

# Autoreferat

1. *Imię i nazwisko:* **Daniel Piotr POTACZEK**

2. *Stopień naukowy:* **doktor nauk medycznych**; „Zmienność genetyczna łańcucha  $\alpha$  receptora IgE o wysokim powinowactwie (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) w chorobach o podłożu alergicznym oraz w populacji”; Promotor, dr hab. (obecnie Prof. dr hab.) Marek Sanak; Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Lekarski; Kraków; 2007; <http://dl.cm-uj.krakow.pl:8080/Content/1143/potaczek.pdf.pdf>

Inne ważniejsze dyplomy:

- Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Lekarski; Kraków; 2002; **lekarz**
- Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biotechnologii, Kraków; 2003; brak tytułu (dwusemestralne studia podyplomowe w zakresie biologii molekularnej)

3. *Historia zatrudnienia:*

Okres	Instytucja	Stanowisko
2013-	Institute of Laboratory Medicine, Philipps-University Marburg, Marburg, Niemcy	Naukowiec (postdoctoral fellow, junior group leader)
2012-	Pracownia Biologii Molekularnej, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków	Lekarz (młodszy asystent)
2010-2012	Department of Pediatric Pneumology, Allergy and Neonatology, Hannover Medical School, Hanower, Niemcy	Researcher (postdoctoral fellow, bio-safety officer, lab head)
2007-2010	Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine, Tokio, Japonia	Naukowiec (postdoctoral fellow)
2004-2007	Oddział Kliniczny Kliniki Pulmonologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Kraków	Lekarz (rezydent)
2004	Oddział Kliniczny Kliniki Alergii i Immunologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Kraków	Lekarz (młodszy asystent)
2003-2007	Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków	Uczestnik studiów doktoranckich
2002-2003	Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Kraków	Lekarz (stażysta)

#### 4. Osiągnięcie naukowe:

##### I. Tytuł osiągnięcia naukowego:

### **Rola zmienności genetycznej w regulacji układu immunoglobuliny E**

##### II. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

A-ON Sharma V\*, Michel S\*, Gaertner V, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Zeilinger S, Illig T, Schedel M, **Potaczek DP\***, Kabesch M\*. Fine-mapping of IgE associated loci 1q23, 5q31 and 12q13 using 1000 Genomes Project data. *Allergy* 2014;69:1077-84.

Mój wkład w powstanie tej pracy udziale w polegał na zaplanowaniu badania, współuczestnictwie w analizie danych i w interpretacji wyników, a także na udziale w napisaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

B-ON Sharma V, Michel S, Gaertner V, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, **Potaczek DP\***, Kabesch M\*. A role of FCER1A and FCER2 polymorphisms in IgE regulation. *Allergy* 2014;69:231-6.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu badania, współuczestnictwie w analizie danych i w interpretacji wyników, a także na udziale w napisaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

C-ON **Potaczek DP**. Links between allergy and cardiovascular or hemostatic system. *Int J Cardiol* 2014;170:278-85 (praca poglądowa o typie syntetyczno-interpretacyjnym).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

D-ON **Potaczek DP\***, Michel S\*, Sharma V, Zeilinger S, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Illig T, Kabesch M. Different FCER1A polymorphisms influence IgE levels in asthmatics and non-asthmatics. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24:441-9.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu i w przeprowadzeniu badania, współuczestnictwie w interpretacji wyników, a także na napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%. Mój wkład w niniejszą pracę był objętościowo największy, jednak SM w pełni zasłużenie dzieli ze mną pierwsze autorstwo, gdyż jego wkład był więcej niż kluczowy dla powstania pracy.

E-ON **Potaczek DP**, Kabesch M. Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clin Exp Allergy* 2012;42:852-71 (praca poglądowa z komponentą systematycznego przeglądu piśmiennictwa).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu systematycznego przeglądu piśmiennictwa oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

F-ON **Potaczek DP\***, Kamijo M\*, Hara M, Okumura K, Undas A, Nishiyama C. A comparative search for human FcεRIα gene (FCER1A) 3'-UTR polymorphisms in Japanese and Polish populations. *Mol Biol Rep* 2012;39:3747-53.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu badania, wykonaniu części pracy eksperymentalnej (sekwencjonowanie, genotypowanie, synteza plazmidów, analiza genetyczno-statystyczna), udziale w interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%. Mój wkład w niniejszą pracę był objętościowo największy, jednak MK w pełni zasłużenie dzieli ze mną pierwsze autorstwo, gdyż jej wkład był więcej niż kluczowy dla powstania pracy.

G-ON **Potaczek DP**, Nastalek M, Wojas-Pelc A, Okumura K, Undas A, Nishiyama C. Naturally occurring FCER1A N222K mutation - its ethnicity-dependent distribution and a role in atopic dermatitis. *Mol Immunol* 2011;48:979-80 (list do edytora przedstawiający dane oryginalne).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badania, wykonaniu pracy eksperymentalnej (sekwencjonowanie, genotypowanie, analiza genetyczno-statystyczna), interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H-ON **Potaczek DP**, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, Nishiyama C. An association of TLR2 -16934A >T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:715-21.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu badania, wykonaniu części pracy eksperymentalnej (genotypowanie, synteza plazmidów, test lucyferazowy, EMSA, analiza statystyczna), interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

I-ON **Potaczek DP**, Owczarek D, Okumura K, Mach T, Undas A, Nishiyama C. An association between functional FcεRIα polymorphisms and total serum IgE levels in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:766-7 (list do edytora przedstawiający dane oryginalne).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badania, wykonaniu części pracy eksperymentalnej (genotypowanie, analiza genetyczno-statystyczna), interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

J-ON **Potaczek DP**, Wang QH, Sanak M, Tokura T, Matsuda H, Dziedzina S, Nakano N, Hara M, Ogawa H, Szczeklik A, Okumura K, Nishiyama C. Interaction of functional FCER2 promoter polymorphism and phenotype-associated haplotypes. *Tissue Antigens* 2009;74:534-8.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu badania, wykonaniu części pracy eksperymentalnej (sekwencjonowanie, genotypowanie, synteza plazmidów, test lucyferazowy, EMSA, analiza genetyczno-statystyczna), interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

K-ON **Potaczek DP**, Maeda K, Wang QH, Nakano N, Kanada S, Stepien E, Branicka A, Fukai T, Hara M, Tokura T, Ogawa H, Undas A, Okumura K, Nishiyama C. FcεpsilonRIα gene -18483A>C polymorphism affects transcriptional activity through YY1 binding. *Immunogenetics* 2009;61:649-55.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu badania, wykonaniu części pracy eksperymentalnej (genotypowanie, synteza plazmidów, test lucyferazowy, EMSA, analiza genetyczno-statystyczna), interpretacji wyników oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

L-ON **Potaczek DP**, Nishiyama C, Sanak M, Szczeklik A, Okumura K. Genetic variability of the high-affinity IgE receptor alpha-subunit (FcεRIα). *Immunol Res* 2009;45:75-84 (praca poglądowa).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w stworzeniu koncepcji pracy oraz napisaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

\* równy wkład (equal contribution)

### III. Omówienie celu i wyników osiągnięcia naukowego:

#### **Wprowadzenie**

Pracę nad wpływem zmienności genetycznej na rozwój chorób alergicznych oraz regulację immunoglobuliny E (IgE) rozpocząłem jeszcze jako uczestnik studiów doktoranckich pod kierownictwem dr hab. (obecnie Prof. dr hab.) Marka Sanaka w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie kierowanej przez ś.p. Profesora Andrzeja Szczeklika. Ścisłej rzecz ujmując, w ramach pracy doktorskiej zajmowałem się rolą wariantów genetycznych receptora dla IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI), a dokładnie jego podjednostki α (FcεRIα; gen *FCER1A*, chromosom 1q23). Temat ten był autorską koncepcją Profesorów Sanaka i Szczeklika i był niezwykle oryginalny. Przed naszymi badaniami, zmiennością genetyczną FcεRIα zajmowały się jedynie dwa ośrodki na Świecie (Shikanai i wsp., *J Appl Physiol* 2002;93:37-41; Hasegawa i wsp., *J Immunol* 2003;171:1927-33). Co ciekawe, opublikowano wcześniej rzeszę prac zajmujących się rolą polimorfizmów podjednostki β tegoż receptora (FcεRIβ; gen *FCER1B* lub *MS4A2*, chromosom 11q12-q13) i to właśnie jej zmienność genetyczna wydawała się, przynajmniej do epoki badań asocjacyjnych całego genomu (genome-wide association-studies – GWAS; o tym dalej), mieć szczególny wpływ na skłonność do rozwoju chorób o podłożu alergicznym oraz regulację IgE (np. Kraft i wsp., *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:62-72; Macglashan D Jr, *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050: 73-88). W ramach mojej pracy doktorskiej została, jako jedna z trzech takich obserwacji na Świecie dokonanych jeszcze przed erą GWAS, wykryta i opisana zależność między zmiennością genetyczną *FCER1A* a całkowitym stężeniem IgE w surowicy.

W trakcie pracy doktorskiej, udało mi się bardzo rozwinąć temat wpływu wariantów genetycznych FcεRI na IgE. Stał mi się on też tak bliski, że postanowiłem się nim zajmować w trakcie dalszej swojej działalności naukowej w Japonii (2007-2010) i w Niemczech (2010-2012), w którym to okresie miałem

okazję współpracować z wybitnymi uczonymi w tym między innymi Prof. Ko Okumurą, Prof. Chiharu Nishiyamą, Prof. Anettą Undas i Prof. Michaeliem Kabeschem, a efekty czego opisuję poniżej w ramach osiągnięcia naukowego. Zakres badań prowadzonych w tych okresach został znacząco poszerzony m.in. o interakcje polimorfizmów *FCER1A* z innymi kluczowymi determinantami genetycznymi IgE i wariantami drugiego pierwszorzędowego receptora dla IgE, tj. receptora dla IgE o niskim powinowactwie (FcεRII, CD23; gen *FCER2*, chromosom 19p13.3).

W ramach swojego osiągnięcia naukowego przedstawiam prace zawierające dane oryginalne (K-ON, J-ON, I-ON, H-ON, G-ON, F-ON, D-ON, B-ON, A-ON), a także trzy prace poglądowe (L-ON, E-ON, C-ON). Pierwszą z nich (L-ON) można potraktować jako swego rodzaju wprowadzenie w temat wpływu zmienności genetycznej FcεRI, a zwłaszcza FcεRIα, na całkowite stężenie IgE w surowicy oraz podsumowanie odnośnych badań, w których brałem udział w ramach pracy doktorskiej oraz części wyników uzyskanych w trakcie pobytu w Japonii. Druga praca poglądowa (E-ON) ujmuje temat wpływu zmienności genetycznej na IgE w dużo szerszym zakresie. Po pierwsze, dostarcza ogólnego opisu „układu IgE” (o tym dalej). Po drugie, podsumowuje wyniki dotychczasowych badań nad genetyczną kontrolą IgE w formie analizy wyników systematycznego przeglądu piśmiennictwa (baza PubMed; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), do czego również powrócę jeszcze w dalszej części niniejszego tekstu. Po trzecie w końcu, ujmuje te wyniki w kontekście badań GWAS, który to temat będzie się również często przewijał w tym opracowaniu. Ostatnia praca poglądowa (C-ON) opisuje związki pomiędzy patofizjologią chorób alergicznych/IgE-zależnych oraz schorzeń układu krążenia/zaburzeń hemostazy. Opisane w pracy tej zależności pokazują dalszą perspektywę, a w zasadzie jedną z możliwych dalszych perspektyw, w kierunku której mogą podążać badania nad rolą wpływu zmienności genetycznej na IgE.

Pace doświadczalne przedstawiające wyniki uzyskane w Japonii koncentrują się na badaniach czynnościowych polimorfizmów (K-ON, J-ON, H-ON, F-ON), genetyce populacyjnej (K-ON, J-ON, G-ON, F-ON), oraz badaniach asocjacyjnych (I-ON, H-ON, G-ON). Prace „niemieckie” koncentrują się na badaniach epidemiologicznych dużych grup o typie post-GWAS, a w mniejszym stopniu na zastosowaniu czynnościowej metodyki *in silico* (D-ON, B-ON, A-ON).

Pragnę także zaznaczyć, iż w obecnym osiągnięciu naukowym nie ujęto kilku innych publikacji, które nie przedstawiały wprawdzie (bezpośrednio) wyników opisanych w moim doktoracie (Potaczek i wsp., *Allergy* 2006;61:1230-3; Potaczek i wsp., *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:711-2; Potaczek i wsp., *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:500-1; Potaczek i wsp., *Clin Exp Allergy*;37:1574-5; Sanak i wsp.,

*Allergol Int* 2007;56:397-401; Sanak i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1280-1), ale nakładały się z doktoratem nawet w drobnej części materiałowo (np. populacja badana, część danych genotypowych) czy choćby czasowo (termin rozpoczęcia prac), itd., takich jak Potaczek i wsp., *Allergy* 2007;62:1095-6; Kanada, Nakano, Potaczek, i wsp., *J Immunol*, 2008;180:8204-10; Potaczek i wsp., *Allergy* 2008;63:626-7; Potaczek i wsp., *Int J Immunogenet* 2008;35:339-40; Natkaniec i wsp., *Mol Biol Rep* 2009;36:1545-7; Sanak i wsp., *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:170-4; Niwa, Potaczek, i wsp. *Int J Immunogenet* 2010;37:139-41).

### **Układ IgE**

IgE jest jedną z pięciu głównych klas ludzkich immunoglobulin. Wraz z immunoglobuliną G (IgG) występuje wyłącznie u ssaków. IgE oraz IgG pojawiły się bardzo wcześnie w ewolucji ssaków. IgG pełni rolę głównego przeciwciała w surowicy, natomiast IgE odpowiada za aktywację komórek tucznych oraz granulocytów zasadochłonnych (Hellman, *Biomed Pharmacother* 2007; 61:34-49).

Rola IgE w patofizjologii jest dość dobrze poznana. IgE pośredniczy reakcję nadwrażliwości (alergiczną) typu I. U części osób z chorobami alergicznymi, tzw. pacjentów atopowych, występuje wrodzona skłonność do nadprodukcji przeciwciał IgE skierowanych przeciwko swoistym antygenom środowiskowym, zwanym tu alergenami. Antygeny te, choć same w sobie nieszkodliwe dla organizmu, po związaniu przez cząsteczki IgE zakotwiczone za pośrednictwem FcεRI na powierzchni komórek tucznych i(lub) granulocytów zasadochłonnych wywołują ich aktywację, wydzielanie mediatorów zapalnych (m.in. histaminy), a w konsekwencji objawy miejscowej reakcji alergicznej najczęściej na obszarze układu oddechowego (astma atopowa, alergiczny nieżyt nosa – ANN), skóry (zewnątrzpochodne atopowe zapalenie skóry – AZS), układu trawiennego (alergia pokarmowa) czy narządu wzrokowego (atopowe zapalenie spojówek). Uogólniona reakcja nadwrażliwości typu I może prowadzić do rozwoju zagrażającego życiu wstrząsu anafilaktycznego. Dużo mniej wiadomo na temat fizjologicznego znaczenia IgE. Uważa się jednak, że IgE odgrywa znaczącą rolę w immunologicznej odpowiedzi przeciw pasożytniczej, a najprawdopodobniej także w obronie organizmu przed podostawianiem nowotworów (Kraft i wsp., *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:62-72; Macglashan D Jr, *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050: 73-88; Hellman, *Biomed Pharmacother* 2007; 61:34-49).

Mechanizmy immunologiczne mediowane przez IgE są natychmiastowe i niesamowicie silne (*vide* wstrząs anafilaktyczny) i dlatego podlegają bardzo ścisłej kontroli na wielu poziomach poczynając od „decyzji” limfocyту B o przetłoczeniu maszynierii na produkcję IgE. Bardzo ważną, choć nie do końca jeszcze poznaną rolę w regulacji IgE odgrywają także inni poza tą immunoglobuliną członkowie tzw.

„układu IgE”. Pojęcie układu IgE zostało wprowadzone przez Suttona i Gould i obejmuje pierwszorzędowe (FcεRI, FcεRII) i drugorzędowe (galektyna-3, CD21, niektóre integryny, i inne) receptory IgE, a także inne cząsteczki związane z funkcjami IgE i ich kontrolą (Gould, Sutton. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17; Gould i wsp. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:579–628).

FcεRI występuje u ludzi w formie tertameru ( $\alpha\beta\gamma_2$ ) na powierzchni komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych, a w formie trimeru ( $\alpha\gamma_2$ ) na powierzchni kilku innych typów komórek, w tym np. komórek prezentujących antygen (antigen-presenting cells – APC) i płytek krwi. Także FcεRII egzystuje w dwóch typach, w tym przypadku determinowanych przez alternatywny splicing. CD23a występuje wyłącznie na limfocytach B, natomiast CD23b na także kilku innych typach komórek, w tym APC, limfocytach T, granulocytów kwasochłonnych i innych. Najbardziej znacząca w kontekście obecnie prezentowanych wyników jest rola FcεRII w regulacji stężenia IgE w surowicy, opierająca się na równowadze między jego ekspresją na powierzchni limfocytów B a stężeniem tzw. wolnej formy receptora (soluble CD23 – sCD23). Ponadto, zarówno FcεRI na powierzchni APC jak i FcεRII zlokalizowany na limfocytach B pośredniczą internalizację antygenów i ich prezentację zależną od MHC-II (Hibbert i wsp., *J Exp Med* 2005;202:751-60; Gould, Sutton. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17; Gould, i wsp. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:579-628; Macglashan D Jr, *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050: 73-88; Kinet, *Annu Rev Immunol* 1999; 17:931-72).

Wcześniejsze badania jasno sugerowały olbrzymie znaczenie zmienności genetycznej w regulacji układu IgE, w tym produkcji i stężenia samej IgE w surowicy. Równocześnie nie dawały jednak wystarczającej odpowiedzi na pytanie o rolę wariantów poszczególnych elementów układu, zwłaszcza receptorów dla IgE, a także ich interakcji z innymi ważnymi determinantami IgE. Tę odpowiedź próbowałem wraz z moimi współpracownikami uzyskać w ramach badań wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego.

### **Zamierzenia badawcze**

- a. Zbadanie czynnościowej roli zmienności genów pierwszorzędowych i innych elementów układu IgE w regulacji ich ekspresji, także w kontekście nierównowagi sprzężeń (linkage disequilibrium - LD).
- b. Ocena wpływu polimorfizmów układu IgE na stężenie IgE w surowicy różnych grupach chorych.
- c. Określenie roli wariantów genetycznych układu IgE w skłonności do rozwoju chorób alergicznych.
- d. Ustalenie miejsca wyników otrzymanych dla stężenia IgE w kontekście GWAS i badań z wcześniejszego okresu oraz dokładne mapowanie sygnałów asocjacyjnych.

- e. Analiza interakcji między najważniejszymi determinantami genetycznymi IgE.

## Wyniki

- i. **Potaczek DP**, Nishiyama C, Sanak M, Szczeklik A, Okumura K. Genetic variability of the high-affinity IgE receptor alpha-subunit (FcεRIα). *Immunol Res* 2009;45:75-84 (**L-ON**)

W tej pracy poglądowej podsumowano stan badań nad zmiennością genetyczną *FCER1A* przed erą GWAS. Do momentu opublikowania pierwszego GWAS zajmującego się całkowitym stężeniem IgE w surowicy (Weidinger i wsp., *PLoS Genet* 2008;4:e1000166), jedynie cztery ośrodki na całym Świecie zajmowały się tym zagadnieniem. Shikanai i wsp. (*J Appl Physiol* 2002;93:37-41), Potaczek i wsp. (*Allergy* 2007;61:1230-3; *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:500-501) i Bae i wsp. (*J Allergy Clin Immunol* 2007;119:449-56) opisali bezpośrednią i(lub) pośrednią zależność między polimorfizmem rs2427827 zlokalizowanym w promotorze proksymalnym *FCER1A* a całkowitym stężeniem immunoglobuliny w surowicy. Ponadto, dwa polimorfizmy *FCER1A* były badane czynnościowo, rs2427827 (Bae i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:449-56; Kanada, Nakano, Potaczek, i wsp., *J Immunol*, 2008;180:8204-10) i także zlokalizowany w promotorze proksymalnym rs2251746 (Hasegawa i wsp., *J Immunol* 2003;171:1927-33). W obu przypadkach opisano wpływ wariantów na ekspresję genu.

- ii. **Potaczek DP**, Maeda K, Wang QH, Nakano N, Kanada S, Stepień E, Branicka A, Fukai T, Hara M, Tokura T, Ogawa H, Undas A, Okumura K, Nishiyama C. FcεRIα gene -18483A>C polymorphism affects transcriptional activity through YY1 binding. *Immunogenetics* 2009;61:649-55 (**K-ON**).

oraz

**Potaczek DP\***, Kamijo M\*, Hara M, Okumura K, Undas A, Nishiyama C. A comparative search for human FcεRIα gene (*FCER1A*) 3'-UTR polymorphisms in Japanese and Polish populations. *Mol Biol Rep* 2012;39:3747-53 (**F-ON**).

Obie prace zajmowały się poszukiwaniem nowych czynnościowych polimorfizmów *FCER1A* i rozpatrywaniu ich funkcji w kontekście LD. W pierwszym przypadku (K-ON), badano wariant rs2494262 zlokalizowany w promotorze dystalnym/eksonie 1A, którego zależność z całkowitym stężeniem IgE w surowicy opisano już wcześniej (Potaczek i wsp., *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:500-501). Celem pracy było stwierdzenie czy rs2494262 może wpływać na ekspresję *FCER1A*, czy też obserwowana zależność z IgE wynika jedynie z silnego LD z rs2427827. Wykazano, że polimorfizm rs2494262 wpływa na wiązanie czynnika transkrypcyjnego YY1 [electrophoretic mobility shift assay – EMSA, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay] i



dlatego również na aktywność transkrypcyjną (test lucyferazowy). Ponadto, wartości LD między rs2427827 i rs2494262 wskazały, że ustalenie czynności którego z tych dwóch polimorfizmów jest w większym stopniu odpowiedzialna za zależność z całkowitym stężeniem IgE w surowicy będzie trudne także w populacji japońskiej. W drugim przypadku (F-ON), poszukiwano polimorfizmów w regionie 3'-niepodlegającym translacji (3'-untranslated region – 3'-UTR) *FCER1A*, których czynność mogła by poprzez skomplikowane zależności LD wpływać na obserwowane dla innych wariantów asocjacje epidemiologiczne. Warianty genetyczne zlokalizowane w 3'-UTR wpływają na stabilność mRNA, a w konsekwencji na ekspresję genu (m.in. Wang i wsp., *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:491–497). W celu zwiększenia skuteczności screeningu mutacyjnego, wykonano go w populacji kaukaskiej (polskiej) oraz wschodnioazjatyckiej (japońskiej). Wykryte dwa polimorfizmy rs79965525 i rs7549785 okazały się jednak nie wpływać na ekspresję genu, przynajmniej w teście lucyferazowym.

- iii. **Potaczek DP**, Wang QH, Sanak M, Tokura T, Matsuda H, Dziedzina S, Nakano N, Hara M, Ogawa H, Szczeklik A, Okumura K, Nishiyama C. Interaction of functional *FCER2* promoter polymorphism and phenotype-associated haplotypes. *Tissue Antigens* 2009;74:534-8 (**J-ON**).

Wcześniejsze badania wykazały, że warianty *FCER2* wiążą się z całkowitym stężeniem IgE w surowicy nie dostarczając równocześnie wystarczającej i przekonującej wiedzy czynnościowo uzasadniającej obserwowane efekty (Laitinen i wsp., *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:700-6; Tantisira i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1285-91; Meng i wsp., *Genes Immun* 2007;8:215-23). Celem niniejszej pracy była oparta na analizie LD i poszukiwaniu nowych czynnościowych polimorfizmów *FCER2* próba dostarczenia czynnościowego wytłumaczenia tych zależności epidemiologicznych, podejście to które już wcześniej zastosowano z sukcesem w przypadku wariantów *FCER1B* (Nishiyama i wsp., *J Immunol* 2004; 173: 6458-64.). Przeprowadzono screening mutacyjny promotora *FCER2* specyficznego dla limfocytów B z następnym genotypowaniem nowo wykrytych i raportowanych uprzednio polimorfizmów. Podobnie jak w przypadku *FCER1A* (K-ON, F-ON) analizę poszerzono o populację wschodnioazjatycką (japońską) w celu zwiększenia czułości screeningu mutacyjnego, a także w związku z pracą Shen i wsp. (*Environ Mol Mutagen* 2009;50:285-90) relacjonującą znaczenie jednego z polimorfizmów *FCER2* wpływającego na IgE dla rozwoju raka oskrzeli w populacji chińskiej. Wykryto trzy nowe polimorfizmy, z których jeden (rs3760687) okazał się wpływać na wiązanie czynników transkrypcyjnych Sp1/Sp3 (EMSA, CHIP assay) i samą aktywność transkrypcyjną (test lucyferazowy). Ponadto, analiza LD wykazała, iż obserwowane wcześniej zależności zmienności genetycznej *FCER2* z IgE (Tantisira i wsp., *J Allergy Clin Immunol*

2007;120:1285-91) mogły wynikać z powiązań haplotypowych z czynnościowymi polimorfizmami tego genu, w tym nowo wykrytym wariantem rs3760687.

- iv. **Potaczek DP**, Owczarek D, Okumura K, Mach T, Undas A, Nishiyama C. An association between functional FcεRIα polymorphisms and total serum IgE levels in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:766-7 (**I-ON**).

oraz

**Potaczek DP**, Nastalek M, Wojas-Pelc A, Okumura K, Undas A, Nishiyama C. Naturally occurring FCER1A N222K mutation - its ethnicity-dependent distribution and a role in atopic dermatitis. *Mol Immunol* 2011;48:979-80 (**G-ON**).

Są to dwie krótkie prace asocjacyjne. W pierwszej (I-ON) oceniono zależność trzech znanych czynnościowych polimorfizmów *FCER1A* (rs2251746, rs2427827 i rs2494262) na całkowite stężenie IgE w surowicy w nietypowej kohorcie pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit (wrzodziejące zapalenie jelita grubego lub choroba Leśniowskiego-Crohna), jednostką chorobową w której często występują zwiększone stężenia IgE w surowicy (np. Levo i wsp., *Ann Allergy* 1986; 56:85-7; Ceyhan i wsp., *Respiration* 2003;70:60-6). Stwierdzono zależność między polimorfizmem rs2427827 a stężeniem IgE (w przypadku wariantu rs2494262 podobny efekt statystyczny nie był odporny na korektę na kilka potencjalnie zakłócających zmiennych), lecz co ciekawe o odwrotnym kierunku niż w grupach pacjentów z chorobami alergicznymi (Shikanai i wsp., *J Appl Physiol* 2002;93:37-41; Potaczek i wsp., *Allergy* 2007;61:1230-3; Potaczek i wsp., *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:500-501; Bae i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:449-56). W drugiej pracy (G-ON) pokuszono się o analizę zależności między zmieniającą sekwencję aminokwasową FcεRIα (N222K) mutacją rs41264475 a AZS. Wynik badania okazał się jednak negatywny.

- v. **Potaczek DP**, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, Nishiyama C. An association of TLR2-16934A >T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:715-21 (**H-ON**).

Celem tej pracy było poszerzenie spektrum genów badanych w kontekście ich wpływu na całkowite stężenie IgE w surowicy o te nie będące pierwszo- i drugorzędowymi elementami układu IgE, a których rola w rozwoju chorób alergicznych została dowiedziona (Tesse i wsp., *Allergy* 2011;66:307-16). Wybrano potencjalnie czynnościowy polimorfizm rs4696480 receptora toll-like 2 (toll-like receptor – TLR2; gen *TLR2*, chromosom 4q32; Oh i wsp., *Allergy* 2009;64:1608-15). W części asocjacyjnej badania potwierdzono uprzednio opisywaną zależność między wariantem rs4696480 a wskaźnikiem ciężkości AZS SCORAD (severity scoring of atopic dermatitis

index). Choć nie zaobserwowano bezpośredniej zależności między polimorfizmem rs4696480 i stężeniem IgE w surowicy, stwierdzono iż także SCORAD korelował z całkowitym IgE. Ponadto, w teście lucyferazowym wykazano wpływ badanego polimorfizmu na aktywność transkrypcyjną, a EMSA zasugerowała, że wariant rs4696480 wywiera efekt na wiązanie czynnika transkrypcyjnego, którego tym razem nie udało się bliżej scharakteryzować.

- vi. **Potaczek DP**, Kabesch M. Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clin Exp Allergy* 2012;42:852-71 (**E-ON**).

Z jednej strony jest to zwykła, choć obszerna praca poglądowa dogłębnie i całościowo analizująca stan wiedzy (state-of-art) wiedzy w zakresie badań asocjacyjnych i czynnościowych wpływu zmienności genetycznej na całkowite stężenie IgE w surowicy w kontekście wyników badań GWAS. Podsumowanie wyników 3 opublikowanych badań GWAS (Weidinger i wsp., *PLoS Genet* 2008;4:e1000166; *The GABRIEL Consortium*, *N Engl J Med* 2010;363:1211-21; Granada i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:840-5) wykazało szczególne znaczenie pięciu loci w kontekście ich zależności z całkowitym stężeniem IgE w surowicy: 1q23 (*FCER1A*), 5q31 (*RAD50*, *IL13*, *IL4*), 12q13 (*STAT6*), 6p21.3 (*HLA-DRB1*) i 16p12 (*IL4R*, *IL21R*). Co ciekawe, w przeciwieństwie do GWAS badających inne parametry/choroby i często wykazujących zależności dla dość nietypowych genów (np. *ORMDL3/17q21*; np. Moffatt, Kabesch, Liang i wsp., *Nature* 2007;448:470-3; Toncheva, Potaczek, Schedel i wsp., *Allergy* 2015;70:1288-99), w przypadku IgE wykryte przez GWAS loci nie budzą zaskoczenia z czynnościowego punktu widzenia. Ponadto, ich wyniki są bardzo powtarzalne pomiędzy GWAS, zwłaszcza dla 1q23 (*FCER1A*), 5q31 (*RAD50*, *IL13*, *IL4*) i 12q13 (*STAT6*). Co więcej, wykryte sygnały asocjacyjne można w zdecydowanej większości przypisać bezpośrednio lub pośrednio (LD) polimorfizmom zidentyfikowanym przez badania epidemiologiczne i(lub) czynnościowe sprzed ery GWAS.

Z drugiej strony, praca zawiera też olbrzymią komponentę systematyczną opartą na przeszukaniu bazy PubMed, dostarczającą dokładnego podsumowania wyników epidemiologicznych badań genetycznych nad całkowitym IgE o wszystkich możliwych typach, tj. analizy sprzężeń, badań genów kandydatów, oraz GWAS. Tę drugą część, systematycznie porządkującą wiedzę dotyczącą genetycznych badań asocjacyjnych nad całkowitym stężeniem IgE w surowicy można poniekąd uznać za oryginalną komponentę pracy poglądowej.

Prace **ON-A**, **ON-B** i **ON-D** (odpowiednio punkty ix, viii i vii. poniżej) wykazują spore podobieństwa w swojej strukturze metodologicznej. Z drugiej strony znacznie się od siebie różnią, zarówno w aspekcie

celów, wyników, jak i samej metodyki. Dlatego zostaną omówione osobno, choć z niniejszym krótkim wspólnym wprowadzeniem metodologicznym. We wszystkich trzech poniższych badaniach asocjacje genetyczne oceniano w grupie co najmniej 1303 dzieci (w tym przynajmniej 651 astmatyków; Moffatt, Kabesch, Liang i wsp., *Nature* 2007;448:470-3; Schedel i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1100-5). Genotypy pochodziły w mniejszej części z badania GWAS, w którym nasza grupa brała udział (chip-genotyping; Moffatt, Kabesch, Liang i wsp., *Nature* 2007;448:470-3), natomiast drugą, znacznie przeważającą liczbę polimorfizmów genotypowano bezpośrednio na potrzeby poniższych trzech badań z zastosowaniem metody MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry), a w pojedynczych przypadkach genotyp uzyskano metodą imputacji (źródło poszczególnych danych genotypowych jest każdorazowo wyszczególnione w odnośnej publikacji).

- vii. **Potaczek DP\***, Michel S\*, Sharma V, Zeilinger S, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Illig T, Kabesch M. Different FCER1A polymorphisms influence IgE levels in asthmatics and non-asthmatics. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24:441-9 (**D-ON**).

Zainteresowało nas, że w dwóch GWAS badających całkowite stężenie IgE w surowicy opublikowanych do momentu kiedy planowaliśmy niniejsze badanie, najsilniejsze sygnały asocjacyjne w obrębie 1q23/*FCER1A* pochodziły z dwóch różnych grup polimorfizmów zdeterminowanych przez LD (tagging bins; Weidinger i wsp., *PLoS Genet* 2008;4:e1000166; The GABRIEL Consortium, *N Engl J Med* 2010;363:1211-21). Ponieważ jedno z tych badań obejmowało głównie grupy populacyjne, a drugie w około połowie pacjentów chorych na astmę, wysnuiliśmy hipotezę, że inne polimorfizmy mogą wpływać na IgE w populacji ogólnej (mechanizm podstawowy regulacji) a inne u astmatyków (regulacja swoista). W celu przetestowania tej możliwości dokonaliśmy wyboru szerokiego panelu wariantów genetycznych 1q23 w oparciu o intensywny przegląd literatury oraz LD-tagging wykorzystujący bazę HapMap ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3_B36)) i zbadaliśmy je w naszej kohorcie pediatrycznej złożonej w połowie z astmatyków i w jej podgrupach.

Podobnie jak w przypadku GWAS populacyjnych (Weidinger i wsp., *PLoS Genet* 2008;4:e1000166; Granada i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:840-5), najsilniejszy sygnał asocjacyjny dla całkowitego stężenia IgE w surowicy w całej grupie otrzymano dla zdeterminowanej LD grupy polimorfizmów zawierających m.in. rs2511211, rs2427837 i rs2251746. Te same trzy polimorfizmy wykazywały najsilniejszą zależność z IgE w grupie wolnej od astmy. W grupie astmatyków natomiast, chociaż efekt rs2511211, rs2427837 i rs2251746 na

IgE był ciągle widoczny, stwierdzono obecność dodatkowego sygnału asocjacyjnego dla wariantów rs3845625, rs7522607 i rs2427829. W przypadku wszystkich tych 6 polimorfizmów zaobserwowano też zależność z astmą atopową (dla rs7522607 była to tendencja statystyczna). Niektóre warianty *FCER1A* wykazywały zależność z atopią i(lub) ANN ale nie AZS.

- viii. Sharma V, Michel S, Gaertner V, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, **Potaczek DP\***, Kabesch M\*. A role of FCER1A and FCER2 polymorphisms in IgE regulation. *Allergy* 2014;69:231-6 (**B-ON**).

W pracy tej wykonano (a) ocenę zależności polimorfizmów *FCER2* z całkowitym stężeniem IgE w surowicy w oparciu o analizę klasyczną (IgE jako zmienna ciągła) i percentylową (Moffatt, Kabesch, Liang i wsp., *Nature* 2007;448:470-3; Schedel i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1100-5), (b) dokładne mapowanie sygnału asocjacyjnego z IgE na podstawie danych pochodzących z bazy HapMap ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3\\_B36](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3_B36)), a także (c) analizę interakcji pomiędzy polimorfizmami *FCER2* i *FCER1A* wykazującymi najsilniejszą zależność z IgE.

Polimorfizm *FCER2* rs3760687 wykazał najbardziej spójną zależność z całkowitym stężeniem IgE w surowicy, tzn. obecną zarówno w analizie klasycznej, jak i precyzyjnej w której to wiązał się z łagodnie-umiarkowanie zwiększonym IgE (odpowiednio 50. i 66. percentyl). W analizie interakcyjnej pokazano, iż zależność wariantu rs3760687 z IgE występuje głównie wśród badanych nie-homozygotycznych pod względem allelu ryzyka wariantu *FCER1A* rs2427837 należącego do zdeterminowanej przez LD grupy polimorfizmów będącej jedną z głównych determinant całkowitego stężenia IgE w surowicy w populacji.

- ix. Sharma V\*, Michel S\*, Gaertner V, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Zeilinger S, Illig T, Schedel M, **Potaczek DP\***, Kabesch M\*. Fine-mapping of IgE associated loci 1q23, 5q31 and 12q13 using 1000 Genomes Project data. *Allergy* 2014;69:1077-84 (**A-ON**).

W badaniu tym dokonano bardzo dokładnego mapowania zależności z całkowitym stężeniem IgE w surowicy dla trzech najważniejszych loci zidentyfikowanych przez GWAS (Weidinger i wsp., *PLoS Genet* 2008;4:e1000166; The GABRIEL Consortium, *N Engl J Med* 2010;363:1211-21; Granada i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:840-5), czyli 1q23 (*FCER1A*), 5q31 (*RAD50*, *IL13*, *IL4*) i 12q13 (*STAT6*). W celu przeprowadzenia bardzo dokładnego mapowania posłużono się nowatorsko danymi z bazy 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium, *Nature* 2010;467:1061-73). Oceny zależności polimorfizmów 1q23, 5q31 i 12q13 z całkowitym stężeniem

IgE w surowicy dokonano w oparciu o analizę klasyczną i percentylową [jak w punkcie viii (B-ON) powyżej].

Zależności z całkowitym stężeniem IgE w surowicy zostały potwierdzone i dokładnie zmapowane. Ponadto stwierdzono, że w przypadku 1q23 i 5q31 większość z nich wykryto dla łagodnie-umiarkowanie zwiększonych stężeń IgE, natomiast polimorfizmy 12q13 wiązały się głównie z silnie zwiększonym IgE w surowicy. Analiza interakcji między polimorfizmami wykazującymi najsilniejszą zależność w przypadku każdego z trzech loci, rs2427837 (1q23), rs2243300 (5q31) i rs1059513 (12q13), wykazała nawet czterokrotny wzrost ilorazu szans dla wyższego IgE w przypadku obecności alleli ryzyka we wszystkich trzech loci.

Po stratyfikacji względem astmy, stwierdzono, że niektóre polimorfizmy, przede wszystkim 1q23 (rs2427829 i rs2427830) i 12q13 (rs12368672), wykazują zależność z IgE w grupie chorych, natomiast warianty zlokalizowane w 5q31 głównie wśród dzieci wolnych od tej choroby. Jedynie dwa polimorfizmy 5q31 (rs1295686 i rs20541) wykazywały związek z astmą, podczas gdy kilka wariantów, zwłaszcza 1q23 wiązało się z astmą atopową. Kilka polimorfizmów 1q23 wiązało się z atopią i(lub) ANN, a dwa warianty 12q13 z atopią. Żaden badany polimorfizm nie wykazał zależności z astmą nieatopową czy AZS.

Ponadto, dokonano również czynnościowej analizy *in silico* wszystkich polimorfizmów wykazujących zależność z IgE.

- x. **Potaczek DP.** Links between allergy and cardiovascular or hemostatic system. *Int J Cardiol* 2014;170:278-85 (C-ON).

Jest to syntetyczna praca pogładowa o typie interpretacyjnym. Opisuje ona możliwe zależności pomiędzy atopią, IgE i chorobami alergicznymi a miażdżycą, metabolizmem lipidów i zaburzeniami krzepnięcia. Posłużyłem się w niej wiedzą dotyczącą opisywanego tematu nabytą w trakcie badań dotyczących zależności między chorobami alergicznymi a żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (Undas i wsp., *J Thromb Haemost* 2011;9:870-3), aktywacja płytek krwi w AZS (Nastalek i wsp., *J Dermatol Sci* 2011;64:79-82) oraz związkami naturalnych antykoagulantów z chorobami alergicznymi (Undas i wsp., *Thromb Haemost* 2012;107:1000-2). Szczególne miejsce w tej pracy pogładowej poświęcam jednak zależnościom genetycznym pomiędzy atopią/IgE a gospodarką lipidową lub zapalnymi markerami miażdżycy, w których to locus 1q23/*FCER1A* wydaje się odgrywać ważną rolę.

## Podsumowanie

W ramach przedstawionego tutaj osiągnięcia naukowego analizowano różne aspekty zmienności genów układu IgE, w tym jego pierwszorzędowych (*FCER1A*, *FCER2*) jak i nieco dalszych (*TLR2*) przedstawicieli układu czy też najważniejszych innych elementów regulatorowych (*STAT6*, chromosom 5q31). Badania dotyczyły zależności epidemiologicznych polimorfizmów oraz ich czynnościowego wpływu na ekspresję odnośnych genów, a także zależności haplotypowych/LD między tymi wariantami genetycznymi.

Główne wyniki badawcze osiągnięcia naukowego:

- a) W dodatku do polimorfizmów będących głównymi predyktorami całkowitego stężenia IgE w populacji, także inne warianty genetyczne *FCER1A* wykazują zależność z IgE specyficznie u dzieci chorych na astmę.
- b) Istnieje interakcja między wariantami genetycznymi *FCER1A* a polimorfizmami *STAT6* oraz chromosomu 5q31 odnośnie ich zależności z całkowitym stężeniem IgE w surowicy.
- c) Warianty genetyczne *FCER1A* i locus 5q31 wykazują zależność głównie z łagodnie lub umiarkowanie zwiększonym stężeniem IgE w surowicy, podczas gdy polimorfizmy *STAT6* przede wszystkim z silnie podwyższonym IgE.
- d) Polimorfizmy *FCER1A* wykazują też zależność ze skłonnością do atopii i ANN, ale nie AZS.
- e) Warianty genetyczne *FCER1A* wykazują zależność z IgE także w populacji chorych na nieswoiste zapalenie jelit, aczkolwiek odwrotną niż u osób z chorobami alergicznymi lub w populacji ogólnej.
- f) Czynnościowe polimorfizmy *FCER1A* zlokalizowane są w regionie 5'-UTR (promotor proksymalny, promotor dystalny/ekson 1A), podczas gdy ewentualna funkcjonalność wariantów zlokalizowanych w 3'-UTR, choć możliwa, nie została laboratoryjnie udowodniona.
- g) Również polimorfizmy *FCER2* wykazują zależność z łagodnie i umiarkowanie zwiększonym całkowitym stężeniem IgE w surowicy, zwłaszcza czynnościowy wariant zlokalizowany w jednym z promotorów. Zależność ta jest szczególnie widoczna w podgrupie badanych pozbawionych homozygotycznego wpływu polimorfizmu *FCER1A* związanego z najsilniejszym sygnałem asocjacyjnym z IgE w populacji.
- h) Chociaż zarówno czynnościowy polimorfizm *TLR2* jak i całkowite stężenie IgE w surowicy wykazują zależności z ciężkością AZS to są one niezależne.

W podsumowaniu, w zakresie chromosomu 1q23/*FCER1A*, przedstawione powyżej wyniki badań, zarówno tych zaplanowanych/wykonanych przed (badania pre-GWAS) jako i w trakcie trwania ery GWAS czy u jej schyłku (badania post-GWAS), potwierdzają, a przede wszystkim znacznie poszerzają wyniki GWAS, w tym m.in. o analizy czynnościowe bezpośrednie oraz *in silico*, dokładne mapowanie genu, analizy w podgrupach (po stratyfikacji), analizy w specyficznych grupach chorych, analizy interakcyjne,

analizy specyficznych fenotypów, czy też porównawcze badania populacyjne. W przypadku chromosomu 5q31 (*RAD50*, *IL13*, *IL4*) oraz 12q13 (*STAT6*), wyniki badań GWAS zostały potwierdzone i poszerzone o dokładne mapowanie tych loci, analizy w podgrupach (po stratyfikacji), analizy w specyficznych grupach chorych, analizę interakcyjną, analizy specyficznych fenotypów, czy też badania czynnościowe *in silico*.

W przypadku GWAS, geny wykazujące zależność z badanymi fenotypami/parametrami bardzo często stanowiły niespodziankę, w tym sensie, że niewiele można było powiedzieć o ich funkcji w ogóle a tym bardziej o ewentualnej roli ich produktów białkowych w regulacji odnośnych fenotypów/parametrów. Dobrym przykładem jest tu chromosom 17q21 (np. Moffatt, Kabesch, Liang i wsp., *Nature* 2007;448:470-3; Toncheva, Potaczek, Schedel i wsp., *Allergy* 2015;70:1288-99). Co ciekawe, loci wykryte w GWAS w przypadku całkowitego stężenia IgE w surowicy aż takiej niespodzianki nie stanowiły (Potaczek & Kabesch, *Clin Exp Allergy* 2012;42:852-71), gdyż ich zależność z IgE opisywano już wcześniej (np. *FCER1A*, np. Potaczek i wsp., *Allergy* 2006;61:1230-3; Potaczek i wsp., *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:500-1; Sanak i wsp., *Allergol Int* 2007;56:397-401), a także znana były ścisłe powiązania ich produktów białkowych z układem IgE, czy też bezpośrednia do niego przynależność jak w przypadku *FCER1A* (Potaczek i wsp., *Immunol Res* 2009;45:75-84).

Pewnym wyjątkiem był tutaj *RAD50*, gen kodujący białko odpowiedzialne za naprawę DNA. Nie wchodząc w szczegóły wykraczające poza ramy niniejszego opracowania, sam *RAD50* mógłby wykazywać bezpośredni wpływ na syntezę IgE (poprzez class-switch recombination – CSR) lub jego polimorfizmy mogą być w LD z czynnościowymi wariantami *IL4/IL13* lub czy też wpływać na produkcję IgE poprzez ponad-jednogenowe mechanizmy regulacyjne (tzw. locus control region – LCR; Potaczek & Kabesch, *Clin Exp Allergy* 2012;42:852-71). Ta ostatnia opcja wydaje się odgrywać znaczącą rolę w świetle niedawnych wyników badań, w których również i ja uczestniczyłem (Schieck, Sharma, Michel i wsp., *Allergy* 2014;69:1171-80).

Paradoksalnie, poniekąd wbrew temu co napisano powyżej, interesujący jest również w tym kontekście *FCER1A*. Choć zarówno udział jak i rola FcεRIα/FcεRI w układzie IgE są oczywiste (Gould, Sutton. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17; Gould, i wsp. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:579-628; Macglashan D Jr, *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050: 73-88; Kinet, *Annu Rev Immunol* 1999; 17:931-72) i scharakteryzowane są czynnościowe polimorfizmy należące do dwóch grup zdeterminowanych przez LD związanych z najsilniejszymi w GWAS sygnałami asocjacyjnymi z całkowitym stężeniem IgE w surowicy [dla Weidinger i wsp. (*PLoS Genet* 2008;4:e1000166) i Granada i wsp. (*J Allergy Clin Immunol* 2012;129:840-5) jest to wariant rs2251746 (Hasegawa i wsp., *J Immunol* 2003;171:1927-33; Kanada, Nakano, Potaczek, i wsp., *J Immunol*, 2008;180:8204-10); dla The GABRIEL Consortium, *N Engl J Med* 2010;363:1211-21 są to



rs2427827 i rs2494262 (Bae i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:449-56; Kanada, Nakano, Potaczek, i wsp., *J Immunol*, 2008;180:8204-10; Potaczek i wsp., *Immunogenetics* 2009;61:649-55)], to nie jest całkiem pewne w jaki sposób wywołane zmiennością genetyczną różnice w ekspresji FcεRIα/FcεRI mogą wpływać na stężenie IgE. Istnieje jednak szereg odnośnych hipotez, takich jak wpływ FcεRIα/FcεRI na stabilizację cząsteczek IgE, pętla obejmująca alergen-IgE-FcεRI-aktywowane granulocyty zasadochłonne i komórki tuczne zwrotnie stymulujące limfocyty B do produkcji (większych ilości) IgE, czy też wpływ cząsteczek FcεRIα/FcεRI obecnych na powierzchni klasycznych i nieklasycznych APC na prezentację antygeny (Potaczek i wsp., *Immunol Res* 2009;45:75-84; Potaczek & Kabesch, *Clin Exp Allergy* 2012;42:852-71).

Podobnie jak w przypadku *FCER1A*, również i dla *FCER2* w momencie rozpoczęcia badań nie wiadomo było jakie będą wyniki ewentualnych GWAS analizujących całkowite stężenie IgE i czy takie badania zostaną w ogóle przeprowadzone. Choć jak się później, już w trakcie opisywanych tutaj badań, okazało *FCER2* nie należał do najsilniejszych sygnałów asocjacyjnych GWAS, nie oznacza to iż nie odrywa on (czy też jego zmienność genetyczna) ważnej roli w regulacji IgE. Przeciwnie, CD23 jest kluczową cząsteczką kontrolującą stężenie IgE w surowicy (Hibbert i wsp., *J Exp Med* 2005;202:751-60; Gould, Sutton. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17; Gould, i wsp. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:579-628), który to mechanizm jest dużo bardziej scharakteryzowany niż w przypadku FcεRIα/FcεRI. Jest ponadto wysoce prawdopodobne, że czynnościowe polimorfizmy *FCER2* (Tantisira i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1285-91; Meng i wsp., *Genes Immun* 2007;8:215-23; Potaczek i wsp., *Tissue Antigens* 2009;74:534-8) mogą wpływać na stężenie IgE w surowicy w pewnych specyficznych podgrupach badanych, np. w kohortach poddanych stratyfikacji względem głównych genetycznych determinant IgE (Sharma i wsp., *Allergy* 2014;69:231-6), czy u leczonych wziewnymi kortykosteroidami dzieci z astmą (Tantisira et al., *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1285-91).

Podjęcie badań nad wpływem zmienności genetycznej *TLR2* na całkowite stężenie IgE w surowicy ma nie tylko uzasadnienie biologiczne w kontekście roli *TLR2 per se* (Tesse i wsp., *Allergy* 2011;66:307-16), ale także wzięwszy pod uwagę istnienie odgrywających rolę w rozwoju chorób alergicznych interakcji między *TLR2* a FcεRIα/FcεRI (Novak & Bieber, *Curr Probl Dermatol*, 2011;41:47-53; Herrmann i wsp., *Allergy* 2013;68:621-8; Song i wsp., *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:2169-76). Wydaje się, że naturalną kontynuacją wyników przedstawionych w niniejszym osiągnięciu byłoby zbadanie wpływu interakcji między wariantami genetycznymi *TLR2* i *FCER1A* w determinacji IgE w surowicy, ciężkości AZS (Oh i wsp., *Allergy* 2009;64:1608-15), a także innych parametrów alergologicznych.

Jakie znaczenie mają badania nad całkowitym stężeniem IgE w surowicy i jego determinantami genetycznymi dla alergologii? W modelach miejscowej syntezy IgE wykazano, iż IgE przeciwko swoistemu alergenowi może stanowić nawet do około połowy całkowitej ilości wyprodukowanego IgE (Smurthwaite i wsp., *Eur J Immunol* 2001;31:3422-32; Gould, i wsp. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:579-628). Zależność ta widoczna jest także we krwi, gdzie swoiste IgE może odpowiadać nawet prawie jednej czwartej całkowitego IgE (Gusareva i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:781; Erwin and Platts-Mills, *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:781-2; Erwin i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:359-65; Tsai i wsp., *J Asthma* 1988;25:7-13). Chociaż całkowite stężenie IgE dobrze koreluje z istnieniem skłonności atopowej (Ott i wsp., *Acta Derm Venereol* 2009;89:257-61; Potaczek i wsp., *Allergol Int* 2014;63:485-6), to jednak nie jest już zbyt często używane do diagnostyki uczuleń, gdzie zastąpione zostało m.in. przez metody bezpośrednie (swoiste IgE w surowicy) lub pośrednie (np. testy skórne). Ponadto, korelacja wyników badań genetycznych (zwłaszcza tych z ery GWAS i post-GWAS) nad całkowitym stężeniem IgE w surowicy i swoistymi chorobami alergicznymi jest dość umiarkowana (np. Weidinger i wsp., *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:408-17), i jeśli już, dotyczy głównie ewentualnie ANN czy astmy atopowej jak to pokazuje m.in. niniejsze osiągnięcie naukowe. Dlatego, główną rolą badań genetycznych nad całkowitym IgE wydaje się być dokładne zrozumienie mechanizmów (funkcjonowania i regulacji) systemu IgE oraz tych leżących u podłoża rozwoju niektórych, zwłaszcza tych „bardziej atopowych”, fenotypów chorób alergicznych. Wyznacza to dalszą perspektywę badań genetycznych nad systemem IgE, częściowo także w kontekście nieujętych tutaj zaburzeń jednogenowych (m.in. Ozcan i wsp., *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:1054-62; Altin i wsp., *Blood Rev* 2010;24:163-9; Minegishi, *Curr Opin Immunol* 2009;21:487-92). Innymi kierunkami badań genetycznych nad układem IgE może stać się jego rola w odpowiedzi przeciwnowotworowej stanowiąca domenę nowej gałęzi biomedycyny, tzw. alergo-onkologii (Jensen-Jarolim i wsp., *Allergy* 2008;63:1255-66), oraz jego powiązań z układami krążenia i hemostazy, które to również zarysowano w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego.

##### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych):

Oprócz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego opisanego w punkcie 4 niniejszego autoreferatu [7 oryginalnych publikacji abstraktowanych, 2 listy do edytora zawierające dane oryginalne, 3 prace poglądowe; w sumie 12 artykułów; we wszystkich tych pracach jestem pierwszym bądź ostatnim (współ-)autorem] opublikowałem 50 innych artykułów naukowych (w tym ponad 20 oryginalnych publikacji abstraktowanych, ponad 20 listów do edytora będących krótkimi pracami relacjonującymi dane oryginalne (w tym opisy przypadków klinicznych) lub komentarzami do artykułów innych autorów, i

4 prace poglądowe). W większości tych prac byłem pierwszym (współ-)autorem. Podsumowując, wliczając osiągnięcia naukowe, opublikowałem ponad 60 prac naukowych, z czego absolutną większość w periodykach z „impact factor”. Oprócz tego, wyniki moich badań były przedstawiane na konferencjach, krajowych (Polska, Japonia, Niemcy) i międzynarodowych. Tematyka badań genetycznych, w których brałem czy biorę obecnie udział to oprócz genetycznego i epigenetycznego podłoża regulacji układu IgE i chorób alergicznych także, choć dużo mniejszym zakresie, genetyka innych schorzeń wielogenowych, w tym o podłożu miażdżycowym, chorób krzepnięcia oraz chorób (auto-)immunologicznych, farmakogenetyka, a ponadto zaburzenia jednogenowe układów hemostazy i krążenia. Inne tematy to same zaburzenia krzepnięcia (bez komponenty genetycznej) badane w różnych grupach chorych, a także kliniczne badania farmakologiczne. Pracuję również nad rozwojem nowych leków opartych o strategię antysensowną, przede wszystkim przeciwko rinowirusom, a ponadto kontynuuję badania epigenetyczne i prowadzę badania podstawowe nad mechanizmami rozwoju astmy i innych chorób alergicznych.

W ramach swoich działań naukowych byłem/jestem bardzo aktywnym członkiem kilku konsorcjów i(lub) sieci o charakterze krajowym (Niemcy) oraz międzynarodowym (np. [http://www.predicta.eu/images/PreDicta\\_Newsletter\\_pdf\\_web130215.pdf](http://www.predicta.eu/images/PreDicta_Newsletter_pdf_web130215.pdf), str. 5), w ramach których prowadzone są programy naukowe i wykonywane granty badawcze. W obrębie jednego z nich, Deutsche Zentrum für Lungenforschung (DZL), jestem od stycznia bieżącego roku liderem własnej grupy badawczej (DZL junior group leader; DZL Juniorgruppenleiter). Moje doświadczenie w pracy za granicą obejmuje ponad 7,5 roku w okresie 2007-2012 [Japonia, Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine, Tokio, Japonia; Department of Pediatric Pneumology, Allergy and Neonatology, Hannover Medical School, Hanower, Niemcy] oraz 2013-obecnie (Institute of Laboratory Medicine, Philipps-University Marburg, Marburg, Niemcy) i ciągle wzrasta. Choć większość czasu ze swojej pracy naukowej działałem zagranicą, to zawsze ściśle współpracowałem z ośrodkami polskimi, najpierw z Profesorami Markiem Sanakiem i ś.p. Andrzejem Szczeklikiem z II Katedry Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, a potem z Panią Profesor Anettą Undas z Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w Krakowie oraz Instytutu Kardiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, czego dowodem są liczne wspólnie opublikowane prace. Ponadto współpracuję w uczonymi z Polski w ramach innych formalnych i nieformalnych projektów międzynarodowych. Swój wkład w krajową i międzynarodową działalność naukową uzupełniam także aktywną, zwłaszcza w okresie ostatnich dwóch lat, pracą recenzencką (np. [http://pamw.pl/sites/default/files/NA\\_Gajos\\_Undas\\_editorial.pdf](http://pamw.pl/sites/default/files/NA_Gajos_Undas_editorial.pdf)).

Badania naukowe łączę z działalnością dydaktyczną w Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Marburg, Marburg, Niemcy, do której to w sensie regularnych zajęć ze studentami powróciłem po kilku latach przerwy w roku 2014. Wcześniej, w latach 2004-2007 prowadziłem liczne zajęcia ze studentami na terenie II Katedry Chorób Wewnętrznych (Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków). Ponadto od kilku lat systematycznie nadzoruję, jako opiekun oddelegowany przez/w zastępstwie opiekuna oficjalnego/formalnego, różnego rodzaju studentów, praktykantów oraz czy dyplomantów, w tym doktorantów.

W ramach popularyzacji nauki, za swój obowiązek uważam także przybliżanie jej osiągnięć szerszym gremiom. Dlatego przez wiele lat współpracowałem z wydawnictwem Medycyna Praktyczna, a także opublikowałem kilka prac popularnonaukowych (np. <http://charaktery.eu/arttykul/uczuleni-na-wszystko>).

Kraków, 25.05.2016

  
(Daniel Piotr Potaczek)