w 99 pozycjach polimorficznych) i haplogrup mtDNA a występowaniem mutacji somatycznych (substytucji i lub zmian typu indel) w mtDNA lub cech klinicznych pacjentów z RJG tj. wiek, płeć, lokalizacja guza w jelicie grubym czy przerzuty do węzłów chłonnych.

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych po raz pierwszy na pełnych genomach mitochondrialnych w ramach pracy nr 4 sugerują, że **zarówno haplogrupy oraz dziedziczne mutacje w mtDNA nie są zasocjowane z występowaniem raka jelita grubego w populacji polskiej**. Uzyskane wyniki badań sugerują także, że **zarówno haplogrupy jak i dziedziczne mutacje w mtDNA nie są związane z występowaniem cech klinicznych pacjentów z RJG lub mutacji somatycznych w mtDNA**. Jednak, ze względu na stosunkowo niewielką liczebność badanych grup należałoby przeprowadzić dalsze analizy walidacyjne na większych populacjach osób zdrowych oraz pacjentów z RJG, aby ostatecznie zweryfikować czy mutacje dziedziczne w mtDNA są zasocjowane w rakiem jelita grubego w populacji polskiej.

Piśmiennictwo

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981; 290: 457 – 465.

- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999; 23: 147.
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017; 66: 683 – 691.
- Avital G, Buchshtav M, Zhidkov I, Tuval Feder J, Dadon S, Rubin E, Glass D, Spector TD, Mishmar D. Mitochondrial DNA heteroplasmy in diabetes and normal adults: role of acquired and inherited mutational patterns in twins. *Hum Mol Genet.* 2012; 21: 4214 – 424.
- Bakhanashvili M, Grinberg S, Bonda E, Simon AJ, Moshitch-Moshkovitz S, Rahav G. p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 1865 – 1874.
- Bandelt HJ, Kong QP, Parson W, Salas A. More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA? *J Med Genet.* 2005; 42: 957 – 960.
- Bandelt HJ, Salas A. Current next generation sequencing technology may not meet forensic standards. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6: 143 – 145.
- Bi R, Zhang W, Yu D, Li X, Wang HZ, Hu QX, Zhang C, Lu W, Ni J, Fang Y, Li T, Yao YG. Mitochondrial DNA haplogroup B5 confers genetic susceptibility to Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurobiol Aging.* 2015; 36:1604.e7-16.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene.* 2006; 25: 4647 – 4662.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 1967 – 1971.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol.* 1982; 18: 225 – 239.
- Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int.* 2000; 110: 79 – 85.
- Cavelier L, Johannisson A, Gyllensten U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res.* 2000; 259: 79 – 85.
- Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 239 – 247.

- Crespillo M, Luque JA, Paredes M, Fernández R, Ramírez E, Valverde JL. Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *Int J Legal Med.* 2000; 114: 130 – 132.
- D'Erchia AM, Atlante A, Gadaleta G, Pavesi G, Chiara M, De Virgilio C, Manzari C, Mastropasqua F, Prazzoli GM, Picardi E, Gissi C, Horner D, Reyes A, Sbisà E, Tullo A, Pesole G. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion* 2015; 20: 13 – 21.
- Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Montoya J, Pérez-Martos A, Enríquez JA, López-Pérez MJ. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003; 68: 180 – 185.
- Fachal L, Mosquera-Miguel A, Pastor P, Ortega-Cubero S, Lorenzo E, Oterino-Durán A, Toriello M, Quintáns B, Camiña-Tato M, Sesar A, Vega A, Sobrido MJ, Salas A. No evidence of association between common European mitochondrial DNA variants in Alzheimer, Parkinson, and migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015; 168B: 54 – 65.
- Fendt L, Zimmermann B, Daniaux M, Parson W. Sequencing strategy for the whole mitochondrial genome resulting in high quality sequences. *BMC Genomics.* 2009; 10: 139.
- Govatati S, Saradamma B, Malempati S, Dasi D, Thupurani MK, Nagesh N, Shivaji S, Bhanoori M, Tamanam RR, Nallanchakravarthula V, Pasupuleti SR. Association of mitochondrial displacement loop polymorphisms with risk of colorectal cancer in south Indian population. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2017; 28: 632 – 637.
- Greaves LC, Preston SL, Tadrous PJ, Taylor RW, Barron MJ, Oukrif D, Leedham SJ, Deheragoda M, Sasieni P, Novelli MR, Jankowski JA, Turnbull DM, Wright NA, McDonald SA. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 714 – 719.
- Grzybowski T, Malyarchuk BA, Derenko MV, Perkova MA, Bednarek J, Woźniak M. Complex interactions of the Eastern and Western Slavic populations with other European groups as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1: 141 – 117.
- Guo Z, Zhao S, Fan H, Du Y, Zhao Y, Wang G. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for colon cancer. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2016; 27: 4244 – 4245.

- Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY, Schork NJ, Murray SS, Topol EJ, Levy S, Frazer KA. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* 2009; 10: R32.
- He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature.* 2010; 464: 610 – 614.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988; 331: 717 – 719.
- Huyghe JR, Bien SA, Harrison TA, Kang HM, Chen S, Schmit SL, Conti DV, Qu C, Jeon J, Edlund CK, Greenside P, Wainberg M, Schumacher FR, Smith JD, Levine DM, Nelson SC, Sinnott-Armstrong NA, Albanes D, Alonso MH, Anderson K, Arnau-Collell C, Arndt V, Bamia C, Banbury BL, Baron JA, Berndt SI, Bézieau S, Bishop DT, Boehm J, Boeing H, Brenner H, Brezina S, Buch S, Buchanan DD, Burnett-Hartman A, Butterbach K, Caan BJ, Campbell PT, Carlson CS, Castellví-Bel S, Chan AT, Chang-Claude J, Chanock SJ, Chirlaque MD, Cho SH, Connolly CM, Cross AJ, Cuk K, Curtis KR, de la Chapelle A, Doheny KF, Duggan D, Easton DF, Elias SG, Elliott F, English DR, Feskens EJM, Figueiredo JC, Fischer R, FitzGerald LM, Forman D, Gala M, Gallinger S, Gauderman WJ, Giles GG, Gillanders E, Gong J, Goodman PJ, Grady WM, Grove JS, Gsur A, Gunter MJ, Haile RW, Hampe J, Hampel H, Harlid S, Hayes RB, Hofer P, Hoffmeister M, Hopper JL, Hsu WL, Huang WY, Hudson TJ, Hunter DJ, Ibañez-Sanz G, Idos GE, Ingersoll R, Jackson RD, Jacobs EJ, Jenkins MA, Joshi AD, Joshi CE, Keku TO, Key TJ, Kim HR, Kobayashi E, Kolonel LN, Kooperberg C, Kühn T, Küry S, Kweon SS, Larsson SC, Laurie CA, Le Marchand L, Leal SM, Lee SC, Lejbkowitz F, Lemire M, Li CI, Li L, Lieb W, Lin Y, Lindblom A, Lindor NM, Ling H, Louie TL, Männistö S, Markowitz SD, Martín V, Masala G, McNeil CE, Melas M, Milne RL, Moreno L, Murphy N, Myte R, Naccarati A, Newcomb PA, Offit K, Ogino S, Onland-Moret NC, Pardini B, Parfrey PS, Pearlman R, Perduca V, Pharoah PDP, Pinchev M, Platz EA, Prentice RL, Pugh E, Raskin L, Rennert G, Rennert HS, Riboli E, Rodríguez-Barranco M, Romm J, Sakoda LC, Schafmayer C, Schoen RE, Seminara D, Shah M, Shelford T, Shin MH, Shulman K, Sieri S, Slattery ML, Southey MC, Stadler ZK, Stegmaier C, Su YR, Tangen CM, Thibodeau SN, Thomas DC, Thomas SS, Toland AE, Trichopoulos A, Ulrich CM, Van Den Berg DJ, van Duijnhoven FJB, Van Guelpen B, van Kranen H, Vijai J, Visvanathan K, Vodicka P, Vodickova L, Vymetalkova V, Weigl K, Weinstein SJ, White E, Win AK, Wolf CR, Wolk A, Woods MO, Wu AH, Zaidi SH, Zanke BW, Zhang Q,

- Zheng W, Scacheri PC, Potter JD, Bassik MC, Kundaje A, Casey G, Moreno V, Abecasis GR, Nickerson DA, Gruber SB, Hsu L, Peters U. Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer. *Nat Genet.* 2019; 51: 76 – 87.
- Irwin JA, Saunier JL, Niederstätter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, Brandstätter A, Parson W, Parsons TJ. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol.* 2009; 68: 516 – 527.
- Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, Davies HR, Papaemmanuil E, Gundem G, Shlien A, Bolli N, Behjati S, Tarpey PS, Nangalia J, Massie CE, Butler AP, Teague JW, Vassiliou GS, Green AR, Du MQ, Unnikrishnan A, Pimanda JE, Teh BT, Munshi N, Greaves M, Vyas P, El-Naggar AK, Santarius T, Collins VP, Grundy R, Taylor JA, Hayes DN, Malkin D; ICGC Breast Cancer Group; ICGC Chronic Myeloid Disorders Group; ICGC Prostate Cancer Group, Foster CS, Warren AY, Whitaker HC, Brewer D, Eeles R, Cooper C, Neal D, Visakorpi T, Isaacs WB, Bova GS, Flanagan AM, Futreal PA, Lynch AG, Chinnery PF, McDermott U, Stratton MR, Campbell PJ. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife.* 2014; 3: e02935.
- Just RS, Irwin JA, Parson W. Questioning the prevalence and reliability of human mitochondrial DNA heteroplasmy from massively parallel sequencing data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: E4546 – E4547.
- Kumar B, Bhat ZI, Bansal S, Saini S, Naseem A, Wahabi K, Burman A, Kumar GT, Saluja SS, Rizvi MMA. Association of mitochondrial copy number variation and T16189C polymorphism with colorectal cancer in North Indian population. *Tumour Biol.* 2017; 39: 1010428317740296.
- Li Y, Beckman KB, Caberto C, Kazma R, Lum-Jones A, Haiman CA, Le Marchand L, Stram DO, Saxena R, Cheng I. Association of Genes, Pathways, and Haplogroups of the Mitochondrial Genome with the Risk of Colorectal Cancer: The Multiethnic Cohort. *PLoS One.* 2015; 10: e0136796.
- Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* 1997; 13: 450 – 455.
- Linkowska K, Jawień A, Marszałek A, Malyarchuk BA, Tońska K, Bartnik E, Skonieczna K, Grzybowski T. Mitochondrial DNA Polymerase γ Mutations and Their Implications in mtDNA Alterations in Colorectal Cancer. *Ann Hum Genet.* 2015; 79: 320 – 328.

- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J, Chen SM, Chien YH, Hwu WL, Fan PC, Wong LJ, Atwal PS, Huang T. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115: 13039 – 13044.
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J, Chen SM, Chien YH, Hwu WL, Fan PC, Wong LJ, Atwal PS, Huang T. Reply to Lutz-Bonengel et al.: Biparental mtDNA transmission is unlikely to be the result of nuclear mitochondrial DNA segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; pii: 201821357.
- Lutz-Bonengel S, Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; pii: 201820533.
- Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko MV, Czarny J, Woźniak M, Miścicka-Sliwka D. Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians. *Ann Hum Genet*. 2002; 66: 261 – 283.
- Malyarchuk B, Litvinov A, Derenko M, Skonieczna K, Grzybowski T, Grosheva A, Shneider Y, Rychkov S, Zhukova O. Mitogenomic diversity in Russians and Poles. *Forensic Sci Int Genet*. 2017; 30: 51 – 56.
- McMahon S, LaFramboise T. Mutational patterns in the breast cancer mitochondrial genome, with clinical correlates. *Carcinogenesis*. 2014; 35: 1046 – 1054.
- Mielnik-Sikorska M, Daca P, Malyarchuk B, Derenko M, Skonieczna K, Perkova M, Dobosz T, Grzybowski T. The history of Slavs inferred from complete mitochondrial genome sequences. *PLoS One*. 2013; 8: e54360.
- Mohammed F, Rezaee Khorasany AR, Mosaieby E, Houshmand M. Mitochondrial A12308G alteration in tRNA(Leu(CUN)) in colorectal cancer samples. *Diagn Pathol*. 2015; 10: 115.
- Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A, Schneider PM, Parsons TJ; DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014; 13: 134 – 142.
- Peters U, Bien S, Zubair N. Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut*. 2015; 64: 1623 – 1636.
- Ramos A, Santos C, Mateiu L, Gonzalez Mdel M, Alvarez L, Azevedo L, Amorim A, Aluja MP. Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PLoS One*. 2013; 8: e74636.
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 6465 – 6467.

- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003; 370: 751 – 762.
- Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRC Collaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7518 – 7528.
- Salas A, Elson JL. Mitochondrial DNA as a risk factor for false positives in case-control association studies. *J Genet Genomics.* 2015; 42: 169 – 172.
- Salas A, García-Magariños M, Logan I, Bandelt HJ. The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer. *BMC Cancer.* 2014; 14: 659.
- Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernández E, Nogués R, Aluja MP. Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 2008; 67: 191 – 200.
- Schmit SL, Edlund CK, Schumacher FR, Gong J, Harrison TA, Huyghe JR, Qu C, Melas M, Van Den Berg DJ, Wang H, Tring S, Plummer SJ, Albanes D, Alonso MH, Amos CI, Anton K, Aragaki AK, Arndt V, Barry EL, Berndt SI, Bezieau S, Bien S, Bloomer A, Boehm J, Boutron-Ruault MC, Brenner H, Brezina S, Buchanan DD, Butterbach K, Caan BJ, Campbell PT, Carlson CS, Castela JE, Chan AT, Chang-Claude J, Chanock SJ, Cheng I, Cheng YW, Chin LS, Church JM, Church T, Coetzee GA, Cotterchio M, Cruz Correa M, Curtis KR, Duggan D, Easton DF, English D, Feskens EJM, Fischer R, FitzGerald LM, Fortini BK, Fritsche LG, Fuchs CS, Gago-Dominguez M, Gala M, Gallinger SJ, Gauderman WJ, Giles GG, Giovannucci EL, Gogarten SM, Gonzalez-Villalpando C, Gonzalez-Villalpando EM, Grady WM, Greenson JK, Gsur A, Gunter M, Haiman CA, Hampe J, Harlid S, Harju JF, Hayes RB, Hofer P, Hoffmeister M, Hopper JL, Huang SC, Huerta JM, Hudson TJ, Hunter DJ, Idos GE, Iwasaki M, Jackson RD, Jacobs EJ, Jee SH, Jenkins MA, Jia WH, Jiao S, Joshi AD, Kolonel LN, Kono S, Kooperberg C, Krogh V, Kuehn T, Küry S, LaCroix A, Laurie CA, Lejbkowitz F, Lemire M, Lenz HJ, Levine D, Li CI, Li L, Lieb W, Lin Y, Lindor NM, Liu YR, Loupakis F, Lu Y, Luh F, Ma J, Mancao C, Manion FJ, Markowitz SD, Martin V, Matsuda K, Matsuo K, McDonnell KJ, McNeil CE, Milne R, Molina AJ, Mukherjee B, Murphy N, Newcomb PA, Offit K, Omichessan H, Palli D, Cotoré JPP, Pérez-Mayoral J, Pharoah PD, Potter JD, Qu C, Raskin L, Rennert G, Rennert HS, Riggs BM, Schafmayer C, Schoen RE, Sellers TA, Seminara D, Severi G, Shi W, Shibata D, Shu XO, Siegel EM, Slattery ML, Southey M, Stadler ZK, Stern MC, Stintzing S, Taverna D, Thibodeau SN, Thomas DC,

- Trichopoulou A, Tsugane S, Ulrich CM, van Duijnhoven FJB, van Guelpan B, Vijai J, Virtamo J, Weinstein SJ, White E, Win AK, Wolk A, Woods M, Wu AH, Wu K, Xiang YB, Yen Y, Zanke BW, Zeng YX, Zhang B, Zubair N, Kweon SS, Figueiredo JC, Zheng W, Marchand LL, Lindblom A, Moreno V, Peters U, Casey G, Hsu L, Conti DV, Gruber SB. Novel Common Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2018; doi: 10.1093/jnci/djy099.
- Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 131 – 149.
- Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 2002; 347: 576 – 580.
- Skonieczna K. Mutacje w mitochondrialnym DNA w nowotworach jelita grubego. Rozprawa doktorska. 2012. Bydgoszcz: Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika.
- Skonieczna K, Malyarchuk BA, Grzybowski T. The landscape of mitochondrial DNA variation in human colorectal cancer on the background of phylogenetic knowledge. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1825: 153 – 159.
- Skonieczna K, Malyarchuk B, Jawień A, Marszałek A, Banaszekiewicz Z, Jarmocik P, Grzybowski T. Mitogenomic differences between the normal and tumor cells of colorectal cancer patients. *Hum Mutat.* 2018; 39: 691 – 701.
- Tagliabracci A, Turchi C, Buscemi L, Sassaroli C. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in Italians. *Int J Legal Med.* 2001; 114: 224 – 228.
- Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Greaves LC, Kirkwood TB, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1351 – 1360.
- Vanecek T, Vorel F, Sip M. Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data. *Int J Legal Med.* 2004; 118: 14 – 18.
- van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat.* 2009; 30: E386 – E394.
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39: 359 - 407.
- Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell.* 1988; 55: 601 – 610.

- Wang D, Su LY, Zhang AM, Li YY, Li XA, Chen LL, Long H, Yao YG. Mitochondrial DNA copy number, but not haplogroup, confers a genetic susceptibility to leprosy in Han Chinese from Southwest China. PLoS One. 2012; 7: e38848.
- Webb E, Broderick P, Chandler I, Lubbe S, Penegar S, Tomlinson IP, Houlston RS. Comprehensive analysis of common mitochondrial DNA variants and colorectal cancer risk. Br J Cancer. 2008; 99: 2088 – 2093.
- Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111: 10654 – 10659.
- Zhang AM, Jia X, Bi R, Salas A, Li S, Xiao X, Wang P, Guo X, Kong QP, Zhang Q, Yao YG. Mitochondrial DNA haplogroup background affects LHON, but not suspected LHON, in Chinese patients. PLoS One. 2011; 6: e27750.
- Zhang W, Tang J, Zhang AM, Peng MS, Xie HB, Tan L, Xu L, Zhang YP, Chen X, Yao YG. A matrilineal genetic legacy from the last glacial maximum confers susceptibility to schizophrenia in Han Chinese. J Genet Genomics. 2014; 41: 397 – 407.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (artystycznych).

Łączny IF wszystkich opublikowanych przeze mnie prac naukowych wynosi **55,595**, a liczba punktów MNiSW wynosi **553**. Jestem również współautorką 17 doniesień zjazdowych. Pełny wykaz prac znajduje się w Załączniku nr 8 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Po wyłączeniu cyklu czterech artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe scharakteryzowane w punkcie 4. Autoreferatu, łączny IF publikacji wynosi **40,380**, natomiast liczba punktów MNiSW **418**. Poza cyklem czterech publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 4. Autoreferatu, jestem również współautorką:

- 14 artykułów dla których łączny IF = **40,380**, a łączna liczba punktów wg MNiSW = **380** (w czterech pracach, dla których łączny IF = 13,187, a łączna liczba punktów wg MNiSW = 90 jestem pierwszym autorem) opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF i znajdujących się w bazie JCR
- czterech artykułów w czasopismach spoza bazy JCR o łącznej liczbie punktów MNiSW = **24** (łączna liczba punktów MNiSW trzech prac, w których jestem pierwszym autorem wynosi 20), opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających punkty wg MNiSW
- jednego rozdziału w opracowaniu zbiorowym wydanym przez Polską Akademię Umiejętności o liczbie punktów MNiSW = **4**.

- 17 doniesień zjazdowych, w tym dziewięciu ogólnopolskich (w czterech pracach jestem pierwszym autorem prezentującym pracę) oraz ośmiu o zasięgu międzynarodowym (w pięciu pracach jestem pierwszym autorem prezentującym pracę).

5.1. Osiągnięcia naukowo – badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłam pierwszym autorem artykułu opublikowanego w czasopiśmie *Biochem. Biophys. Acta - Rev. Cancer* o współczynniku IF = 9,380 oraz 45 punktów MNiSW, umieszczonym na liście JCR. Ponadto byłam współautorką dwóch publikacji naukowych o łącznej liczbie punktów MNiSW = 8 oraz czterech doniesień zjazdowych.

Pracę naukową rozpoczęłam w 2004 w Zakładzie Genetyki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr n. biol. Grażyny Dąbrowskiej (obecnie dr hab.), będąc studentką III roku studiów licencjackich z biotechnologii. W trakcie ostatniego roku studiów licencjackich nabyłam umiejętności przeszukiwania baz danych sekwencji nukleotydowych i białkowych zawartych z NCBI (ang. The National Center for Biotechnology Information) oraz rekonstruowania drzew filogenetycznych.

Pierwsze prace doświadczalne dotyczące analizy ekspresji genów *RSH* u *Pharbitis nil* poddanych stresowi solnemu przeprowadziłam na pierwszym roku studiów uzupełniających magisterskich w Zakładzie Genetyki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr n. biol. Grażyny Dąbrowskiej (obecnie dr hab.) oraz we współpracy z mgr Justyną Prusińską (obecnie dr n. biol.). Nabyłam wówczas umiejętności praktycznych z zakresu izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji, Northern blot oraz ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.

Od 14 czerwca do 8 września 2006 realizowałam prace badawcze pod kierunkiem prof. Xin Lu w Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), przy University College London (obecnie jednostka naukowa University of Oxford w Zjednoczonym Królestwie Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej). Zapoznałam się wówczas z technikami hodowli kultur komórkowych, przygotowania plazmidów oraz immunoblottingu oraz, co bardzo istotne dla mojego dalszego rozwoju naukowego, merytorycznymi aspektami karcynogenezy i biologii nowotworów. Przeprowadzone badania miały na celu analizę wpływu fosforylacji p53 w Ser315 na potranslacyjne modyfikacje i transkrypcyjną aktywność p53 w komórkach ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc linii H1299. Prace badawcze zrealizowane przeze mnie w LICR w Londynie zostały wykorzystane w mojej pracy magisterskiej.

Na początku 2008 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (CM UMK). Rok później, w drodze rekrutacji o zasięgu międzynarodowym zostałam przyjęta do Studium Medycyny Molekularnej administrowanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny na kurs doktorski w dziedzinie medycyny molekularnej. Prace badawcze w ramach przygotowywanej rozprawy doktorskiej realizowałam pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Tomasza Grzybowskiego w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej CM UMK w Bydgoszczy. Praca badawcza pod opieką prof. Grzybowskiego pozwoliła mi na zdobycie kwalifikacji w dziedzinie genetyki populacyjnej i biologii ewolucyjnej. W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłam również w pracach dotyczących pozyskiwania i realizacji projektów badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Nauki). W związku z dużym zaangażowaniem w badania naukowe, a także predyspozycjami do prowadzenia zajęć dydaktycznych od 4 października 2011 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w ww. jednostce.

Unikatowe połączenie zdobytej przeze mnie wiedzy z zakresu mitochondrialnej genetyki medycznej i populacyjnej zaowocowało powstaniem artykułu pogładowego, który został opublikowany w 2012 roku w czasopiśmie *Biochem. Biophys. Acta - Rev. Cancer* o współczynniku $IF = 9,380$ oraz 45 punktów MNiSW, umieszczonym na liście JCR.

Rozprawę doktorską obroniłam z wyróżnieniem, a stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskałam uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 27 czerwca 2012 roku.

5.2. Osiągnięcia naukowo – badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką **19** publikacji naukowych o sumarycznym $IF = 46,215$ oraz **500** punktów MNiSW, w tym jako pierwszy autor występowałam w **dziwięciu** artykułach o łącznym $IF = 19,022$ oraz **196** punktów MNiSW. Ponadto byłam współautorką 17 doniesień zjazdowych. Poza osiągnięciem naukowym omówionym w autoreferacie w punkcie 4. byłam współautorką **15** publikacji naukowych o łącznym $IF = 31$ oraz **365** punktów MNiSW. Ponadto występowałam w charakterze wykonawcy jednego grantu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS2, który realizowany był w latach 2012 – 2015. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych występowałam w roli kierownika projektu w czterech grantach na

finansowanie badań służących rozwojowi Młodych Naukowców zatrudnionych na Collegium Medicum UMK, realizowanych odpowiednio w latach: 2013, 2014, 2015 oraz 2016.

Posiadany dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny, jak również uzyskany stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej umożliwił mi od 5 września 2013 roku objęcie stanowiska adiunkta w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Aktywność naukowa – genetyka medyczna

Szczególne miejsce w mojej aktywności naukowej zajmowały badania z zakresu genetyki medycznej. Głównym nurtem tych badań była analiza zmienności sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych, jak również wpływu zmienności sekwencji genu *TP53* na mutagenезę mtDNA w raku jelita grubego. Wyniki tych prac zostały opisane w cyklu publikacji wykazanych w punkcie 4. Autoreferatu. Poza aktywnością opisaną w osiągnięciu naukowym Autoreferatu, uczestniczyłam w pracach związanych z zaangażowaniem polimerazy gamma w proces karcynogenezy jelita grubego oraz mutagenезy mitochondrialnego DNA w raku jelita grubego [Ann Hum Genet. 2015; 79: 320 – 328; Acta Biochim Pol. 2015; 62: 625 – 627.]. Molekularne badania nad zmiennością pełnych genomów mitochondrialnych w innych typach nowotworów złośliwych zamierzam kontynuować w przyszłości. Obecnie badania z tego zakresu zostały zainicjowane dla polskiej populacji pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem endometrium.

Z zaangażowaniem prowadziłam także badania nad genetycznymi predyspozycjami do występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych u dzieci z chorobami nowotworowymi [Arch Med Sadowej Kryminol. 2016; 66: 244 – 254; Pol J Pathol. 2017; 68: 210 – 217; Postepy Dermatol Alergol. 2018; 35: 26 – 32]. Uczestniczyłam również w analizach dotyczących zmienności wybranych pozycji polimorficznych w genie *TGF-β* u pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem uzależnienia od alkoholu [Acta Biochim Pol. 2015; 62: 63 – 67].

W sposób szczególny zaangażowałam się w badania genetycznego podłoża tocznia rumieniowatego w populacji polskiej. Zainicjowałam prace nad zmiennością genetyczną u pacjentów z toczniem układowym oraz krążkowym, które realizowane są we współpracy z prof. dr hab. n. med. Anną Woźniacką z Kliniki Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz prof. dr hab. n. med. Rafałem Czajkowskim z Kliniki Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii, Katedry Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Przeprowadzone do

tej pory badania na populacji polskiej pozwoliły wskazać różnice w częstości występowania alleli i/lub genotypów w określonych pozycjach nukleotydowych sekwencji jądrowego DNA nie tylko pomiędzy pacjentami z toczniem układowym (łac. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) a osobami zdrowymi, ale również pomiędzy pacjentami z SLE, a osobami, u których zdiagnozowano wyłącznie skórą postać tocznia, tj. toczeń krążkowy (łac. *Discoid Lupus Erythematosus*, DLE) [Postepy Dermatol Alergol. 2017; 34: 228 – 232 oraz Postepy Dermatol Alergol. 2018; 35: 26 – 32]. Molekularne badania nad toczniem rumieniowatym zamierzam kontynuować w przyszłości. W chwili obecnej prowadzę analizy ekspresji cząsteczek mRNA oraz miRNA we krwi pacjentów z SLE oraz DLE z populacji polskiej.

Aktywność naukowa – genetyka populacyjna

Moim głównym zainteresowaniem badawczym w obszarze genetyki populacyjnej była analiza zmienności sekwencji mitochondrialnego DNA zarówno w populacjach ludzkich, jak i zwierzęcych. Uczestniczyłam w licznych badaniach dotyczących odtwarzania dawnych szlaków migracji populacji słowiańskich na podstawie badań mitochondrialnego DNA [PLoS One. 2013; 8: e54360; BMC Evol Biol. 2014; 14: 217; Ann Hum Biol. 2017; 44: 408 – 418; Mol Genet Genomics. 2018; 293: 1255 – 1263]. Ponadto brałam udział w pracach z zakresu genetyki populacyjnej żółwia błotnego (*Emys orbicularis*) rekonstruując sieć haplotypów ok. 150 sekwencji cytochromu b tego gatunku [Amphibia-Reptilia 2013; 34: 451 – 461].

Aktywność naukowa – genetyka sądowa

Badania naukowe prowadzone przeze mnie w zakresie genetyki sądowej dotyczyły wykorzystania analiz ludzkiego mtDNA m.in. do indywidualizacji śladów biologicznych czy tworzenia populacyjnej, pełnogenomowej bazy danych EMPOP [Arch Med Sadowej Kryminol. 2008; 58: 212 – 217; Arch Med Sadowej Kryminol. 2012; 62: 213 – 218; Forensic Sci Int Genet. 2017; 30: 51 – 56]. Wysokiej jakości bazy danych takie jak EMPOP są kluczowymi narzędziami umożliwiającymi poprawną interpretację statystyczną wyników analiz mtDNA przeprowadzonych dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości. Należy tu jednocześnie zauważyć, że ustalone przeze mnie i zgłoszone do referencyjnej bazy danych EMPOP sekwencje stu pełnych genomów mitochondrialnych były pierwszymi opracowanymi dla populacji polskiej.

Angażowałam się również w analizy zwierzęcego DNA dla potrzeb genetyki sądowej poprzez zrekonstruowanie drzewa filogenetycznego pełnych genomów mitochondrialnych gatunku *Canis lupus familiaris* oraz opracowanie wystandaryzowanego systemu klasyfikacji haplogrupowej tego gatunku [Forensic Sci Int Genet. 2015; 19: 123 – 129]. Opracowane przeze mnie dane znajdują wykorzystanie w codziennej praktyce genetyka sądowego służąc jako

narzędzie do weryfikacji poprawności sekwencji mtDNA gatunku *Canis lupus familiaris* ustalanych w trakcie postępowania procesowego .

Aktywność dydaktyczna

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych angażowałam się w działalność dydaktyczną prowadząc seminaria z „Biologii molekularnej” dla IV roku studiów magisterskich kierunku: Farmacja, ćwiczeń laboratoryjnych z „Biologii molekularnej” dla IV roku studiów magisterskich na kierunku: Analityka Medyczna, „Genetyki molekularnej” dla IV roku studiów magisterskich na kierunku: Analityka Medyczna, „Podstaw biologii molekularnej z elementami technik laboratoryjnych stosowanych w biologii molekularnej” dla II oraz III roku studiów licencjackich na kierunku: Biotechnologia, „Inżynierii genetycznej” dla III roku studiów licencjackich na kierunku: Biotechnologia oraz ćwiczeń bioinformatycznych „Genomika i bazy danych w biologii molekularnej” prowadzonych dla I roku studiów magisterskich na kierunku: Biotechnologia.

W 2017 roku zaproponowałam zajęcia fakultatywne, opracowałam protokół ich realizacji oraz występowałam w roli koordynatora i prowadzącego. Do ww. zajęć fakultatywnych, realizowanych przeze mnie w latach akademickich 2017/2018 oraz 2018/2019 należą ćwiczenia laboratoryjne „Zastosowanie metod biologii molekularnej w immunogenetyce” oraz ćwiczenia bioinformatyczne „Analiza *in silico* mutacji w DNA”, które wybierane są przez studentów III roku studiów licencjackich na kierunku: Biotechnologia, jak również I oraz II roku studiów magisterskich na kierunku: Biotechnologia.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam promotorem jednej pracy magisterskiej (obronionej w 2015 roku przez studentkę Biotechnologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UMK) oraz jednej pracy licencjackiej (obronionej w 2018 roku przez studentkę Biotechnologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UMK). Obecnie jestem promotorem jednej pracy licencjackiej realizowanej przez studentkę III roku Biotechnologii.

W 2013 roku zrecenzowałam trzy prace magisterskie przygotowane przez studentów Biotechnologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UMK.

Aktywność organizacyjna – porównania międzylaboratoryjne i badania biegłości

Wysoka jakość ustalanych przeze mnie sekwencji mtDNA była potwierdzana wielokrotnie w polskich oraz międzynarodowych porównaniach międzylaboratoryjnych i badaniach biegłości organizowanych odpowiednio przez Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii (PTMSiK) oraz Niemiecką Grupę Profilowania DNA (ang. German DNA Profiling, GEDNAP) (uzyskałam odpowiednie certyfikaty w latach 2012 – 2016). W badaniach biegłości planowałam przebieg analiz, prowadziłam część badań z wykorzystaniem technik

biologii molekularnej, jak również koordynowałam i nadzorowałam pozostałe prace laboratoryjne zmierzające do ustalenia sekwencji mtDNA. Przeprowadzałam także analizy statystyczne i interpretacyjne w zakresie badań mitochondrialnego DNA.

Aktywność organizacyjna - akredytacja

Po uzyskaniu stopnia doktora zaangażowałam się również w proces wdrażania normy PNEN ISO/IEC 17025:2005 w Katedrze Medycyny Sądowej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zaplanowałam schemat badań oraz koordynowałam i nadzorowałam walidacyjne prace laboratoryjne. Opracowałam i wdrożyłam procedurę badawczą PB-06 „Ustalanie profilu mtDNA metodą sekwencjonowania”. zgodną z międzynarodowymi standardami przyjętymi dla laboratoriów kryminalistycznych. W konsekwencji przeprowadzone przeze mnie prace pozwoliły uzyskać akredytację Polskiego Centrum Akredytacji na zgodność z normą PNEN ISO/IEC 17025:2005 na badania pochodzenia w linii żeńskiej w oparciu o sekwencjonowanie mitochondrialnego DNA. Certyfikat akredytacji (AB 1494) został przyznany 20.02.2014 i w przypadku badań mtDNA był pierwszym nadanym w Polsce.

Aktywność ekspercka

W 2018 roku wykonałam recenzje dwóch oryginalnych artykułów naukowych dla redakcji czasopism z listy JCR (PloS One o IF = 2,766 oraz International Journal of Rheumatic Diseases o IF = 2,423).

W latach 2009 – 2017 wykonałam ok. 60 specjalistycznych ekspertyz z zakresu identyfikacji osób czy indywidualizacji śladów biologicznych na podstawie badań sekwencji mitochondrialnego DNA zleconych przez wymiar sprawiedliwości i organy ścigania, tj. prokuratury (ok. 20 ekspertyz), sądy (ok. 10 ekspertyz) oraz Policję (ok. 30 ekspertyz).

Opracowałam również ok. 15 ekspertyz z zakresu pochodzenia biogeograficznego na podstawie analiz sekwencji mitochondrialnego DNA, które zostały sporządzone na zlecenie podmiotów prywatnych.

Nagrody i wyróżnienia

1. Wyróżnienie w uznaniu szczególnych wartości naukowych rozprawy doktorskiej pt. „Mutacje w mitochondrialnym DNA w nowotworach jelita grubego” nadane przez Wydział Lekarski Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy (2012)
2. Indywidualna nagroda I stopnia przyznana przez Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo – badawczej w 2012

roku za rozprawę doktorską pt. „Mutacje w mitochondrialnym DNA w nowotworach jelita grubego” (2013)

3. Stypendium przyznane przez Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za wysoko punktowaną publikację naukową pt. „Mitogenomic diversity in Russians and Poles”, która została opublikowana w “Forensic Science International - Genetics” (2017)
4. Wyróżnienie za wysoką aktywność naukową oraz wysoki wskaźnik Impact Factor w roku 2018 przyznane przez Prorektor ds. Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy (2018).

Katarzyna Skonieczna