Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie, Nowoursynowska 159, 02-776
Rada Nauki Instytutu Biologii,
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Patryk Tadeusz Krzemiński
(imię i nazwisko wnioskodawcy)
Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,
(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Wniosek

z dnia 27-12-2021

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie[1] nauki biologiczne

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego:

Cykl artykułów naukowych powiązanych tematem:

"Wpływ wybranych zmian genetycznych i epigenetycznych na patogenezę szpiczaka plazmocytowego"

Wnioskuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~**tajnym**~~**/jawnym***[2]

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl , tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Patryk Krzemiński
.....
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki: 1. Dane wnioskodawcy; 2. Kopia dyplomu potwierdzająca posiadanie stopnia doktora nauk biologicznych; 3. Autoreferat; 4. Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych stanowiący znaczny wkład w rozwój dyscypliny; 5. Oświadczenia współautorów; 6. Kopie publikacji naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe;7. Wniosek przewodni w języku angielskim; 8. Dane wnioskodawcy wersja w języku angielskim; 9. Autoreferat wersja w języku angielskim; 10. Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych stanowiący znaczny wkład w rozwój dyscypliny wersja w języku angielskim

[1] Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

[2] * Niepotrzebne skreślić.

Załącznik 3

AUTOREFERAT

dr inż. Patryk Krzemiński

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa 2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko 3

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej 3

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.... 4

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). 5

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego 5

4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe 5

4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania 7

4.4. Wpływ dzieła na rozwój dyscypliny (biologia/medycyna), rozwój cywilizacyjny i postęp w leczeniu nowotworów 25

4.5. Najistotniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań: 26

4.6. Piśmiennictwo 27

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. 35

6.1. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z jednostkami krajowymi: 37

6.2. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z jednostkami zagranicznymi: 37

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę. 38

7.1. Działalność dydaktyczna 38

7.2. Opracowanie oraz realizacja zajęć dydaktycznych 38

7.3. Działalność organizacyjna 40

7.4. Działalność popularno-naukowa 40

7.5. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych 40

7.6. Recenzje prac dyplomowych 41

7.7. Opieka naukowa 41

7.7.1 Opieka naukowa nad doktorantami podczas stażu w Hiszpanii 41

7.7.2. Opieka naukowa realizowana w ramach wymiany międzynarodowej 42

7.7.3. Opieka naukowa nad doktorantami 42

7.7.4. Opieka naukowa nad studentami 42

8. Inne informacje 43

8.1. Najważniejsze szkolenia naukowe 43

1. Imię i nazwisko

Patryk Krzemiński

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne - z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1998 - 2003	Jednolite studia magisterskie Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, specjalizacja: biotechnologia w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt
2003	Tytuł magistra inżyniera biotechnologii, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca zrealizowana w Pracowni Regulacji Transkrypcji w Instytucie Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego, Warszawa, Polska Akademia Nauk Tytuł pracy magisterskiej: "*Rola szlaku kinazy PI3K/AKT w apoptozie komórek glejaka linii C6 indukowanej UVC*" Promotor- Prof. dr hab. Bożena Kamińska
2008	Tytuł doktora nauk biologicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego, Warszawa, Polska Akademia Nauk na podstawie rozprawy: *"Występowanie i aktywność wybranych receptorów nukleotydowych w nowotworowych liniach komórkowych pochodzenia glejowego"* Promotor- Prof. dr hab. Jolanta Barańska, Instytut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego, Warszawa, Polska Akademia Nauk Recenzenci: Prof. dr hab. Irena Nalepa (Uniwersytet Jagielloński, Kraków). Prof. dr hab. Bożena Kamińska (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa, Polska Akademia Nauk).

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2008-2009	Wykładowca biochemii na kierunku: Fizjoterapia, II Wydział Lekarski Warszawski Uniwersytet Medyczny
2009-2009	Starszy ekspert Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa
2009-2011	Staż podoktorski Centrum Badań nad Rakiem, Salamanka, Hiszpania, (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España)
2011-2020	Staż podoktorski Wydział Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Salamance, Hiszpania, (Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, España)
2020-	Adiunkt, Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Wpływ wybranych zmian genetycznych i epigenetycznych na patogenezę szpiczaka plazmocytowego"

4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe

Przedmiotem postępowania habilitacyjnego jest cykl 5 prac opublikowanych w latach 2015-2020, czterech artykułów eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, o łącznym IF=23.81

P1. **Krzemiński Patryk**, Sarasquete E María, Misiewicz-Krzemińska Irena, Corral Rocío, Corchete A Luis, Martín A Ana, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma.
Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849 (3): 353-366.
IF_{2015}=6.26, punkty $MNiSW_{2015}$=40, Liczba cytowań do 30/11/2021: 16(19)

P2. **Krzemiński Patryk**, Corchete A Luis, García L Juan, López-Corral Lucia, Fermiñán Encarna, García M Eva, Martín A Ana, Hernández-Rivas M Jesús, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse.
Oncotarget, 2016, 7; (49): 80664-80679.
IF_{2016}=5.32, punkty $MNiSW_{2016}$=40, Liczba cytowań do 30/11/2021: 11(10)

P3. Misiewicz-Krzemińska Irena, **Krzemiński Patryk**, Corchete A Luis, Quwaider Dalia, Rojas A Elizabeta, Herrero Ana Belén, Gutiérrez C Norma.
Factors regulating microRNA expression and function in multiple myeloma.
Non-coding RNA, 2019, Jan 16; 5(1): 9.
IF_{2019}=2.03, punkty $MNiSW_{2019}$=20, liczba cytowań do 30/11/2021: 13(13)

P4. **Krzemiński Patryk**, García-Sanz Ramón, Gutiérrez C Norma.
Zebularine-induced myeloma cell death is accompanied by decreased c-Myc expression.
Cellular oncology (Dordrecht), 2020, Aug; 43(4): 743-750.
IF_{2020}=5.3, punkty $MNiSW_{2020}$=100, liczba cytowań do 30/11/2021: 2(2)

P5. Misiewicz-Krzemińska Irena, de Ramón Cristina, Corchete A Luis, **Krzemiński Patryk**, Rojas A Elizabeta, Isidro Isabel, García-Sanz Ramón, Martínez-López Javier, Oriol Albert, Bladé Juab, Lahuerta J Juan, San Miguel F Jesus, Rosiñol Laura, Mateos V Maria, Gutiérrez C Norma. ***Quantitative expression of Ikaros, IRF4, and PSMD10 proteins predicts survival in VRD-treated patients with multiple myeloma.***
Blood Advances, 2020, Dec 8; 4(23): 6023-6033.
IF_{2020}=4.9, punkty $MNiSW_{2020}$=40, liczba cytowań do 30/11/2021: 2(2)

Opisy mojego wkładu w powstanie każdej publikacji znajdują się w załączniku: 4

Oświadczenia współautorów o wkładzie autorskim znajdują się w załączniku: 10

Całkowity Impact Factor wymienionych prac, na rok publikacji: **23,81**

Całkowita liczba punktów MNiSW powyższych prac, na rok publikacji: **240**

4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie i hipoteza

Szpiczak plazmocytowy (ang. Myeloma Multiple, MM) jest nowotworem złośliwym krwi pochodzącym z końcowo zróżnicowanych limfocytów B- komórek plazmatycznych (ang. Plasma cells) (Bolli et al., 2020; Kyle i Rajkumar, 2008). Szpiczak plazmocytowy rozwija się zazwyczaj ze stadiów poprzedzających takich jak Monoklonalna Gammopatia o Nieznanym Znaczeniu (ang. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance; MGUS) czy tzw. „tlącego się szpiczaka" (ang. Smoldering Myeloma; SMM) (Landgren et al., 2009; López-Corral et al., 2011). Cechą charakterystyczną szpiczaka jest klonalna ekspansja komórek plazmatycznych wytwarzających uszkodzone, niepełnowartościowe przeciwciała oraz występowanie wielu zmian genetycznych, głównie na poziomie struktury chromosomów.

Najważniejszymi aberracjami chromosomowymi są: utrata 1p, nabycie 1q, utrata 13q, utrata 17p, t(4:14), t(14:16), t(11:14) i t(14:20) wiążące się z deregulacją między innymi genów *RB, Cyklin D, MMSET/FGFR3* i *MAF* w zależności od aberracji (Liebisch i Döhner, 2006; Manier et al., 2016; Yellapantula et al., 2019). Występują też zmiany ilości chromosomów, najczęściej trisomie chromosomów: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 i 21 (Bergsagel i Kuehl, 2005; Zhan et al., 2006). Wtórne translokacje i mutacje nabyte podczas progresji choroby obejmują translokacje i nasiloną ekspresję *cMyc* (Barwick et al., 2019) oraz nasiloną ekspresję i mutacje związane z uzyskaniem onkogennej funkcji w białkach, takich jak: *BRAF, CCND1, KRAS* i *NRAS* (Bergsagel i Kuehl, 2018; Walker et al., 2018; Xu et al., 2017). Rozwój szpiczaka łączy się z utratą funkcji prawidłowego działania supresorów nowotworów takich jak: p53 (Zmorzynski et al., 2017), RB1 (Juge-Morineau et al., 1997) i DIS3 (Lionetti et al., 2015). Występowanie wielu zmian genetycznych jak i zdolność komórek szpiczaka do wzrostu w postaci heterogennej populacji klonalnej uniemożliwia praktycznie stosowanie terapii jednym związkiem, tzw. monoterapii. W leczeniu szpiczaka stosowanych jest wiele schematów leczenia (Mateos et al., 2019; Rajkumar i Kumar, 2020) uwzgledniających często kombinację trzech leków takich jak: glikokortykoidy (Dexametazon, Prednizon) inhibitory proteasomu (Bortezomib - Velcade®), związki immunomodulujące (Talidomid, (Lenalidomid - Revlimid®)), inhibitory deacetylaz histonów (Panobinostat) i przeciwciała monoklonalne wiążące CD38 (Daratumumab). Stosowanie nowych leków znacznie wydłużyło czas przeżycia chorych na szpiczaka plazmocytowego (Langseth et al., 2020), jednak choroba ta wciąż pozostaje nieuleczalna (Neuse et al., 2020). Większość pacjentów

pomimo początkowo dobrej odpowiedzi na leczenie umiera z powodu zakażeń albo wznowy choroby (Bazarbachi et al., 2019). Uzasadnia to potrzebę prowadzenia badań podstawowych, które mogłyby doprowadzić do identyfikacji nowych celów terapeutycznych i pozwolić na lepsze diagnozowanie szpiczaka.

Jedną z możliwości jest badanie zmian epigenetycznych, obejmujących między innymi metylację DNA. Metylacja nukleotydów cytozyny będącej w parze z nukleotydami guanozyny (CpG) występująca w obrębie sekwencji regulatorowych genów jest, w większości przypadków, odpowiedzialna za wyciszanie ekspresji (Bird i Wolffe, 1999). Geny posiadające zagęszczenie par CpG (tzw. wyspę CpG), „zmetylowane" w obszarze promotora, przeważnie nie ulegają transkrypcji. Jednocześnie, brak metylacji DNA nie oznacza automatycznie wysokiego poziomu ekspresji danego genu ponieważ ekspresja może być regulowana przez inne czynniki i mechanizmy. Metylacja DNA jest procesem odwracalnym, realizowanym przy udziale enzymów metylotransferaz DNA takich jak DNMT1, DNMT3a i DNMT3b (ang. DNMT- DNA methyltransferase) które metylują DNA, oraz enzymów z rodziny TET (ang. ten-eleven translocation (TET)) które kontrolują proces demetylacji DNA. Poziom metylacji DNA może być też obniżony w wyniku działania związków hamujących działanie metylotransferaz DNA, będących najczęściej analogami nukleozydów takimi jak decytabina (Dacogen®) czy 5-azacytydyna (Vidaza®) (Gnyszka et al., 2013). Inhibitory metylacji DNA nie są stosowane w leczeniu szpiczaka aczkolwiek trwają badania kliniczne mające na celu ocenę działania 5-azacytydyny w kombinacji z zaaprobowanymi lekami (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01155583, NCT04407442), (Khouri et al., 2021).

Komórki szpiczaka w porównaniu do innych nowotworów wykazują ogólnie niski poziom metylacji DNA (Salhia et al., 2010), co jednak nie oznacza, że ten sposób regulacji ekspresji genów jest w szpiczaku bez znaczenia. Porównanie normalnych komórek plazmatycznych, stadiów przed nowotworowych (MGUS i SMM) z szpiczakiem plazmocytowym ujawniło postępujące obniżanie się ogólnej metylacji DNA (Walker et al., 2011; Heuck et al., 2013; Agirre et al., 2015). W szpiczaku plazmocytowym zidentyfikowano również specyficzne defekty epigenetyczne, obejmujące obniżoną metylację sekwencji retrotranspozonowych takich jak LINE-1, Alu i SAT-a, co korelowało z niestabilnością genomową, progresją choroby i złym rokowaniem (Aoki et al., 2012; Bollati et al., 2009).

Warto jednak pamiętać, że metylacja określonych sekwencji regulatorowych wzrastała w czasie progresji szpiczaka, osiągając maksimum w stadium białaczki z komórek plazmatycznych (PCL) (Walker et al., 2011). Opisano również wyższą częstość występowania

hipermetylowanych genów u pacjentów z translokacją t(4:14), co wiązało się ze złym rokowaniem (Smith et al., 2010).

Najważniejszymi genami dla których opisano w szpiczaku plazmocytowym epigenetyczną regulację ekspresji były: *BNIP3, CDKN2A, CDKN2C, DAPK1, DIS3, E-CAD, p15, p16, p53, p73* i *RB1* (Wong i Chim, 2015). Warto zauważyć, że hipermetylacja promotorów genów*, BNIP3, DAPK1, p16* i *E-CAD* była powiązana ze złym rokowaniem (Kaiser et al., 2013; Kristensen et al., 2014; Martínez-Baños et al., 2017; Wong i Chim, 2015) co może być kluczowe dla rozwoju szpiczaka plazmocytowego (Kaiser et al., 2013) (Galm et al., 2004; Sharma et al., 2010).

Dostępne publikacje wskazują, że mechanizm regulacji genów związanych z stabilnością genetyczną, przeżywalnością i cyklem komórkowym był i jest przedmiotem wielu badań. Z drugiej strony przyczyny obniżonej ekspresji sekwencji DNA niekodujących białek w tym kodujących mikroRNA pozostają mniej poznane. W szpiczaku plazmocytowym zaburzenia ekspresji mikroRNA są łączone z określonymi translokacjami (Gutiérrez et al., 2010; Saki et al., 2014) jednak podłoże genetyczne nie wyjaśnia wszystkich obserwowanych zmian. Poznanie mechanizmów kontrolujących ekspresję mikroRNA jest szczególnie istotne ze względu na charakter oddziaływania biologicznego tych krótkich (20-24pz) cząsteczek RNA. Co więcej, poziom ekspresji wybranych mikroRNA może stanowić podstawę opracowania nowych wskaźników prognostycznych (Katiyar et al., 2021). Poszczególne mikroRNA mogą obniżać ekspresje setek transkryptów często wpływając na wiele szlaków sygnałowych (Makeyev i Maniatis, 2008). MikroRNA mogą prowadzić do degradacji, destabilizacji transkryptu, zahamowania translacji w zależności od tego w jaki sposób i w jakim rejonie transkryptu ulegają przyłączaniu. Mogą również oddziaływać na metylację DNA (Hu et al., 2014), a ich ekspresja może być regulowane epigenetycznie.

Mechanizmy regulacji ekspresji mikroRNA i ich rola zostały opisane w pracy przeglądowej:

Factors regulating microRNA expression and function in multiple myeloma.
Misiewicz-Krzemińska Irena, Krzemiński Patryk, Corchete A Luis, Quwaider Dalia, Rojas A Elizabeta, Herrero Ana Belén, Gutiérrez C Norma.
Non-coding RNA, 2019, 5; (1): 9.

W komórkach szpiczaka plazmocytowego zaobserwowano zwiększoną, w porównaniu do normalnych komórek plazmatycznych, metylację sekwencji regulujących ekspresję następujących mikroRNA: *mikroRNA10b-5p, mikroRNA152 i mikroRNA203* (Wong et al., 2011a; Zhang et al., 2014; Li et al., 2018). Podczas progresji choroby z MGUS do szpiczaka, a także w nawrotowym szpiczaku zaobserwowano zwiększoną metylację mikroRNA34b/c, mikroRNA129-2 mikroRNA375, mikroRNA342-3p i mikroRNA1258 (Wong et al., 2011b) (Wang et al., 2020). (Zhang et al., 2014) (Wong et al., 2012).

MikroRNA nie tylko same podlegają regulacji poprzez metylację, ale mogą też wpływać na maszynerię epigenetyczną poprzez modulowanie ekspresji enzymów, takich jak metylotransferazy DNA (*DNMT1, DNMT3a* i *DNMT3b*) lub metylotransferazy histonów (Chuang i Jones, 2007). Takie mikroRNA są często uważane za rodzinę epigenetycznych mikroRNA, „epi-mikroRNA" (Rastgoo et al., 2017). W szpiczaku wykazano, że *DNMT1* jest genem regulowanym przez mikroRNA152 (Xu et al., 2015). Wprowadzenie mikroRNA152 do komórek szpiczaka powodowało zmniejszenie ekspresji *DNMT1* i dodatkowo *E2F3* (Zhang et al., 2014). Ponadto, mikroRNA29b obniżało ekspresję *DNMT3A* i *DNMT3B* i zmniejszało ogólny poziom metylacji DNA (Amodio et al., 2012). Odkryto również, że mikroRNA29b może hamować ekspresję *MCL-1* (Zhang et al., 2011) oraz *CDK6, PSME4* i *HDAC4*. (Amodio et al., 2012; Jagannathan et al., 2015; Amodio et al., 2016). Co ciekawe, nasiloną ekspresję *mikroRNA29b* obserwowano przy obniżeniu ilości białka metylotransferazy histonowej EZH2 (Stamato et al., 2017).

Wspomniane oddziaływania wskazują na powiązanie między modyfikacjami epigenetycznymi, lekoopornością i apoptozą w komórkach szpiczaka. Uzasadnione jest więc prowadzenie badań łączących informacje epigenetyczne z genetycznymi w celu lepszego poznania choroby i sprawniejszego diagnozowania.

Stan wiedzy przedstawiony w powyższych publikacjach, a także wyniki innych autorów pozwoliły na postawienie hipotezy badawczej:

Modyfikacje epigenetyczne wraz ze zmianami genetycznymi wpływają na rozwój szpiczaka plazmocytowego

Hipotezę weryfikowano poprzez realizację następujących zadań badawczych:

- Zbadanie wpływu metylacji DNA na ekspresję mikroRNA w szpiczaku plazmocytowym na przykładzie *mikroRNA155*
- Zbadanie zależności między zmianami genetycznymi, metylacją oraz profilem ekspresji genów w dwóch stadiach szpiczaka plazmocytowego.
- Zbadanie działania zebularyny, jako potencjalnego czynnika cytotoksycznego o właściwościach hipometylujących DNA i blokujących działanie deaminazy cytydyny.
- Ocena potencjału prognostycznego ekspresji wybranych białek u pacjentów chorych na szpiczaka i posiadających różne aberracje genetyczne.

Moje badania naukowe miały na celu znalezienie odpowiedzi na następujące pytania:

- Jaka jest rola obniżania ekspresji genów poprzez metylację DNA?
- Czy dalsze obniżanie metylacji DNA może mieć efekt antyszpiczakowy?
- Jaka jest zależność między zmianami genetycznymi a metylacją DNA w komórkach szpiczaka podczas rozwoju choroby?
- Czy zmiany genetyczne występujące w szpiczaku pozwalają na znalezienie białkowych wskaźników rozwoju choroby?

Mechanizmy regulacji ekspresji *mikroRNA155* w szpiczaku plazmocytowym

Publikacja oryginalna:

***Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma*.**
Krzemiński Patryk, Sarasquete E María, Misiewicz-Krzemińska Irena, Corral Rocío, Corchete A Luis, Martín Ana, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2015 Mar; 1849(3): 353-366.

Celem badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie jakie mechanizmy wpływają na ekspresję mikroRNA155, czy jest to metylacja DNA oraz jaka może być ich rola biologiczna.

W komórkach szpiczaka pobranych od pacjentów wykryto szereg mikroRNA wykazujących niższą ekspresje w porównaniu do normalnych komórek plazmocytowych (Gutiérrez et al., 2010). Mechanizmy odpowiedzialne za niską ekspresje tych mikroRNA pozostawały i pozostają niewystarczająco zbadane. Jednym z mikroRNA o niższej ekspresji u pacjentów chorych na szpiczaka było *mikroRNA155*, który odgrywa kluczową rolę w prawidłowym rozwoju komórek B, limfomagenezie (Thai et al., 2007) i regulacji odpowiedzi immunologicznej (Mashima, 2015). MikroRNA155 może powodować, między innymi, obniżenie ekspresji transkryptów takich jak: *PD-L1* (Huang et al., 2020), *PI3KR1* (Fan et al., 2020), *DEPTOR* (Jabłońska et al., 2020), *SHIP-1* (Kurowska-Stolarska et al., 2010), *BCL-6* (Nazari-Jahantigh et al., 2012) czy receptora dla *IL-13* (Gwiggner et al., 2018). Dane dotyczące mikroRNA155 w szpiczaku były skromne, co uzasadniało zbadanie wpływu wybranych modyfikacji epigenetycznych na poziom ekspresji tego mikroRNA.

Najpierw sprawdziłem ekspresję *mikroRNA155* w 11 liniach komórkowych szpiczaka. Wybrane linie komórkowe posiadały pełen zakres podstawowych aberracji genetycznych takich jak translokacje t(4:14) - linie H929 i OPM2, translokacje t(14:16) - linie JJN3, RPMI, MM1s i MM1r, translokacje t(11:14) - linie KMS12-BM, KMS12-PE i U266. Dodatkowo, wybrane linie komórkowe były zróżnicowane pod względem białka p53. Linia komórkowa JJN3 nie posiadała p53 w wyniku biallelicznej delecji. W liniach MM1s i H929, *p53* było niezmutowane. W pozostałych liniach komórkowych *p53* było zmutowane. Najpierw testowałem hipotezę: obniżony poziom ekspresji *mikroRNA155* jest uzależniony od zmian genetycznych i występuje tylko w określonym podtypie szpiczaka. Wyniki eksperymentów z wykorzystaniem linii

komórkowych o szerokim wachlarzu aberracji genetycznych pokazały, że te same aberracje genetyczne nie są odpowiedzialne za wysoką ekspresję *mikroRNA155*.

Wynik ten pozwolił mi zauważyć brak korelacji między translokacjami chromosomowymi a wysokim poziom ekspresji tego mikroRNA. Dodatkowo, w dwóch liniach komórkowych (KMS12PE i KMS12BM) zaobserwowałem, różny poziom ekspresji *mikroRNA155.* Linie KMS12BM i KMS12PE były wyizolowane od tego samego pacjenta, ale w różnych stadiach rozwoju choroby. KMS12PE jest uważana za bardziej zaawansowane stadium szpiczaka, (chociaż została wyizolowana wcześniej niż linia KMS12BM) i posiadała wyższy poziom ekspresji *mikroRNA155* niż KMS12BM. Pozostałe linie komórkowe posiadały niski poziom ekspresji *mikroRNA155* tak więc zasadne było kontynuowanie badań mających na celu wyjaśnienie przyczyn zaistniałego stanu. Jednocześnie, w celu potwierdzenia wcześniejszych danych otrzymanych przy pomocy wysokoprzepustowych technik, zmierzono poziom ekspresji *mikroRNA155* w próbkach wyizolowanych od ponad 90 pacjentów chorych na szpiczaka. U większości pacjentów zaobserwowano niską ekspresję *mikroRNA155*.

Na podstawie otrzymanych wyników, postawiłem kolejną hipotezę: niski poziom ekspresji *mikroRNA155* jest ważny dla rozwoju szpiczaka. W celu weryfikacji hipotezy postanowiłem uzupełnić badania i porównać poziom ekspresji *mikroRNA155* w próbkach RNA wyizolowanych od pacjentów w momencie zdiagnozowania szpiczaka i w momencie pierwszego nawrotu choroby. U większości pacjentów po zdiagnozowaniu nawrotu szpiczaka, obserwowano obniżenie ekspresji *mikroRNA155* aczkolwiek byli pacjenci u których występowała odwrotna tendencja. Różny poziom ekspresji *mikroRNA155* zarówno wśród pacjentów podczas zdiagnozowania szpiczak, jak i podczas rozwoju choroby skłonił mnie do zbadania związku między przeżywalnością pacjentów a poziomem ekspresji *mikroRNA155*. Wyniki tej analizy pokazały, że wyższy poziom *mikroRNA155,* jest dla chorych na szpiczaka, dobrym czynnikiem prognostycznym łączącym się z dłuższym czasem całkowitego przeżycia. Podobne wyniki zaobserwowano później dla pacjentów chorych na Rozlanego Chłoniaka z Dużych Komórek B (ang. Diffuse large B-cell lymphoma-DLBCL) (Due et al., 2019). Otrzymane wyniki badań skłoniły mnie do poszukiwania mechanizmów mogących regulować ekspresję *mikroRNA155* w komórkach szpiczaka.

Poziom ekspresji *mikroRNA*, może być regulowany przez wiele czynników, w tym epigenetycznych, obejmujących metylację DNA. Mając na celu poszerzenie wiedzy dotyczącej mikroRNA155, postawiłem hipotezę: metylacja DNA bierze udział w regulacji ekspresji *mikroRNA155* w szpiczaku plazmocytowym. Weryfikując hipotezę, najpierw wykonałem analizę

metylacji DNA w obrębie promotora genu za pomocą metody MSP-PCR (ang. Methylation specific PCR). Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło mi stwierdzić, że analizowane DNA w liniach posiadających wysoki poziom *mikroRNA155* jest niezmetylowane. Jednocześnie w przypadku niskiej ekspresji *mikroRNA155,* DNA było zmetylowane lub nie, w zależności od badanej linii komórkowej.

W celu potwierdzenia otrzymanych wyników doświadczeń zdecydowałem się na sprawdzenie metylacji dwóch fragmentów promotora genu gospodarza mikroRNA155. Metodą z wyboru było sekwencjonowanie metodą SANGER sklonowanych produktów PCR otrzymanych przy użyciu matrycy DNA traktowanej wodorosiarczynem sodu. Dane otrzymane z tego doświadczenia potwierdziły wcześniejsze wyniki jednocześnie ujawniając zmiany związane z określonymi translokacjami chromosomowymi. Wyższy poziom metylacji promotora mikroRNA155 występował w dwóch liniach szpiczaka posiadających translokacje t(4:14). Translokacja t(4:14) charakteryzuje się deregulacją produkcji białka MMset odpowiedzialnego za metylację histonów H3K27 i H3K36 (Chesi et al., 1998; Dring et al., 2004) co może mieć wpływ na ogólną metylację DNA (Xu et al., 2020). Moje wyniki badań wskazały na możliwość wzajemnego oddziaływania różnych mechanizmów epigenetycznych, w regulacji poziomu ekspresji *mikroRNA155*.

Mając podstawowe informacje dotyczące ekspresji i metylacji genu gospodarza mikroRNA155 w liniach komórkowych szpiczaka postawiłem hipotezę, że również w próbkach pacjentów poziom ekspresji tego mikroRNA regulowany jest epigenetycznie. Aby sprawdzić tę hipotezę zaproponowałem oznaczenie metylacji DNA promotora genu kodującego to mikroRNA w próbkach uzyskanych od pacjentów chorych na szpiczaka, tych samych u których wcześniej skorelowano poziom *mikroRNA155* z przeżywalnością oraz rozwojem choroby. W większości przeanalizowanych próbek w których wykryto zmniejszoną ekspresję *mikroRNA155* w czasie wznowy choroby co było związane z obniżeniem metylacji analizowanych fragmentów DNA. Otrzymane dane pozwoliły wykryć udział metylacji DNA w regulacji ekspresji badanego mikroRNA, jednakże były danymi obserwacyjnymi.

W celu dostarczenia informacji przyczynowo-skutkowych, zdecydowałem się na przeprowadzanie następujących doświadczeń. Najpierw postanowiłem zbadać wpływ decytabiny, inhibitora metylacji DNA, na poziom ekspresji *mikroRNA155*. Wyniki tego doświadczenia pokazały, że farmakologiczne hamowanie metylacji może podnieść poziom ekspresji *mikroRNA155*. Następnie zdecydowałem się na sklonowanie fragmentu promotora genu gospodarza mikroRNA155 do wektora plazmidowego kodującego gen reporterowy

lucyferazy, który jednocześnie umożliwił przeprowadzenie metylacji *in vitro*. Otrzymany konstrukt był metylowany *in vitro* i wprowadzany na drodze elektroporacji (metoda transfekcji) do wybranych linii komórkowych szpiczaka. Porównanie wartości luminescencji między komórkami transfekowanymi zmetylowanym i nie zmetylowanym konstruktem potwierdziło udział metylacji w regulacji ekspresji *mikroRNA155*. Uzupełnieniem przeprowadzonego doświadczenia było spowodowanie metylacji w obrębie genu gospodarza mikroRNA155 bezpośrednio w komórkach szpiczaka linii JJN3, wykorzystując mechanizm RNA zależnej metylacji DNA - RDDM (ang. RNA directed DNA methylation) (Zhang i Zhu, 2011). W celu przeprowadzenia tego doświadczenia, do komórek wprowadziłem, za pomocą elektroporacji, krótkie sekwencje RNA komplementarne do sekwencji promotora badanego genu. W tak przygotowanych komórkach zaobserwowałem wzrost metylacji w obrębie promotora genu *mikroRNA155* i obniżenie ekspresji *mikroRNA155*, co kolejny raz potwierdziło epigenetyczny mechanizm regulacji ekspresji tego mikroRNA.

Kolejnym zagadaniem jakie zdecydowałem się badać było działanie wybranych czynników transkrypcyjnych na ekspresję *mikroRNA155.* W tym celu zdecydowałem się sprawdzić wpływ metylacji DNA na sekwencje E-Box znajdującą się w obszarze regulatorowym genu gospodarza mikroRNA155. Oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z sekwencją E-Box – cacgtg może być regulowane przez metylację DNA (Jin et al., 2016). W celu oceny wpływu metylacji, przeprowadziłem doświadczenia EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay), którego wyniki dostarczyły danych wskazujących na regulację sekwencji E-Box przez metylację DNA. Na podstawie wykonanych eksperymentów stwierdziłem, że ekspresja *mikroRNA155* może być hamowana na drodze metylacji DNA i bierze w tym procesie udział sekwencja E-Box.

Przeprowadzone doświadczenia nie dawały jednak informacji dotyczących roli wyciszenia ekspresji *mikroRNA155*, stąd postawiłem kolejną hipotezę: niska ekspresja *mikroRNA155* będąca wynikiem metylacji ma odmienny efekt od niskiej ekspresji *mikroRNA155* niewynikającej z metylacji DNA promotora genu *mikroRNA155*. W badanych liniach komórkowych szpiczaka występowała niska ekspresja *mikroRNA155* niezwiązana z metylacją DNA. Chcąc dostarczyć informacji dotyczących roli wyciszenia epigenetycznego *mikroRNA155* zdecydowałem się dokonać stymulacji, wybranych linii komórek szpiczaka, endotoksyną-lipopolisacharydem bakteryjnym- (ang. Lipopolisacharide, LPS). Lipopolisacharyd ma silne działanie prozapalne, aktywujące odpowiedź immunologiczną na poziomie organizmu jak i komórki (Zielen et al., 2015). Założeniem doświadczenia było stworzenie warunków w których może ulec podwyższeniu poziom ekspresji *mikroRNA155*. MikroRNA155 jest jednym z kluczowych mikroRNA regulujących odpowiedź immunologiczną. Wyniki doświadczenia

pokazały, że stymulacja komórek szpiczaka LPS nie prowadzi do wzrostu ekspresji *mikroRNA155* jedynie w komórkach, które posiadają silnie zmetylowany promotor genu gospodarza mikroRNA155. W komórkach, które miały niski poziom ekspresji i niski poziom metylacji inkubacja z LPS spowodowała wzrost ekspresji *mikroRNA155*. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyciagnięcie następującego wniosku: Metylacja DNA w obrębie promotora genu gospodarza mikroRNA155 jest silnym i trwałym mechanizmem ograniczającym ekspresję *mikroRNA155*.

Brak metylacji, zostawia możliwość szybkiego podwyższenia ekspresji *mikroRNA155*. Biorąc pod uwagę korelację, jaka istnieje między niskim poziomem ekspresji *mikroRNA155* a krótkim czasem przeżycia pacjentów chorych na szpiczaka plazmocytowego, zbadanie metylacji promotora mikroRNA155 w odpowiednio dużej populacji pacjentów mogłoby przyczynić się do odkrycia nowego epigenetycznego czynnika związanego z rozwojem choroby. Na podstawie doświadczeń poświęconych badaniu metylacji mikroRNA155 można zauważyć, że pomimo ogólnie niskiego poziomu metylacji DNA w komórkach szpiczaka, zastosowanie inhibitora metylacji takiego jak decytabina może spowodować wzrost ekspresji genów, których wysoka ekspresja łączy się z lepszym rokowaniem chorych.

Najważniejszym, wynikiem badań było zaobserwowanie możliwości zmiany metylacji DNA za pomocą odpowiednio zaprojektowanych sekwencji RNA wykorzystując mechanizm (ang. RDDM-RNA directed DNA methylation). Przeprowadzone badania pokazały również, że metylacja DNA genów kodujących mikroRNA jest trwałym mechanizmem wyciszania ekspresji i może być rozważana, jako potencjalny wskaźnik prognostyczny.

Przeprowadzone doświadczenia uświadomiły mi konieczność rozszerzenia skali badań. Informacje dotyczące jednego genu, np. *mikroRNA155*, chociaż ważne, trudno ekstrapolować na inne mikroRNA czy w ogóle wszystkie istotne w biologii szpiczaka geny. Dlatego w kolejnej pracy zdecydowałem wykorzystać technologie mikromacierzy żeby móc dokładniej zbadać zmiany genetyczne i epigenetyczne oraz ich wpływ na profil ekspresji genów w dwóch stadiach szpiczaka plazmocytowego.

Analiza zależności między zmianami genetycznymi, metylacją a profilem ekspresji genów w dwóch stadiach szpiczaka plazmocytowego

Publikacja oryginalna:

Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse.

Krzemiński Patryk, Corchete A Luis, García L Juan, López-Corral Lucia, Fermiñán Encarna, García M Eva, Martín A Ana, Hernández-Rivas M Jesús, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.

Oncotarget, 2016, Dec 6; 7(49): 80664-80679.

Celem badań była analiza zależności między zmianami genetycznymi, ekspresją genów i metylacją DNA na dwóch etapach rozwoju szpiczaka: zdiagnozowania choroby i jej pierwszego nawrotu.

Szpiczak plazmocytowy to nowotwór wywodzący się z końcowo zróżnicowanych limfocytów B, charakteryzujący się duża ilością zmian genetycznych oraz niską ogólną metylacją DNA. Dostępne dane literaturowe wskazują, że pomimo takiego stanu rzeczy, dalsze obniżanie metylacji DNA może hamować rozwój komórek szpiczaka (Amodio et al., 2017). Przeprowadzane badania mają jednak często charakter wybiórczy, ograniczający się do jednego typu analizy lub do arbitralnie wybranej grupy genów.

Na podstawie zebranych informacji klinicznych oraz bazy danych biobanku uniwersyteckiego szpitala klinicznego w Salamance, w Hiszpanii, zidentyfikowano grupę sparowanych próbek szpiczaka wyizolowanych od pacjentów w momencie diagnozy szpiczaka oraz pierwszej wznowy choroby. W próbkach pochodzących od 20 pacjentów zbadano profil ekspresji genów, profil metylacji DNA i zmian genetycznych. Łącznie, używając trzech różnych typów mikromacierzy, przeanalizowano po 40 próbek.

W pierwszym etapie analizy zaproponowałem zbadanie zmian genetycznych, jakie charakteryzowały wszystkie próbki w momencie diagnozy i pierwszego nawrotu choroby. Standardowe badanie FISH (ang. Fluorescence in situ Hybridization) jest wykonywane jedynie w momencie diagnozy, co uniemożliwia badanie zmian genetycznych, zachodzących podczas rozwoju choroby. Choroby nowotworowe, w tym szpiczak, w czasie swojego rozwoju wykazują narastającą zmienność genetyczną. Postawiłem hipotezę, że dzięki zastosowaniu mikromacierzy możliwe będzie poszerzenie wiedzy dotyczącej charakteru zmian genetycznych związanych z

nawrotem szpiczaka. Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło wykryć zmiany genetyczne które obejmowały pojawienie się dodatkowych kopii chromosomów: 1q, 3, 5, 7, 9,11, 15, 18, 19 i 21 oraz utratę chromosomów lub ich części: 1p, 6q, 8p, 13 i 22. Porównanie ilości zmian genetycznych między diagnozą i wznową choroby ujawniło zwiększenie ilość zmian genetycznych. W zaawanasowanym stadium choroby obserwowano tendencję w kierunku utraty materiału genetycznego a nie jego powielania. Na tej podstawie wywnioskowałem, że genom komórek szpiczaka podczas diagnozy różni się od genomu badanego w momencie nawrotu.

W następnym etapie badań zaproponowałem sprawdzenie korelacji między zmianami genetycznymi a ekspresją genów. Zależność między ilością kopi DNA i ekspresją została zaobserwowana dla dwóch genów: *BOP1* i *PRAME*.

Rola BOP1 w szpiczaku nie jest jeszcze dobrze wyjaśniona, natomiast nasilona ekspresja *PRAME* jest sugerowana jako zły prognostyk rozwoju szpiczaka (Yang et al., 2017). Analiza danych wykazała, że współczynnik korelacji Persona r wynosił odpowiednio 0,84 i 0,95. Obydwie wartości wskazują na dość silną korelację między ilością kopi DNA i ekspresją, jednak dokładniejsze przyjrzenie się wynikom pozwala dostrzec różnice. W przypadku *BOP1* pomimo niższej wartości r dystrybucja próbek jest wzdłuż krzywej. W przypadku *PRAME1* wartości r jest wyższa, dzięki obecności jednej próbki posiadającej silną korelację między ilością DNA a ekspresją *PRAME*. Pozostałe próbki nie mają dystrybucji tak liniowej. Omówiony wynik doświadczenia ilustruje jak ważne jest dokładne zapoznanie się z danymi a nie jedynie patrzenie na wartości statystyczne.

Opisane wyniki uzupełniłem o analizę genów, których ekspresja zmieniała się niezależnie od ilości DNA. Po przeanalizowaniu zidentyfikowałem 5 genów, w tym (*CD27* i *P2Y8*), których ekspresja ulegała istotnie statystycznej zmianie. Ekspresja *CD27* jest opisanym czynnikiem prognostycznym w rozwoju szpiczaka (Chu et al., 2020). Rola P2Y8 w szpiczaku, jaki i innych nowotworach wymaga zbadania.

W kolejnym etapie analizy, zaproponowałem porównanie poziomu metylacji DNA wszystkich próbek w czasie diagnozy i pierwszej wznowy. Analiza ogólnego poziomu metylacji nie ujawniła zmian istotnych statystycznie. W celu pogłębienia wiedzy dotyczącej otrzymanego wyniku dokonano analizy: Różnie Zmetylowanych Fragmentów DNA (ang. Differentially Methylated Regions- DMR) u poszczególnych pacjentów. Poziom metylacji zmieniał się bez wyraźnej tendencji. U 8 pacjentów zaobserwowano obniżenie się ogólnej metylacji w czasie progresji szpiczaka, podczas gdy u 12 nastąpił jej wzrost.

Następnie postawiłem pytanie dotyczące zależności między metylacją DNA a profilem ekspresji genów. W tym celu wybrałem do analizy metylację DNA w różnej odległości od miejsca inicjacji transkrypcji. Wyniki analizy ujawniły korelację między ekspresją a metylacją DNA dla dwóch genów: *SORL1* i *GLT1D1*.

Dane literaturowe dotyczące SORL1 i GLT1D1 w szpiczaku są skąpe, natomiast istnieją doniesienia świadczące o roli SORL1 w raku piersi (Pietilä et al., 2019) i GLT1D1 w progresji chłoniaków (Liu et al., 2020). W celu weryfikacji otrzymanych danych eksperymentalnych sprawdziłem wpływ inkubacji linii szpiczaka z decytabiną na poziom ekspresji *SORL1*. W wyniku traktowania komórek szpiczaka decytabiną poziom ekspresji *SORL1* wzrastał. Co więcej, analiza metylacji DNA promotora SORL1 w liniach szpiczaka, w których nie ulegał ekspresji gen *SORL1* wykazała wysoki poziom metylacji DNA. Otrzymane wyniki udowodniły, po raz kolejny, że w biologii szpiczaka istnieje korelacja między metylacją DNA a ekspresją konkretnych genów. Może to wskazywać na obecność presji ewolucyjnej obejmującej zmiany epigenetyczne

Najważniejszym wynikiem przeprowadzonego badania było zaobserwowanie korelacji między metylacją DNA a ekspresją dla dwóch genów GLTD1 i SORL1. Biorąc pod uwagę różnice w charakterystyce badanych pacjentów (rożne translokacje, wiek, płeć, schemat terapii i czas do wznowy), wykryte geny mogą wskazywać na nowe, nieznane w szpiczaku szlaki sygnałowe istotne z punktu widzenia badania progresji choroby.

Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę badań mających na celu sprawdzenie udziału białek SORL1 i GLTD1 w progresji szpiczaka jak również określenie ich potencjału prognostycznego. Przeprowadzone badania wskazały na ograniczoną, aczkolwiek bardzo specyficzną rolę metylacji DNA. Biorąc pod uwagę, że dawno odkryte substancje demetylujące takie jak decytabina czy 5-azacytydyna nie są stosowane w terapii szpiczaka, pojawił się pomysł sprawdzenia działania innych i nowszych substancji hamujących metylację DNA. Wymagane kryteria spełniał związek- zebularyna, co zainspirowało mnie do podjęcia kolejnych badań.

Zbadanie działania zebularyny, jako potencjalnego czynnika cytotoksycznego o właściwościach hipometylujących i blokujących działanie deaminazy cytydyny

Publikacja oryginalna:

***Zebularine-induced myeloma cell death is accompanied by decreased c-Myc expression*.**
Krzemiński Patryk, García-Sanz Ramon, Gutiérrez C Norma.
Cellular oncology (Dordrecht), 2020, Aug; 43(4): 743-750.

Celem badań było sprawdzenie wpływu zebularyny na żywotność komórek szpiczaka plazmocytowego oraz próba znalezienia kluczowych mechanizmów molekularnych biorących udział w efekcie działania substancji.

Szpiczak plazmocytowy, pomimo starań naukowców z całego świata, pozostaje nieuleczalną chorobą. Najbardziej znane substancje hamujące metylację: decytabina i 5-azacytydyna, chociaż wykazują antyszpiczakowe działania *in vitro* nie są dopuszczone do stosowania w praktyce klinicznej. Na podstawie wyników moich wcześniejszych badań, które świadczą o zaangażowaniu metylacji DNA w rozwój szpiczaka postawiłem pytanie czy istnieje możliwość innego i być może skuteczniejszego oddziaływania na epigenom. Poszukując odpowiedzi postanowiłem sprawdzić działanie zebularyny, czynnika hipometylującego drugiej generacji. Zebularyna nie tylko hamuje metylację DNA, ale także hamuje aktywność deaminazy cytydyny (ang. Cytidine deaminase - CDA) (Marquez et al., 2005), enzymu odpowiedzialnego za oporność komórek nowotworowych na leki będące analogami nukleozydów. Należy pamiętać, że CDA to nie AICD (ang. Activation Induced Cytosine Deaminase). CDA to inny enzym i jego rola w szpiczaku nie jest tak dobrze poznana jak AICD. W przeciwieństwie do 5-azacytydyny i decytabiny, zebularyna jest stabilna, w zakresie fizjologicznego pH, ulega wchłanianiu po podaniu doustnym i preferencyjnie akumuluje się w komórkach nowotworowych. Zebularyna charakteryzuje się też niską toksycznością dla normalnych komórkach (Cheng et al., 2004a; Laliberté et al., 1992).

W pierwszym etapie, w którym testowana była hipoteza o przeciw szpiczakowym działaniu zebularyny, sprawdziłem wpływ tego związku na żywotność komórek szpiczaka 9 linii komórkowych w odniesieniu do obniżenia poziomu metylacji DNA. Zaobserwowałem, że demetylacja DNA indukowana przez zebularynę była podobna we wszystkich testowanych liniach komórkowych, z wyjątkiem linii komórkowej KMS12PE, w której nie zaobserwowano obniżenia metylacji DNA. Aby potwierdzić mechanizm epigenetyczny leżący u podstaw efektu

zebularyny, zbadałem ilość białek DNA methylotransferaz Dnmt3a i Dnmt3b, z których oba, aczkolwiek w różnym stopniu, są odpowiedzialne za metylację DNA (Cheng et al., 2004b; Nakamura et al., 2015). Zaobserwowałem, że inkubacja z zebularyną powodowała obniżenie ilości białka obu metylotransferaz DNA w liniach komórkowych JJN3, H929 i KMS12BM. Taki efekt nie występował w linii komórkowej KMS12PE. Pomimo tego efekt cytotoksyczny był obserwowany w linii KMS12PE jak i w pozostałych liniach komórkowych za wyjątkiem U266.

Co ciekawe, komórki linii U266 były również oporne na działanie decytabiny, a mimo to zarówno zebularna jak i decytabina obniżały poziom metylacji DNA w tej linii komórkowej. Kolejnym etapem było porównanie efektu cytotoksycznego powodowanego zebularyną i decytabiną w czterech liniach komórkowych szpiczaka, gdzie wykazałem, że zebularna jest bardziej toksyczna w trzech z nich. Mając dane świadczące o cytotoksycznym działaniu zebularyny na komórki szpiczaka, postanowiłem zbadać możliwy mechanizm odpowiedzialny za obserwowane zmiany. W tym celu, zbadałem możliwość powodowania uszkodzeń DNA. Efekt działania analogów nukleozydów często wynika z ingerencji w system replikacji DNA. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku stosowania dużych dawek decytabiny. Odpowiednio wysokie stężenie nie tylko powoduje demetylację DNA, ale też prowadzi do uszkodzeń DNA. Wyniki doświadczeń pokazały, że efekt cytotoksyczny w większości badanych linii komórkowych wiązał się ze wzrostem ilości ufosofrylowanego białka H2aX, które jest stosowane jako zastępczy znacznik uszkodzeń DNA. Efektu takiego jednak nie zaobserwowano w linii MM1s, chociaż zebularyna obniżała żywotność tej linii komórkowej.

Dzięki otrzymanym wynikom można przypuszczać, że zebularyna wykazuje złożony mechanizm działania, wykraczający poza hamowanie metylacji i indukcję uszkodzeń DNA. Co więcej, obecność efektu cytotoksycznego w liniach posiadających różny status *p53* (delecja, normalna ekspresja lub ekspresja białka zmutowanego) wskazuje, że białko to nie ma krytycznego wpływu na działanie zebularyny. Podobnie, profil translokacji wydaje się nie mieć decydującego wpływu na działanie tej substancji. W poszukiwaniu mechanizmu działania zebularyny, które było by wspólne dla wszystkich badanych linii komórkowych, postanowiłem sprawdzić hipotezę o udziale białka cMyc w działaniu zebularyny. *cMyc* jest proto-onkogenem, który w wielu nowotworach (Sewastianik et al., 2014) w tym w komórkach szpiczaka, odgrywa szczególną rolę w progresji i rozwoju choroby. Białko cMyc nasila proliferację i metabolizm komórek nowotworowych. W szpiczaku *cMyc* najczęściej nie jest zmutowany, ale ulega silnej ekspresji (Glitza et al., 2015; Holien et al., 2012). Większość dostępnych linii komórkowych posiada wysoką ilość białka cMyc, podobnie jak część pacjentów podczas wznowy choroby. Warto też pamiętać, że istnieją doniesienia naukowe opisujące obniżenie ilości cMyc w wyniku

działania decytabiny, co może wskazywać na rolę zmian epigenetycznych w regulacji ekspresji tego genu (Jin et al., 2019). Inkubacja wszystkich linii komórkowych z zebularyną doprowadziła do obniżenia ilości białka cMyc**.** Wyjątkiem była linia U266, w której brak jest białka cMyc.

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują na niebezpośrednią regulację ekspresji *cMyc* przez zebularynę. Można przypuszczać, że na skutek działania zebularyny ulega nasilonej ekspresji niezbadany, w moich doświadczeniach, czynnik powodujący obniżenie ekspresji lub degradację *cMyc*. Niewykluczone, że jest to jedno z mikroRNA, aczkolwiek nie przeprowadziłem dalszych badań pozwalających na jego identyfikację. Nieopublikowane dane dotyczące mikroRNA34b/c mogącego oddziaływać na transkrypt *cMyc*, nie wykazały, że to mikroRNA jest czynnikiem łączącym efekt zebularyny z obniżeniem ekspresji *cMyc* we wszystkich badanych liniach komórkowych.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie hipotezy o możliwości wzmocnienia działania przeciwszpiczakowego poprzez użycie kombinacji różnych związków. Chcąc dostarczyć informacji na temat potencjalnego działania synergistycznego decytabiny i zebularyny postanowiłem sprawdzić efekt cytotoksycznych niższych dawek obu substancji w linii szpiczaka KMS12BM, która posiada wysoki poziom CDA. Zebularyna będąc inhibitorem CDA nasila działanie leków będących analogami nukleozydów i ma możliwość przełamywania oporności na te leki. Zebularyna powodowała silniejszy efekt cytotoksyczny niż obserwowany po podaniu tylko jednej z dwóch substancji.

Najważniejszym wynikiem przeprowadzonych badań było zaobserwowanie efektu cytotoksycznego zebularyny pomimo braku indukcji uszkodzeń DNA w linii MM1s i KMS12PE. Ten wynik w odniesieniu do pozostałych wskazuje na wielotorowe działanie badanego związku wykraczające poza hamowanie metylacji i powodowanie uszkodzeń DNA. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę badań mających na celu opracowanie nowych strategii terapeutycznych szpiczaka działających poprzez modyfikacje metylacji DNA.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały interesujące właściwości zebularyny wobec komórek szpiczaka jednak nie dawały odpowiedzi dotyczącej rozwoju choroby. Dlatego w kolejnej pracy podjąłem próbę identyfikacji nowych białkowych biomarkerów szpiczaka, zwłaszcza w kontekście odpowiedzi na leczenie.

Ocena potencjału prognostycznego wybranych białek u pacjentów z szpiczakiem plazmocytowym.

Publikacja oryginalna:

***Quantitative expression of Ikaros, IRF4, and PSMD10 proteins predicts survival in VRD-treated patients with multiple myeloma*.**
Misiewicz-Krzemińska Irena, de Ramón Cristina, Corchete A Luis, Krzemiński Patryk, Rojas A Elizabeta, Isidro Isabel, García-Sanz Ramon, Martínez-López Javier, Oriol Albert, Bladé Junan, Lahuerta J Juan, San Miguel F Jesus, Rosiñol , Mateos V Maria, Gutiérrez C Norma.
Blood Advances, 2020, Dec 8; 4(23): 6023-6033.

Celem badań było znalezienie nowych białkowych biomarkerów rozwoju szpiczaka niezależnych od zmian genetycznych

Szpiczak jest chorobą heterogenną, o czym świadczą moje opublikowane wyniki jak i doświadczenia wielu innych grup badawczych. Niezwykła zmienności biologiczna z jednej strony uzasadnia potrzebę poszukiwania alternatywnych sposób leczenia (uwzględniających np. modyfikacje epigenetyczne) z drugiej, stwarza konieczność lepszego przewidywania skutków działania dostępnych terapii. Aktualnie, pacjenci chorzy na szpiczaka plazmocytowego są klasyfikowani przede wszystkim na podstawie translokacji chromosomowych. Obecność utraty części chromosomu 17p, uzyskanie dodatkowej kopi części chromosomu 1q oraz translokacje t(4:14), t(14:16) i t(14:20) są łączone z wyskokiem ryzykiem i dużym prawdopodobieństwem niepowodzenia terapii (Rajkumar, 2020). Jednocześnie brak wymienionych aberracji genetycznych nie oznacza zawsze dobrego rokowania. Potencjalnym rozwiązaniem może być identyfikacja nowych biomarkerów umożliwiających wykrycie pacjentów predysponowanych do wczesnego nawrotu choroby i tych, którzy staną się szybko oporni na dostępne schematy leczenia obejmujące inhibitory proteasomu, leki immunomodulujące i glukokortykoidy. Badanie ilości białka, w przeciwieństwie do badania poziomu ekspresji genów, pozwala na ocenę czynnika biorącego udział bezpośrednio w odpowiedzi na leczenie. Niestety, ocena ilościowa konkretnych białek, w przypadku szpiczaka, jest utrudniona ze względu na ograniczony materiał biopsyjny.

Wspomniane niedogodności zostały pokonane w naszych badaniach poprzez zastosowanie rewolucyjnej metody CNIA (ang. capillary nanoimmunoassay), która pozwala na analizę kilkudziesięciu białek w jednej próbce. W przeprowadzonych badaniach, określiliśmy

ilościowo poziom białek regulujących działanie leków antyszpiczakowych w 174 próbkach pacjentów. Ekspresja genów białek wybranych do analizy może być regulowana epigenetycznie miedzy innymi przez metylację DNA. Celem badań miało być określenie korelacji ilości białka z przeżywalnością a następnie określenie zależności miedzy metylacją DNA a przeżywalnością. Badania zdecydowano się zakończyć na samej analizie ilości białka miedzy innymi ze względu na niewystarczającą ilość wyekstrahowanego DNA. Pacjenci z wysokim poziomem białek Ikaros, Aiolos, PSMD1, PSMD4, PSMD10 i niskim poziomem Cereblon i IRF4 charakteryzowali się krótszym czasem przeżycia. Ponieważ w większości schematów leczenia stosowane są glukokortykoidy, i dość często rozwija się oporność na te leki, zaproponowałem badanie ilości białek biorących udział w mechanizmie działania leków z tej grupy. Testowana hipoteza zakładała, że poziom białek które są niezbędne dla działania tych leków, badany w patologicznych plazmocytach, może mieć wpływ na efekt leczenia pacjentów leczonych glukokortykoidami. Spośród zaproponowanych przeze mnie białek udało się oznaczyć dwa, receptor dla gluokortykoidów (GCR) i białko XPO1, będące białkiem z rodziny eksportyn. Wyniki analizy przeżywalności pacjentów wykazały, że poziom białka receptora dla glukokortykoidów (GCR) nie miał wpływu na rokowanie w analizowanej grupie pacjentów, jednak wysoka relacja ilości białek: XPO1 / GCR była związana z istotnie statystycznie krótszym czasem przeżycia bez wznowy. Białko XPO1 jest odpowiedzialne za powolny eksport GCR z jądra komórkowego a tym samym za regulację jego działania. Odkryte przeze mnie zależności między ilością badanych białek a czasem przeżycia pacjentów chorych na szpiczaka występowały bez względu na obecność zmian genetycznych, co wskazuje na użyteczność białkowych biomarkerów.

Najważniejszym wynikiem przeprowadzonego badania było wykrycie potencjalnego biomarkera związanego z działaniem glukokortykoidów. Zaobserwowałem wpływ ilości nie samego receptora glukokortykoidowego, ale stosunku ilości GCR i XPO1 (białka transportujące GCR) na czas przeżycia wolnego od progresji choroby.

Otrzymane wyniki wskazują na możliwość opracowania biomarkerów odpowiedzi szpiczaka, na dostępne schematy leczenia, uwzględniających ilość wybranych białek. Uzupełnienie dostępnych czynników prognostycznych opierających się na badaniach genetycznych o sprawną analizę ilościową białek, może w przyszłości doprowadzić do lepszej oceny ryzyka pacjentów chorujących na szpiczaka i lepszego doboru schematów leczenia.

4.4. Wpływ dzieła na rozwój dyscypliny (biologia/medycyna), rozwój cywilizacyjny i postęp w leczeniu nowotworów

Cykl publikacji którego jestem autorem pozwolił poszerzyć wiedzę dotyczącą zmian genetycznych, roli metylacji DNA w biologii szpiczaka plazmocytowego.

Dzięki pracy poświęconej badaniu epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji *mikroRNA155* dowiedzieliśmy się nie tylko, że ekspresja tego mikroRNA może mieć wartość prognostyczną ale też poznaliśmy jakie reperkusje może mieć wyciszenie jego ekspresji na drodze metylacji DNA. Kolejnym badanym zagadnieniem było nabywanie oporności szpiczaka na konwencjonalne leczenie. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły ocenić rolę zmian genetycznych, epigenetycznych na ekspresje genów w reprezentatywnej grupie pacjentów od których pobrano próbki w momencie diagnozy i pierwszego nawrotu choroby. Wyniki przeprowadzonych badań ujawniły obecność korelacji między ekspresją a metylacją DNA genów których deregulacja może mieć kluczowy wpływ na rozwój szpiczaka. Innym podejściem do problemu oporności szpiczaka na konwencjonalne leczenie było przeprowadzanie doświadczeń sprawdzających działanie mało znanego inhibitora metylacji DNA - zebularyny. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały wpływ badanego zawiązku na obniżenie ilości białka cMyc co, w świetle podobnych wyników otrzymanych przy zastosowaniu innych związków demetylujących, wskazuje na rolę metylacji DNA w regulacji tego genu. Badanie ekspresji określonych genów między innymi takich jak *cMyc* ma wartość prognostyczną, jednak ciągle pozostaje grupa pacjentów dla których trudno przewidzieć powodzenie stosowanych terapii. Wychodząc naprzeciw potrzebie poszukiwania nowych biomarkerów szpiczaka oznaczono ilościowo białka zaangażowane w szlaki sygnałowe związane z stosowanymi lekami. Wyniki eksperymentów wskazały nie tylko na prognostyczną funkcje określonych części składowych proteasomu, ale też pokazały jak istotne jest badanie stosunku ilości poszczególnych białek. Uzupełnieniem cyklu publikacji była praca przeglądowa pozwalająca na zgłębienie i usystematyzowanie informacji dotyczących roli zmian genetycznych i epigenetycznych w regulacji ekspresji mikroRNA w szpiczaku plazmocytowym.

Reasumując w wyniku przeprowadzonej pracy badawczej poznaliśmy nowe istotne czynniki wpływające na biologię szpiczaka plazmocytowego co może pomoc w lepszym zrozumieniu tej choroby i doprowadzić do opracowania w przyszłości skuteczniejszych metod leczenia.

4.5. Najistotniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Wyższa ekspresja *mikroRNA155* jest związana z dłuższym całkowitym czasem przeżycia pacjentów chorych na szpiczaka plazmocytowego.
2. Metylacja DNA reguluje ekspresję *mikroRNA155* w liniach komórkowych szpiczaka.
3. Miejsce E-Box obecne w pierwszym intronie genu gospodarza mikroRNA155 przyczynia się do regulacji ekspresji *mikroRNA155*.
4. Wzrost ekspresji *mikroRNA155* indukowany LPS nie jest możliwy w komórkach szpiczaka, które posiadają zmetylowany promotor genu gospodarza kodującego mikroRNA155.
5. Nawrotowi szpiczaka towarzyszy zwiększona liczba zaburzeń chromosomalnych z przewagą utraty DNA.
6. Większość genów ze zwiększoną lub zmniejszoną ekspresją na etapie nawrotu nie jest zlokalizowana w pozyskanych lub utraconych regionach DNA.
7. Geny *PRAME* i *BOP1* wykazują silną dodatnią korelację ze wzrostem ilości kopi DNA.
8. U wszystkich pacjentów z nawrotowym szpiczakiem uwzględnionych w naszym badaniu zaobserwowano istotną statystycznie i niższą ekspresją 5 genów, w tym *CD27* i *P2RY8*.
9. Ekspresja *SORL11* i *GLT1D1* może być regulowana na drodze metylacji DNA.
10. Metylacja DNA wpływa nieznacznie na ekspresję genów, co sugeruje inną rolę tej epigenetycznej modyfikacji w biologii szpiczaka.
11. Zebularyna, związek będący inhibitorem metylacji DNA i enzymu deaminazy cytydyny, zmniejsza metylację DNA w większości badanych linii komórkowych szpiczaka, co jest związane ze obniżeniem żywotności badanych komórek i indukcją uszkodzeń DNA (wzrostem fosforylacji białka H2aX).
12. Zebularyna powoduje zmniejszenie ilości białka cMyc w komórkach szpiczaka.
13. Zebularyna wzmacnia działanie decytabiny w linii komórkowej KMS12BM wykazującej naturalnie ekspresję *CDA.*
14. Analiza poziomu wybranych białek proteasomu pozwala na prognozowanie rozwoju szpiczaka.
15. Wysoka ilość białka receptora dla glukokortykoidów w stosunku do białka eksportującego ten receptor z jądra komórkowego jest związana z istotnie statystycznie krótszym czasem przeżycia bez wznowy, uwzględnionych w badaniu, pacjentów chorych na szpiczaka.

4.6. Piśmiennictwo

Agirre, X., Castellano, G., Pascual, M., Heath, S., Kulis, M., Segura, V., Bergmann, A., Esteve, A., Merkel, A., Raineri, E., et al. (2015). Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. Genome Res. *25*, 478–487.

Amodio, N., Di Martino, M.T., Foresta, U., Leone, E., Lionetti, M., Leotta, M., Gullà, A.M., Pitari, M.R., Conforti, F., Rossi, M., et al. (2012). miR-29b sensitizes multiple myeloma cells to bortezomib-induced apoptosis through the activation of a feedback loop with the transcription factor Sp1. Cell Death Dis. *3*, e436.

Amodio, N., Stamato, M.A., Gullà, A.M., Morelli, E., Romeo, E., Raimondi, L., Pitari, M.R., Ferrandino, I., Misso, G., Caraglia, M., et al. (2016). Therapeutic Targeting of miR-29b/HDAC4 Epigenetic Loop in Multiple Myeloma. Mol. Cancer Ther. *15*, 1364–1375.

Amodio, N., D'Aquila, P., Passarino, G., Tassone, P., and Bellizzi, D. (2017). Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation. Expert Opin. Ther. Targets *21*, 91–101.

Aoki, Y., Nojima, M., Suzuki, H., Yasui, H., Maruyama, R., Yamamoto, E., Ashida, M., Itagaki, M., Asaoku, H., Ikeda, H., et al. (2012). Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. Genome Med. *4*, 101.

Barwick, B.G., Neri, P., Bahlis, N.J., Nooka, A.K., Dhodapkar, M.V., Jaye, D.L., Hofmeister, C.C., Kaufman, J.L., Gupta, V.A., Auclair, D., et al. (2019). Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. Nat. Commun. *10*, 1911.

Bazarbachi, A.H., Al Hamed, R., Malard, F., Harousseau, J.-L., and Mohty, M. (2019). Relapsed refractory multiple myeloma: a comprehensive overview. Leukemia *33*, 2343–2357.

Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *23*, 6333–6338.

Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2018). Detailing the genomic landscape of myeloma. Blood *132*, 554–555.

Bird, A.P., and Wolffe, A.P. (1999). Methylation-Induced Repression— Belts, Braces, and Chromatin. Cell *99*, 451–454.

Bollati, V., Fabris, S., Pegoraro, V., Ronchetti, D., Mosca, L., Deliliers, G.L., Motta, V., Bertazzi, P.A., Baccarelli, A., and Neri, A. (2009). Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. Carcinogenesis *30*, 1330–1335.

Bolli, N., Martinelli, G., and Cerchione, C. (2020). The molecular pathogenesis of multiple myeloma. Hematol. Rep. *12*, 9054.

Cheng, J.C., Yoo, C.B., Weisenberger, D.J., Chuang, J., Wozniak, C., Liang, G., Marquez, V.E., Greer, S., Orntoft, T.F., Thykjaer, T., et al. (2004a). Preferential response of cancer cells to zebularine. Cancer Cell *6*, 151–158.

Cheng, J.C., Weisenberger, D.J., Gonzales, F.A., Liang, G., Xu, G.-L., Hu, Y.-G., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2004b). Continuous Zebularine Treatment Effectively Sustains Demethylation in Human Bladder Cancer Cells. Mol. Cell. Biol. *24*, 1270–1278.

Chesi, M., Nardini, E., Lim, R.S., Smith, K.D., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (1998). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood *92*, 3025–3034.

Chu, B., Bao, L., Wang, Y., Lu, M., Shi, L., Gao, S., Fang, L., Xiang, Q., and Liu, X. (2020). CD27 antigen negative expression indicates poor prognosis in newly diagnosed multiple myeloma. Clin. Immunol. *213*, 108363.

Chuang, J.C., and Jones, P.A. (2007). Epigenetics and MicroRNAs. Pediatr. Res. *61*, 24–29.

Dring, A.M., Davies, F.E., Fenton, J.A.L., Roddam, P.L., Scott, K., Gonzalez, D., Rollinson, S., Rawstron, A.C., Rees-Unwin, K.S., Li, C., et al. (2004). A global expression-based analysis of the consequences of the t(4;14) translocation in myeloma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *10*, 5692–5701.

Due, H., Schönherz, A.A., Ryø, L., Primo, M.N., Jespersen, D.S., Thomsen, E.A., Roug, A.S., Xiao, M., Tan, X., Pang, Y., et al. (2019). MicroRNA-155 controls vincristine sensitivity and predicts superior clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood Adv. *3*, 1185–1196.

Fan, Z., Liu, Y., Shi, Z., Deng, K., Zhang, H., Li, Q., Cao, S., Li, S., and Zhang, H. (2020). MiR-155 promotes interleukin-1β-induced chondrocyte apoptosis and catabolic activity by targeting PIK3R1-mediated PI3K/Akt pathway. J. Cell. Mol. Med. *24*, 8441–8451.

Galm, O., Wilop, S., Reichelt, J., Jost, E., Gehbauer, G., Herman, J.G., and Osieka, R. (2004). DNA methylation changes in multiple myeloma. Leukemia *18*, 1687–1692.

García, J.L., Lozano, R., Misiewicz-Krzeminska, I., Fernández-Mateos, J., Krzeminski, P., Alfonso, S., Marcos, R.A., García, R., Gómez-Veiga, F., Virseda, Á., et al. (2017). A novel capillary nano-immunoassay for assessing androgen receptor splice variant 7 in plasma. Correlation with CD133 antigen expression in circulating tumor cells. A pilot study in prostate cancer patients. Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex. *19*, 1350–1357.

Glitza, I.C., Lu, G., Shah, R., Bashir, Q., Shah, N., Champlin, R.E., Shah, J., Orlowski, R.Z., and Qazilbash, M.H. (2015). Chromosome 8q24.1/c-MYC abnormality: a marker for high-risk myeloma. Leuk. Lymphoma *56*, 602–607.

Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., and Flis, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. Anticancer Res. *33*, 2989–2996.

Gutiérrez, N.C., Sarasquete, M.E., Misiewicz-Krzeminska, I., Delgado, M., De Las Rivas, J., Ticona, F.V., Fermiñán, E., Martín-Jiménez, P., Chillón, C., Risueño, A., et al. (2010). Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. Leukemia *24*, 629–637.

Gwiggner, M., Martinez-Nunez, R.T., Whiteoak, S.R., Bondanese, V.P., Claridge, A., Collins, J.E., Cummings, J.R.F., and Sanchez-Elsner, T. (2018). MicroRNA-31 and MicroRNA-155 Are Overexpressed in Ulcerative Colitis and Regulate IL-13 Signaling by Targeting Interleukin 13 Receptor α-1. Genes *9*, E85.

Heuck, C.J., Mehta, J., Bhagat, T., Gundabolu, K., Yu, Y., Khan, S., Chrysofakis, G., Schinke, C., Tariman, J., Vickrey, E., et al. (2013). Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 2966–2975.

Holien, T., Våtsveen, T.K., Hella, H., Waage, A., and Sundan, A. (2012). Addiction to c-MYC in multiple myeloma. Blood *120*, 2450–2453.

Hu, W., Wang, T., Xu, J., and Li, H. (2014). MicroRNA mediates DNA methylation of target genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *444*, 676–681.

Huang, J., Weng, Q., Shi, Y., Mao, W., Zhao, Z., Wu, R., Ren, J., Fang, S., Lu, C., Du, Y., et al. (2020). MicroRNA-155-5p suppresses PD-L1 expression in lung adenocarcinoma. FEBS Open Bio *10*, 1065–1071.

Jabłońska, E., Białopiotrowicz, E., Szydłowski, M., Prochorec-Sobieszek, M., Juszczyński, P., and Szumera-Ciećkiewicz, A. (2020). DEPTOR is a microRNA-155 target regulating migration and cytokine production in diffuse large B-cell lymphoma cells. Exp. Hematol. *88*, 56-67.e2.

Jagannathan, S., Vad, N., Vallabhapurapu, S., Vallabhapurapu, S., Anderson, K.C., and Driscoll, J.J. (2015). MiR-29b replacement inhibits proteasomes and disrupts aggresome+autophagosome formation to enhance the antimyeloma benefit of bortezomib. Leukemia *29*, 727–738.

Jin, J., Lian, T., Gu, C., Yu, K., Gao, Y.Q., and Su, X.-D. (2016). The effects of cytosine methylation on general transcription factors. Sci. Rep. *6*, 29119.

Jin, Y., Xu, L., Wu, X., Feng, J., Shu, M., Gu, H., Gao, G., Zhang, J., Dong, B., and Chen, X. (2019). Synergistic Efficacy of the Demethylation Agent Decitabine in Combination With the Protease Inhibitor Bortezomib for Treating Multiple Myeloma Through the Wnt/β-Catenin Pathway. Oncol. Res. *27*, 729–737.

Juge-Morineau, N., Harousseau, J.L., Amiot, M., and Bataille, R. (1997). The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. Leuk. Lymphoma *24*, 229–237.

Kaiser, M.F., Johnson, D.C., Wu, P., Walker, B.A., Brioli, A., Mirabella, F., Wardell, C.P., Melchor, L., Davies, F.E., and Morgan, G.J. (2013). Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. Blood *122*, 219–226.

Katiyar, A., Kaur, G., Rani, L., Jena, L., Singh, H., Kumar, L., Sharma, A., Kaur, P., and Gupta, R. (2021). Genome-wide identification of potential biomarkers in multiple myeloma using meta-analysis of mRNA and miRNA expression data. Sci. Rep. *11*, 10957.

Khouri, J., Faiman, B.M., Grabowski, D., Mahfouz, R.Z., Khan, S.N., Wei, W., Valent, J., Dean, R., Samaras, C., Jha, B.K., et al. (2021). DNA methylation inhibition in myeloma: Experience from a phase 1b study of low-dose continuous azacitidine in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. Semin. Hematol. *58*, 45–55.

Kristensen, L.S., Asmar, F., Dimopoulos, K., Nygaard, M.K., Aslan, D., Hansen, J.W., Ralfkiaer, E., and Grønbæk, K. (2014). Hypermethylation of DAPK1 is an independent prognostic factor predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget *5*, 9798–9810.

Kurowska-Stolarska, M., Ballantine, L., Stolarski, B., Hunter, J., Hueber, A., Gracie, J.A., Liew, F.Y., and McInnes, I.B. (2010). miR-155 and miR-34a regulate proinflammatory cytokine production by human monocytes. Ann. Rheum. Dis. *69*, A30–A30.

Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. (2008). Multiple myeloma. Blood *111*, 2962–2972.

Laliberté, J., Marquez, V.E., and Momparler, R.L. (1992). Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. Cancer Chemother. Pharmacol. *30*, 7–11.

Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., et al. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood *113*, 5412–5417.

Langseth, Ø.O., Myklebust, T.Å., Johannesen, T.B., Hjertner, Ø., and Waage, A. (2020). Incidence and survival of multiple myeloma: a population-based study of 10 524 patients diagnosed 1982–2017. Br. J. Haematol. *191*, 418–425.

Li, Z., Wong, K.Y., Chan, G.C.-F., Chng, W.-J., and Chim, C.S. (2018). Epigenetic silencing of EVL/miR-342 in multiple myeloma. Transl. Res. J. Lab. Clin. Med. *192*, 46–53.

Liebisch, P., and Döhner, H. (2006). Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *42*, 1520–1529.

Lionetti, M., Barbieri, M., Todoerti, K., Agnelli, L., Fabris, S., Tonon, G., Segalla, S., Cifola, I., Pinatel, E., Tassone, P., et al. (2015). A compendium of DIS3 mutations and associated transcriptional signatures in plasma cell dyscrasias. Oncotarget *6*, 26129–26141.

Liu, X., Zhang, Y., Han, Y., Lu, W., Yang, J., Tian, J., Sun, P., Yu, T., Hu, Y., Zhang, H., et al. (2020). Overexpression of GLT1D1 induces immunosuppression through glycosylation of PD-L1 and predicts poor prognosis in B-cell lymphoma. Mol. Oncol. *14*, 1028–1044.

López-Corral, L., Gutiérrez, N.C., Vidriales, M.B., Mateos, M.V., Rasillo, A., García-Sanz, R., Paiva, B., and San Miguel, J.F. (2011). The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 1692–1700.

Makeyev, E.V., and Maniatis, T. (2008). Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. Science *319*, 1789–1790.

Manier, S., Salem, K., Glavey, S.V., Roccaro, A.M., and Ghobrial, I.M. (2016). Genomic Aberrations in Multiple Myeloma. Cancer Treat. Res. *169*, 23–34.

Marquez, V.E., Kelley, J.A., Agbaria, R., Ben-Kasus, T., Cheng, J.C., Yoo, C.B., and Jones, P.A. (2005). Zebularine: A Unique Molecule for an Epigenetically Based Strategy in Cancer Chemotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1058*, 246–254.

Martínez-Baños, D., Sánchez-Hernández, B., Jiménez, G., Barrera-Lumbreras, G., and Barrales-Benítez, O. (2017). Global methylation and promoter-specific methylation of the P16, SOCS-1, E-cadherin, P73 and SHP-1 genes and their expression in patients with multiple myeloma during active disease and remission. Exp. Ther. Med. *13*, 2442–2450.

Martins, I., Ribeiro, I.P., Jorge, J., Gonçalves, A.C., Sarmento-Ribeiro, A.B., Melo, J.B., and Carreira, I.M. (2021). Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. Genes *12*, 349.

Mashima, R. (2015). Physiological roles of miR-155. Immunology *145*, 323–333.

Mateos, M.-V., Ludwig, H., Bazarbachi, A., Beksac, M., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavo, M., Delforge, M., Dimopoulos, M.A., Facon, T., et al. (2019). Insights on Multiple Myeloma Treatment Strategies. HemaSphere *3*, e163.

Misiewicz-Krzeminska, I., Sarasquete, M.E., Quwaider, D., Krzeminski, P., Ticona, F.V., Paíno, T., Delgado, M., Aires, A., Ocio, E.M., García-Sanz, R., et al. (2013). Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. Haematologica *98*, 640–648.

Misiewicz-Krzeminska, I., Sarasquete, M.E., Vicente-Dueñas, C., Krzeminski, P., Wiktorska, K., Corchete, L.A., Quwaider, D., Rojas, E.A., Corral, R., Martín, A.A., et al. (2016). Post-transcriptional Modifications Contribute to the Upregulation of Cyclin D2 in Multiple Myeloma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 207–217.

Nakamura, K., Nakabayashi, K., Aung, K.H., Aizawa, K., Hori, N., Yamauchi, J., Hata, K., and Tanoue, A. (2015). DNA Methyltransferase Inhibitor Zebularine Induces Human Cholangiocarcinoma Cell Death through Alteration of DNA Methylation Status. PLOS ONE *10*, e0120545.

Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Noels, H., Akhtar, S., Zhou, Z., Koenen, R.R., Heyll, K., Gremse, F., Kiessling, F., Grommes, J., et al. (2012). MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. J. Clin. Invest. *122*, 4190–4202.

Neuse, C.J., Lomas, O.C., Schliemann, C., Shen, Y.J., Manier, S., Bustoros, M., and Ghobrial, I.M. (2020). Genome instability in multiple myeloma. Leukemia *34*, 2887–2897.

Paíno, T., Sarasquete, M.E., Paiva, B., Krzeminski, P., San-Segundo, L., Corchete, L.A., Redondo, A., Garayoa, M., García-Sanz, R., Gutiérrez, N.C., et al. (2014). Phenotypic, genomic and functional characterization reveals no differences between CD138++ and CD138low subpopulations in multiple myeloma cell lines. PloS One *9*, e92378.

Pietilä, M., Sahgal, P., Peuhu, E., Jäntti, N.Z., Paatero, I., Närvä, E., Al-Akhrass, H., Lilja, J., Georgiadou, M., Andersen, O.M., et al. (2019). SORLA regulates endosomal trafficking and oncogenic fitness of HER2. Nat. Commun. *10*, 2340.

Rajkumar, S.V. (2020). Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am. J. Hematol. *95*, 548–567.

Rajkumar, S.V., and Kumar, S. (2020). Multiple myeloma current treatment algorithms. Blood Cancer J. *10*, 1–10.

Rastgoo, N., Abdi, J., Hou, J., and Chang, H. (2017). Role of epigenetics-microRNA axis in drug resistance of multiple myeloma. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *10*, 121.

Saki, N., Abroun, S., Hajizamani, S., Rahim, F., and Shahjahani, M. (2014). Association of Chromosomal Translocation and MiRNA Expression with The Pathogenesis of Multiple Myeloma. Cell J. *16*, 99–110.

Salhia, B., Baker, A., Ahmann, G., Auclair, D., Fonseca, R., and Carpten, J. (2010). DNA Methylation Analysis Determines the High Frequency of Genic Hypomethylation and Low Frequency of Hypermethylation Events in Plasma Cell Tumors. Cancer Res. *70*, 6934–6944.

Sewastianik, T., Prochorec-Sobieszek, M., Chapuy, B., and Juszczyński, P. (2014). MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. Biochim. Biophys. Acta *1846*, 457–467.

Sharma, A., Heuck, C.J., Fazzari, M.J., Mehta, J., Singhal, S., Greally, J.M., and Verma, A. (2010). DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. WIREs Syst. Biol. Med. *2*, 654–669.

Smith, E.M., Boyd, K., and Davies, F.E. (2010). The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma. Br. J. Haematol. *148*, 702–713.

Stamato, M.A., Juli, G., Romeo, E., Ronchetti, D., Arbitrio, M., Caracciolo, D., Neri, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., and Amodio, N. (2017). Inhibition of EZH2 triggers the tumor suppressive miR-29b network in multiple myeloma. Oncotarget *8*, 106527–106537.

Thai, T.-H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., et al. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. Science *316*, 604–608.

Walker, B.A., Wardell, C.P., Chiecchio, L., Smith, E.M., Boyd, K.D., Neri, A., Davies, F.E., Ross, F.M., and Morgan, G.J. (2011). Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. Blood *117*, 553–562.

Walker, B.A., Mavrommatis, K., Wardell, C.P., Ashby, T.C., Bauer, M., Davies, F.E., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., et al. (2018). Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. Blood *132*, 587–597.

Wang, L.Q., Kumar, S., Calin, G.A., Li, Z., and Chim, C.S. (2020). Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. Br. J. Haematol. *190*, 249–261.

Wong, K.Y., and Chim, C.S. (2015). DNA methylation of tumor suppressor protein-coding and non-coding genes in multiple myeloma. Epigenomics *7*, 985–1001.

Wong, K.-Y., Liang, R., So, C.-C., Jin, D.-Y., Costello, J.F., and Chim, C.-S. (2011a). Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. Br. J. Haematol. *154*, 569–578.

Wong, K.Y., Yim, R.L.H., So, C.C., Jin, D.-Y., Liang, R., and Chim, C.S. (2011b). Epigenetic inactivation of the MIR34B/C in multiple myeloma. Blood *118*, 5901–5904.

Wong, K.Y., Huang, X., and Chim, C.S. (2012). DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. Carcinogenesis *33*, 1629–1638.

Xu, J., Pfarr, N., Endris, V., Mai, E.K., Md Hanafiah, N.H., Lehners, N., Penzel, R., Weichert, W., Ho, A.D., Schirmacher, P., et al. (2017). Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation. Oncogenesis *6*, e337.

Xu, W., Li, J., Rong, B., Zhao, B., Wang, M., Dai, R., Chen, Q., Liu, H., Gu, Z., Liu, S., et al. (2020). DNMT3A reads and connects histone H3K36me2 to DNA methylation. Protein Cell *11*, 150–154.

Xu, Y., Chen, B., George, S.K., and Liu, B. (2015). Downregulation of MicroRNA-152 contributes to high expression of DKK1 in multiple myeloma. RNA Biol. *12*, 1314–1322.

Yang, L., Wang, Y.-Z., Zhu, H.-H., Chang, Y., Li, L.-D., Chen, W.-M., Long, L.-Y., Zhang, Y.-H., Liu, Y.-R., Lu, J., et al. (2017). PRAME Gene Copy Number Variation Is Related to Its Expression in Multiple Myeloma. DNA Cell Biol. *36*, 1099–1107.

Yellapantula, V., Hultcrantz, M., Rustad, E.H., Wasserman, E., Londono, D., Cimera, R., Ciardiello, A., Landau, H., Akhlaghi, T., Mailankody, S., et al. (2019). Comprehensive detection of recurring genomic abnormalities: a targeted sequencing approach for multiple myeloma. Blood Cancer J. *9*, 1–9.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. Blood *108*, 2020–2028.

Zhang, H., and Zhu, J.-K. (2011). RNA-directed DNA methylation. Curr. Opin. Plant Biol. *14*, 142–147.

Zhang, W., Wang, Y.E., Zhang, Y., Leleu, X., Reagan, M., Zhang, Y., Mishima, Y., Glavey, S., Manier, S., Sacco, A., et al. (2014). Global epigenetic regulation of microRNAs in multiple myeloma. PloS One *9*, e110973.

Zhang, Y.-K., Wang, H., Leng, Y., Li, Z.-L., Yang, Y.-F., Xiao, F.-J., Li, Q.-F., Chen, X.-Q., and Wang, L.-S. (2011). Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *414*, 233–239.

Zielen, S., Trischler, J., and Schubert, R. (2015). Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans. Expert Rev. Clin. Immunol. *11*, 409–418.

Zmorzynski, S.A., Korszen-Pilecka, I., Wojcierowska-Litwin, M., Kwiatkowska-Drabik, B., Luterek, M., Chocholska, S., Koczkodaj, D., Popek, S., Michalak-Wojnowska, M., Swiderska-Kolacz, G., et al. (2017). TP53 polymorphism in plasma cell myeloma. Folia Histochem. Cytobiol. *55*, 203–211.

5. Dane bibliometryczne

Tabela 1. Sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego

	Dorobek naukowy z **uwzględnieniem** dzieła habilitacyjnego		Dorobek naukowy **nieuwzględniający** dzieła habilitacyjnego		Dorobek naukowy **wchodzący w skład** dzieła habilitacyjnego	
	Suma pkt. MNiSW**	Suma IF**	Suma pkt. MNiSW**	Suma IF**	Suma pkt. MNiSW**	Suma IF**
Liczba punktów za publikacje*	**687**	**77,38**	**447**	**53,57**	**240**	**23,81**
Liczba publikacji	**23**		**18**		**5**	

* punkty z roku opublikowania

** Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)

Tabela 2. Porównanie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

Przed uzyskaniem stopnia doktora			
	Liczba publikacji	Suma pkt. MNiSW**	Suma IF**
Liczba punktów za publikacje*	**10**	**122**	**15,71**
Po uzyskaniu stopnia doktora (z uwzględnieniem dzieła habilitacyjnego)			
	Liczba publikacji	Suma pkt. MNiSW**	Suma IF**
Liczba punktów za publikacje*	**13**	**565**	**61,67**

* punkty z roku opublikowania

** Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)

Sumaryczny impact factor: **77,38**
(według listy Journal Citation Reports (JCR); na dzień:2021-11-30)
Liczba cytowań publikacji: **271(261)**
(według bazy Web of Science Core Collection (WoS); na dzień: 2021-11-30)
Indeks Hirscha: **11**
(według bazy Web of Science CC (WoS); na dzień:2021-11-30)
Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **687**
(wg punktacji na rok opublikowania danego artykułu)

Wykaz wszystkich publikacji wraz z opisem mojego udziału znajduje się w załączniku: 4

Zaświadczenia współautorów dotyczące ich udziału znajdują się w załączniku: 5

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Po obronie doktoratu przez rok pracowałem w *Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego* w Warszawie kończąc rozpoczęte doświadczenia i pracując w zespole profesora Krzysztofa Zabłockiego gdzie uczestniczyłem w badaniach zawiązanych z pomiarem poziomu jonów wapnia oraz optymalizacją elektroforezy 2D. Następnie wyjechałem na staż podoktorski do Hiszpanii gdzie miałam możliwość zdobywać doświadczenie naukowe w najlepszych laboratoriach poświęcających się badaniom nad szpiczakiem plazmocytowym. Najpierw pracowałem w *Centrum Badań nad Rakiem w Salamance (Cancer Research Center, Salamanca, Spain)*, potem rozpocząłem współpracę z *Wydziałem Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Salamance (University Hospital of Salamanca, Spain)*. Praca w tych ośrodkach naukowych umożliwiła mi praktyczne zapoznanie z najnowszymi technikami biologii molekularnej. Zarówno w jednym jak i drugim miejscu współpracowałem z grupą naukowców kierowanych przez prof., doktora medycyny Jesús San Miguel, co pozwoliło mi uczyć się od najlepszych naukowców i lekarzy. Współpraca z środowiskiem lekarskim dała mi możliwość spojrzenia na prace naukową z praktycznego, lekarskiego punktu widzenia.

Oprócz omówionych w cyklu projektów prowadziłem również badania, w których zajmowałem się poznawaniem roli metylacji DNA w regulacji ekspresji *mikroRNA214* i *Cykliny D2*. *mikroRNA214* wykazuje niższą ekspresję w komórkach szpiczaka plazmocytowego w porównaniu do normalnych komórek plazmatycznych tak więc uzasadnione było sprawdzenie czy metylacja DNA może być mechanizmem odpowiedzialnym za taki stan rzeczy. Zastosowanie inhibitora metylacji DNA powodowało wzrost ekspresji *mikroRNA214*, co wskazuje na możliwość epigenetycznej regulacji ekspresji tego mikroRNA. W Kolejnym projekcie zdecydowano się badać przyczyny nasilonej ekspresji *Cykliny D2*. W szpiczaku plazmocytowym *Cykliny* nie wykazują typowych oscylacji ekspresji zależnych od cyklu komórkowego i ulegają stałej, nasilonej ekspresji. Co ciekawe, zawsze tylko jedna *cyklina* ma nasiloną ekspresje, co oznacza, że jeżeli występuje wysoka ekspresja *Cykliny D2* to nie ma wysokiej ekspresji *Cykliny D1* i *Cykliny D3.* Ekspresja *Cykliny D2* jest niewykrywalna w komórkach szpiczaka z translokacją t(11:14), tak więc postanowiono sprawdzić czy metylacja DNA może odgrywać rolę w znoszeniu ekspresji *CCND2*. Zaobserwowaliśmy, że wyspa CpG w regionie regulatorowym genu *Cykliny D2* była silnie metylowana tylko w liniach komórkowych szpiczaka plazmocytowego z t(11:14) co wskazuje na udział tej modyfikacji epigenetycznej w regulacji ekspresji. Efektem tej współpracy były dwie publikacje (Misiewicz-Krzeminska et al., 2013, 2016).

Oprócz badań związanych z metylacją DNA brałem udział w projektach mających na celu lepsze poznanie roli białka SDC1 (CD138) w komórkach szpiczaka. Komórki szpiczaka mają zwiększoną ilość białka CD138, jednakże istnieją doniesienia naukowe sugerujące występowanie małej populacji komórek szpiczaka, o charakterystyce komórek macierzystych nowotworów, która wykazuje obniżoną ilość tego białka. Wyniki doświadczeń opisanych w naszej pracy (Paíno et al., 2014) nie wykazały różnic w profilu ekspresji, i wrażliwości komórek linii szpiczaka w zależności od ilości białka CD138 co jest istotne dla lepszego zrozumienia biologii szpiczaka.

Kolejnym projektem, w który byłem zaangażowany podczas mojego stażu podoktorskiego było badanie wariantu receptora androgenowego ARV7 w komórkach raka prostaty. Rak prostaty jest złośliwym nowotworem zależnym od androgenów. U pacjentów z zaawansowaną chorobą często rozwija się oporny na kastrację rak prostaty, który wiąże się z gorszym rokowaniem oraz ekspresją wariantu receptora androgenowego- *ARV7*. Materiał do badań związanych z rakiem prostaty najczęściej pochodzi z biopsji prostaty jednak istnieją doniesienia o możliwości diagnozowania na podstawie badań krwi (Martins et al., 2021). Celem naszych badań było sprawdzenie czy jest możliwa detekcja białka ARV7 w krwi pacjentów używając nowej metody analitycznej podobnej do metody Western Blot, co zostało udowodnione. Efektem współpracy była publikacja (García et al., 2017) której jestem współautorem.

Tematyka badań związanych ze szpiczakiem pozostaje w moim obszarze zainteresowań naukowych, co wiąże się, między innymi, z kontynuacją badań mających na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów działania nowego inhibitora białka cMyc. Onkogen *cMyc* ulga nasilonej ekspresji w komórkach szpiczaka jednakże jak do tej pory (rok 2021) nie ma dostępnych klinicznie inhibitorów tego białka. Udział w tym projekcie zaowocował szeregiem doniesień konferencyjnych oraz zgłoszeniem patentowym: WO2019048679.

Po powrocie do Polski nawiązałem współpracę z Dr. Sara Lopez-Gomollon, pracującą w *RNA Silencing and Disease Resistance Group, Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Wielka Brytania*, która ma na celu opracowanie sondy typu BiFC (BImolecular Fluorescence Complementation) pozwalającej na pomiar i monitorowanie metylacji DNA.

5.1. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z jednostkami krajowymi:

2008-2009
Instytut Biologii Doświadczalnej im M Nenckiego
Grupa badawcza kierowana przez prof. Krzysztofa Zabłockiego

5.2. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z jednostkami zagranicznymi:

2009-2020
Wydział Hematologii, Uniwersytecki Szpital w Salamance, Hiszpania:
Grupa badawcza kierowana przez Dr. Norma C Gutierrez
Grupa badawcza kierowana przez prof. Enrique Ocio
Grupa badawcza kierowana przez Dr. Juan Luis Garcia Hernández
Grupa badawcza kierowana przez prof. Jesús M Hernández-Rivas

2020-do chwili obecnej
Wydział Badań Roślin, Uniwersytet Cambridge, Wielka Brytania
Grupa badawcza kierowana przez Dr. Sara Lopez-Gomollon

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna

Praca laboratoryjna zawsze była ważnym, ale nie jednym elementem mojej działalności naukowej. Przed wyjazdem na staż podoktorski prowadziłem zajęcia z Biochemii dla studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Będąc na stażu podoktorskim, zdobytą wiedzę z zakresu epigenetyki miałem możliwość upowszechniać poprzez prowadzenie zajęć w ramach studiów podyplomowych organizowanych przez Centrum Badań nad Rakiem w Salamance. Bardzo pozytywny odbiór moich zajęć uświadomił mi jak ważne jest przekazywanie posiadanej wiedzy. W związku z tym, po powrocie do Polski, zdecydowałem się na podjęcie pracy, jako Adiunkt w Katedrze Nanobiotechnologii, SGGW w Warszawie, i prowadzenie zajęć dla studentów między innymi z zakresu Biologii komórki nowotworowej i macierzystej, Metabolomiki, Kancerogenezy i Cytofizjologii.

6.2. Opracowanie oraz realizacja zajęć dydaktycznych

Zajęcia realizowane na kierunku Fizjoterapia, wydział medycyny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, rok: 2008

- Biochemia, wykłady, liczba godzin: 15

Przeprowadzenie wykładów z przedmiotu Biochemia wymagało przygotowania od podstaw wszystkich prezentacji oraz dokonania oceny wiedzy studentów podczas egzaminu.

Zajęcia realizowane w ramach fakultetu „Cytogenetyka Molekularna w Onkologii" realizowanego w ramach studów podypolomowych „Biologia i klinika nowotoworów" na Uniwersytecie w Salamance, rok: 2019

-wykład „*Insight into epigenetics in the hematological malignancies*"; liczba godzin: 3

W wygłoszonym wykładzie podsumowywałem najważniejsze dostępne informacje dotyczące roli zmian epigenetycznych w nowotworach hematologicznych.

Od czasu zatrudnienia na stanowisku naukowo-dydaktycznym w Katedrze Nanobiotechnologii, SGGW w Warszawie w 2020 roku prowadziłem zajęcia na czterech kierunkach studiów:

Zajęcia realizowane na kierunku Bioinżynieria zwierząt, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Cytofizjologia - ćwiczenia, liczba godzin: 40
- Kancerogeneza - ćwiczenia, liczba godzin: 15
- Podstawy projektowania Nanobiosystemów - ćwiczenia, liczba godzin: 6
- Badania podstawowe i przedkliniczne - ćwiczenia i wykłady liczba godzin: 6+6

Zajęcia realizowane na kierunku Hodowla i Ochrona Zwierząt Towarzyszących i Dzikich, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Metabolomika- wykłady, liczba godzin: 15

Zajęcia realizowane na kierunku Zootechnika, Wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt

- Metabolomika- wykłady, liczba godzin: 15

Zajęcia realizowane na kierunku Biologia, Wydział Rolnictwa i Biologii

- Biologia komórek nowotworowych i macierzystych – ćwiczenia i wykłady, liczba godzin: 45+15, koordynator przedmiotu

Przedmiot „Biologia Komórki Nowotworowej i Macierzystej" został wprowadzony w roku 2020 i jest obowiązkowym przedmiotem studiów II stopnia na kierunku Biologia. Wprowadzanie nowego przedmiotu łączyło się z koniecznością autorskiego opracowania wszystkich wykładów i tematów ćwiczeń. Większość ćwiczeń została przygotowana w dwóch formach stacjonarnej i niestacjonarnej.

Zajęcia dostępne w formie fakultetu:

- Introduction into Epigenetics- ćwiczenia i wykłady, liczba godzin: 15+15, fakultet zaplanowany do przeprowadzenia w języku angielskim
- Introducción a biología molecular de la célula tumoral- ćwiczenia i wykłady, liczba godzin: 15+15, fakultet zaplanowany do przeprowadzenia w języku hiszpańskim
- Podstawy epigenetyki- ćwiczenia i wykłady, liczba godzin: 5+5, fakultet zaplanowany do przeprowadzenia dla studentów szkoły doktorskiej

6.3. Działalność organizacyjna

- 2006-2007, Udział w organizacji Tygodnia Nauki odbywającego się w ramach Festiwalu nauki,
- 2009, Udział w organizacji laboratorium Hematologii w Centrum Badań nad Rakiem, Salamanka, Hiszpania,
- 2012, Udział w organizacji Krajowego Kongresu Hiszpańskiego Towarzystwa Hematologii i Hemoterapii 54 Krajowego Kongresu Hiszpańskiego Towarzystwa Hematologii i Hemoterapii. (LIV Reunión Nacional SEHH / XXVIII Congreso SETH - Salamanca 18-20, Octubre 2012).

6.4. Działalność popularno-naukowa

Rolę popularyzacji nauki zauważyłem podczas pracy nad doktoratem kiedy to zdecydowałem się na udział w dwóch edycjach Festiwalu Nauki. Kończąc doktorat w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego, współredagowałem wewnętrzny, popularnonaukowy biuletyn BRAINs, w którym były zamieszane najważniejsze doniesienia naukowe z obszaru Neurobiologii jak i bieżące informacje z życia naukowego Instytutu.

- 2006-2007 Przygotowanie wykładu, pokazu i warsztatów z zakresu migracji komórek nowotworowych realizowane podczas Tygodnia Nauki odbywającego się w czasie Festiwalu nauki.
- 2007-2008 Współredagowanie Biuletynu BRAINs wydawanego przez Instytut Biologii Doświadczalnej im M Nenckiego, PAN.

6.5. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

Zrecenzowanie 6 publikacji z czasopism naukowych z listy JCR

a) *International Journal of Cancer*
b) *OncoTargets and Therapy*,
c) *Cancer Management and Research*,
d) *European Journal of Haematology*
e) *Cell Biochemistry & Function*

6.6. Recenzje prac dyplomowych

Recenzja pracy inżynierskiej Pani Małgorzaty Zasowskiej pt: “Konstrukcja wektora lentiwirusowego do wygenerowania modelu komórkowego ostrej białaczki szpikowej z mutacją FLT3”; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii, realizowanej w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie; promotor: dr n. med. inż. Piotr Mrówka.

6.7. Opieka naukowa

6.7.1. Opieka naukowa nad doktorantami podczas stażu w Hiszpanii

Podczas stażu podoktorskiego w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance w Hiszpanii, byłym opiekunem naukowym (nie promotorem) dwojga doktorantów. Moja rola polegała na pomocy w optymalizacji doświadczeń laboratoryjnych, interpretacji wyników i planowaniu dalszych badań.

- Dalia Quwaider, Promotor: Gutierrez C Norma, tytuł pracy: “Nowe spojrzenie na różnicowanie komórek plazmatycznych w szpiczaku mnogim: rola DEPTOR i IRE1”, (pisownia orginalna: New insights into plasma cell differentiation and unfolded protein response in multiple myeloma: role of DEPTOR and IRE1) praca realizowana w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance Hiszpanii
  obrona: 25-11-2020

- Pedro Mogollon, Promotor: Ocio Enrique, tytuł pracy: “Przedkliniczna ocena mechanizmów oporności na leki immunomodulujące w szpiczaku mnogim”, (pisownia orginalna: Evaluación preclínica de mecanismos de resistencia a fármacos inmunomoduladores en mieloma múltiple), praca realizowana w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance Hiszpanii
  obrona: 29-10-2021

6.7.2. Opieka naukowa realizowana w ramach wymiany międzynarodowej

Kolejną pracą dydaktyczną była opieka naukowa nad doktorantem: Agnieszką Wesołowską z Instytutu Biologii Doświadczalnej im M Nenckiego, która odbywała staż naukowy w laboratorium w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance (Centro de Investigación del Cáncer Salamanca) w ramach programu Erasmus plus (3 miesiące, 2017). Moim zadaniem było opracowanie hipotezy badawczej dotyczącej udziału metylacji w regulacji ekspresji genu HNRNPA2B1 oraz opracowanie warsztatu badań. Tematyka badań obejmowała również badanie metylacji DNA promotora genu p53 w liniach komórkowych szpiczaka i wybranych próbkach pacjentów.

6.7.3. Opieka naukowa nad doktorantami

- Promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Wiktorii Frączek pt. „Wpływ nanocząstek diamentu na szlak kinaz tyrozynowych w glejaku wielopostaciowym", której promotorem jest dr hab. Marta Grodzik prof. SGGW, Instytut Biologii, SGGW w Warszawie.

6.7.4. Opieka naukowa nad studentami

Opieka naukowa obejmowała zaplanowanie tematu badań, nadzór i weryfikację poprawności wykonania doświadczeń. Zaproponowane prace badawcze obejmowały, między innymi, optymalizację wprowadzania obcego DNA metodą elektroporacji do linii komórek mezenchymalnych i komórek szpiczaka oraz badanie wpływu nanocząstek na metylację DNA.

- Klara Siejda, wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt SGGW w Warszawie, temat pracy inżynierskiej:
  "Optymalizacja elektroporacji linii komórkowej HS5"
  Planowany termin obrony: styczeń 2022

- Wiktoria Lewandowska, Wydział Biologii i Biotechnologii SGGW w Warszawie, temat pracy licencjackiej:
  "Wpływ nanocząstek na wydajność elektroporacji- nukleofekcji komórek linii szpiczaka"
  Planowany termin obrony: czerwiec 2022

- Paulina Pisarek, wydział Hodowli, Bioinżynierii i Ochrony Zwierząt SGGW w Warszawie, temat pracy magisterskiej:
  „Rola modyfikacji epigenetycznych w efekcie cytotoksycznym powodowanym nanocząstkami srebra w komórkach szpiczaka"
  Planowany termin obrony: czerwiec 2022

7. Inne informacje

Tytuł doktora nauk biologicznych uznany za równorzędny z hiszpańskim przez Uniwersytet w Salamance (Universidad de Salamanca), w wyniku procedury homologacji tytułu, co wiązało się z osobistym przetłumaczeniem całej rozprawy na język angielski i koniecznością jej oceny przez komisję z Uniwersytetu w Salamance.

7.1. Najważniejsze szkolenia naukowe

- The Manager's Toolkit: A Practical Guide to Managing People at Work, Coursera, online course, 2018
- Medycyna oparta na faktach: wprowadzenie do metaanalizy poprzez praktyczne przypadki, SIMFIT, CMA i metafor de R. IBSAL, Salamanka, Hiszpania, 2019
- Standardy Dobrej Praktyki Klinicznej, IBSAL, Salamanka, Hiszpania, 2020

Patryk Wiszniewski
(podpis wnioskodawcy)

Załącznik 4

WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUK BIOLOGICZNYCH

dr inż. Patryk Krzemiński

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa 2021

Spis treści

I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY 4

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a Ustawy; 4

2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy; 4

3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c Ustawy. 6

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ 7

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1) 7

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych. 7

3. Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii. 7

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2). 7

4.1 Artykuły opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora: 7

4.2 Artykuły opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora niewchodzące w cykl habilitacyjny: 9

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3). 12

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3) 12

7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych. 12

7.1 Wystąpienia na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych- wykłady na zaproszenie 12

7.2 Wystąpienia na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych- Doniesienia konferencyjne 12

8. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji. 14

9. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów. 14

9.1 Projekty w toku realizacji 14

9.2 Projekty zrealizowane 15

10. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach. 17

11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru. 18

12. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.). 18

13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych. 18

14. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych. 18

15. Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9. 18

16. Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny. 19

III. INFORMACJA O WSPÓŁPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM 19

1. Wykaz dorobku technologicznego. 19

2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym. 19

3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe. 19

4. Informacja o wdrożonych technologiach. 19

5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców. 19

6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych. 20

7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi. 20

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE 20

1. Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny). 20

2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań. 20

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha. 20

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW. 20

I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Monografia naukowa, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a Ustawy;

brak

2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy;

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie prac naukowych (4 oryginalnych i jednej przeglądowej), opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports o łącznym IF=23.81

Nazwa cyklu:
"Wpływ wybranych zmian genetycznych i epigenetycznych na patogenezę szpiczaka plazmocytowego"

Artykuły wchodzące w skład cyklu:

1. **Krzemiński Patryk**, Sarasquete E María, Misiewicz-Krzemińska Irena, Corral Rocío, Corchete A Luis, Martín A Ana, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
   Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma.
   Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849 (3), 353-366
   IF_{2015}=6.26, punkty $MNiSW_{2015}$=40, Liczba cytowań do 01/11/2021=12(15)

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń z wyjątkiem analizy ekspresji mikroRNA155 w próbkach RNA pacjentów chorych na szpiczaka plazmocytowego. Przeprowadziłem doświadczenia polegające na sprawdzeniu poziomu metylacji DNA promotora genu gospodarza mikroRNA155. Wybrałem sekwencje DNA do analizy, zaprojektowałem potrzebne oligonuklotydy, zoptymalizowałem reakcje PCR i MSP-PCR (ang. Methylation Specific PCR). Przeprowadziłem modyfikacje DNA za pomocą wodorosiarczanu sodu umożliwiającą badanie metylacji DNA. Sklonowałem sekwencje promotora genu gospodarza mikroRNA155 i wklonowałem do wektora (plazmidu) umożliwiającego badanie metylacji DNA in vitro. Zoptymalizowałem i wykonałem doświadczenia ChIP (ang. Chromatin Immuno Precipitation). Zoptymalizowałem i wykonałem doświadczenia EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay). Zaprojektowałem oligonuklotydy w celu przeprowadzenia reakcji RMDM (ang. RNA mediated DNA methylation). Zbadałem wpływ działania decytabiny na metylacja promotora genu gospodarza mikroRNA155. Wyekstrahowałem DNA z próbek pacjentów chorych na szpiczaka plazmocytowego w celu zbadania metylacji promotora genu gospodarza mikroRNA-155. Opracowałem i przeanalizowałem wyniki. Przygotowałem dane, źródła bibliograficzne, tabele, ryciny oraz tekst manuskryptu. Mój udział w powstanie tej pracy oceniam na 85%.

2. **Krzemiński Patryk**, Corchete A Luis, García L Juan, López-Corral Lucia, Fermiñán Encarna, García M Eva, Martín A Ana, Hernández-Rivas M Jesús, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse.
Oncotarget, 2016, 7 (49), 80664-80679

   IF_{2016}=5.32, punkty $MNiSW_{2016}$=40, Liczba cytowań do 01/11/2021=11(10)

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotezy i koncepcji badań oraz na wykonaniu większości doświadczeń. Wyekstrahowałem DNA i RNA z 40 próbek pacjentów chorych na szpiczaka plazmocytowego. Przygotowałem i wykonałem hybrydyzację immunoprecypitowanych i amplifikowanych próbek DNA do mikromacierzy pozwalających na badanie metylacji DNA. Zaprojektowałem analizę danych mikromacierzy. Zaplanowałem i przeprowadziłem walidację otrzymanych wyników przy użyciu linii komórkowych szpiczaka plazmocytowego. Zinterpretowałem i napisałem tekst manuskryptu. Przeprowadziłem analizę bibliograficzną i przygotowałem ostateczne wersje wszystkich rycin i tabel, przygotowałam kolejne wersje manuskryptu. Mój udział w powstanie tej pracy oceniam na 80%.

3. Misiewicz-Krzemińska Irena, **Krzemiński Patryk**, Corchete A Luis, Quwaider Dalia, Rojas A Elizabeta, Belén Herrero Ana, Gutiérrez C Norma.
Factors regulating microRNA expression and function in multiple myeloma.
Non-coding RNA, 2019, 5 (1), 9

   IF_{2019}=2.03, punkty $MNiSW_{2019}$=20, liczba cytowań do 01/11/2021=13(13)

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie bibliograficznej, napisaniu rozdziału na temat regulacji mikroRNA przez zmiany epigenetyczne i przygotowaniu części rycin i tabel. Mój udział w powstanie tej pracy oceniam na 20%.

4. **Krzemiński Patryk,** García-Sanz Ramón, Gutiérrez C Norma.
Zebularine-induced myeloma cell death is accompanied by decreased c-Myc expression.
Cellular oncology, 2020, Aug;43(4):743-750
IF_{2020}=5.3, punkty $MNiSW_{2020}$=100, liczba cytowań do 01/11/2021=2(2)

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu hipotezy i koncepcji badań oraz na wykonaniu wszystkich opisanych w pracy doświadczeń. Między innymi, wykonałem doświadczenia sprawdzające zmiany poziomu metylacji DNA w 9 liniach komórkowych szpiczaka plazmocytowego traktowanych zebularyną. Wykazałem, że inkubacja komórek linii szpiczaka z zebularyną powoduje obniżenie ilości białka cMyc. Wykazałam, ze jednym z mechanizmów śmierci komórek szpiczaka powodowanej zebularyną są uszkodzenia DNA. Przeprowadziłem doświadczenia wskazujące na udział enzymu deaminazy cytydyny (CDA) na aktywność zebularyny. Przeprowadziłem analizę bibliograficzną i przygotowałem wszystkie ryciny i tabele, napisałem i przygotowałem kolejne wersje manuskryptu. Mój udział w powstanie tej pracy oceniam na 90%.

5. Misiewicz-Krzemińska Irena, de Ramón Cristina, Corchete A Luis, **Krzemiński Patryk**, Rojas A Elizabeta, Isidro Isabel, García-Sanz Ramon, Martínez-López Juan, Oriol Albert, Bladé Jorge, Lahuerta J Juan, San Miguel F Jesus, Rosiñol Laura, Mateos V Maria, Gutiérrez C Norma.
Quantitative expression of Ikaros, IRF4, and PSMD10 proteins predicts survival in VRD-treated patients with multiple myeloma
Blood Advances, 2020, Dec 8;4(23):6023-6033

IF_{2020}=4.9, punkty $MNiSW_{2020}$=40, liczba cytowań do 01/11/2021=2(2)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na rozwinięciu hipotezy i koncepcji badań oraz interpretacji wyników doświadczeń. Zaproponowałem badanie receptora dla glukokortykoidów (GCR) i eksportyny (XPO1). Brałem udział w organizacji wyników doświadczeń i sposobie ich przedstawienia. Przeprowadziłem analizę bibliograficzną związaną z regulacją aktywności białek odpowiedzialnych za działanie glikokortykoidów, brałem udział w przygotowywaniu rycin, tabel i tworzeniu kolejnych wersji manuskryptu. Mój udział w powstanie tej pracy oceniam na 35%.

Całkowity Impact Factor wymienionych prac z moim udziałem: 23,81

3. Wykaz zrealizowanych oryginalnych osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych lub artystycznych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c Ustawy.
brak

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

brak

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych.

brak

3. Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii.

brak

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) niewymienione w pkt I.2

4.1 Artykuły opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Bobeszko Marta, **Krzemiński Patryk**, Pomorski Paweł, Dygas Anna, Barańska Jolanta.
   Expression and regulation of phospholipase D isoforms in sphingosine and phorbol ester-stimulated glioma C6 cells.
   Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 317 (3), 689-696
   IF_{2004}=2.9, punkty $MNiSW_{2004}$=12
   Mój wkład polegał na wykonaniu doświadczeń sprawdzających zmiany cytoszkieletu aktynowego po traktowaniu komórek glejaka linii C6, sfingozyną.

2. **Krzemiński Patryk***
   Modulation of ERK1/2 activity is crucial for sphingosine-induced death of glioma C6 cells.
   Acta Biochimica Polonica, 2005, 52 (4), 927-930
   IF_{2005}=2.08, punkty $MNiSW_{2005}$=10
   Mój wkład polegał na wykonaniu wszystkich doświadczeń w tej pracy, analizie wyników napisaniu manuskryptu.

3. Banachewicz Wiktor, Supłat Dorota, **Krzemiński Patryk**, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta.
   P2 nucleotide receptors on C2C12 satellite cells.
   Purinergic signaling, 2005, 1 (3), 249-257
   IF_{2005}=0.63, punkty $MNiSW_{2005}$=0
   Mój wkład polegał na wykonaniu zdjęć zróżnicowanych komórek linii C2C12 i pomocy przy analizie ilości białek.

4. Kłopocka Wanda, Wierzbicka Katarzyna, Pomorski Paweł, **Krzemiński Patryk**, Wasik Anna.
   Cofilin-like Protein Influences the Motility of Amoeba proteus.
   Acta Protozoologica, 2006, 1963; 45, 449-393
   IF_{2006}=1.1, punkty $MNiSW_{2006}$=10
   Mój wkład polegał na wykonaniu analizy białek metodą Western Blot.

5. Targos Berenika, Pomorski Paweł, **Krzemiński Patryk**, Barańska Jolanta, Rędowicz J Maria.
   Effect of Rho-associated kinase inhibition on actin cytoskeleton structure and calcium response in glioma C6 cells.
   Acta Biochimica Polonica, 2006, 53 (4), 825-831
   IF_{2006}=1.3, punkty $MNiSW_{2006}$=10
   Mój wkład polegał na wykonaniu barwienia cytoszkieletu aktynowego.

6. **Krzemiński Patryk**, Misiewicz Irena, Pomorski Paweł, Kasprzycka-Guttman Teresa, Barańska Jolanta.
   Mitochondrial localization of P2Y1, P2Y2 and P2Y12 receptors in rat astrocytes and glioma C6 cells.
   Brain Research Bulletin, 2007, 71 (6), 587-592
   IF_{2007}=1.93, punkty $MNiSW_{2007}$=20
   Mój wkład polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń za wyjątkiem analizy co-lokalizacji bandanach receptorów z mitochondriami. Przeprowadziłem analizę bibliograficzną i przygotowałem wszystkie ryciny i tabele, napisałem i przygotowałem kolejne wersje manuskryptu.

7. **Krzemiński Patryk**, Supłat Dorota, Czajkowski Rafał, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta.
   E*xpression and functional characterization of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors in long-term serum-deprived glioma C6 cells.*
   FEBS Journal, 2007 274 (8), 1970-1982
   IF_{2007}=3.39, punkty $MNiSW_{2007}$=10
   Mój wkład polegał na wykonaniu większości doświadczeń, opracowaniu graficznym wyników, analizie bibliograficznej oraz napisaniu części manuskryptu.

8. Supłat Dorota, **Krzemiński Patryk**, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta.
   P2Y1 and P2Y12 receptor cross-talk in calcium signalling: Evidence from nonstarved and long-term serum-deprived glioma C6 cells.
   Purinergic signaling, 2007, 3 (3), 221-230
   IF_{2007}=0.6, punkty $MNiSW_{2007}$=10
   Mój wkład polegał na wykonaniu części doświadczeń, wsparciu merytorycznym i analizie bibliograficznej.

9. Pomorski Paweł, **Krzemiński Patryk**, Wasik Anna, Wierzbicka Katarzyna, Barańska Jolanta.
   Actin dynamics in Amoeba proteus motility.
   Protoplasma, 2007, 231 (1-2), 31-41
   IF_{2007}=1.68, punkty $MNiSW_{2007}$=20
   Mój wkład polegał na wykonaniu części doświadczeń, wsparciu merytorycznym i analizie bibliograficznej.

10. **Krzemiński Patryk**, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta.
The P2Y14 receptor activity in glioma C6 cells.
European Journal of Pharmacology, 2008, 594 (1-3), 49-54
IF_{2008}=2.5, punkty $MNiSW_{2008}$=20
Mój wkład polegał na wykonaniu wszystkich doświadczeń, analizie bibliograficznej, sporządzeniu rycin i napisaniu manuskryptu.

**autor korespondencyjny*

4.2 Artykuły opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora niewchodzące w cykl habilitacyjny:

1. Korczyński Jarosław, Sobierajska Katarzyna, **Krzemiński Patryk**, Wasik Anna, Wypych Dorota, Pomorski Paweł, Kłopocka Wanda.
Is MLC phosphorylation essential for the recovery from ROCK inhibition in glioma C6 cells.
Acta Biochimica Polonica, 2011, 58 (1), 125-130.
IF_{2011}=1.4, punkty $MNiSW_{2011}$=15
Mój wkład polegał na wykonaniu części doświadczeń, wsparciu merytorycznym i analizie bibliograficznej.

2. Misiewicz-Krzemińska Irena, Sarasquete E María, Quwaider Dalia, **Krzemiński Patryk**, Ticona V Fany, Paíno Teresa, Delgado Manuel, Aires Andreia, Ocio M Enrique, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication.
Haematologica, 2013, 98 (4), 640-648.
IF_{2013}=5.86, punkty $MNiSW_{2013}$=40
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na optymalizacji analizy metylacji DNA promotora genu mikroRNA214 i przeprowadzeniu odpowiednich doświadczeń z zastosowaniem linii komórkowych szpiczaka plazmocytowego.

3. Paíno Teresa, Sarasquete E María, Paiva Bruno, **Krzemiński Patryk**, San-Segundo Laura, Corchete A Luis, Redondo Alba, Garayoa Mercedes, García-Sanz Ramón, Gutiérrez C Norma, Ocio M Enrique, San-Miguel F Jesús.
Phenotypic, Genomic and Functional Characterization Reveals No Differences between CD138++ and CD138 low Subpopulations in Multiple Myeloma Cell Lines.
PloS one, 2014, 9 (3), e9237.
IF_{2014}=3.2, punkty $MNiSW_{2014}$=40
Mój wkład polegał na wykonaniu barwień białka CD138 w komórkach szpiczaka, wsparciu merytorycznym, analizie bibliograficznej i interpretacji wyników.

4. Herrero B Ana, Rojas A Elizabeta, Misiewicz-Krzemińska Irena, **Krzemiński Patryk**, Gutiérrez C Norma.
Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma.
International Journal of Molecular Sciences, 2016, Nov 30;17(12):2003.
IF_{2016}=3.2, punkty $MNiSW_{2016}$=30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na analizie bibliograficznej, napisaniu rozdziału na temat regulacji ekspresji TP53 przez metylację DNA, przygotowaniu rycin i tabel napisaniu odpowiedniej części manuskryptu.

5. Misiewicz-Krzemińska Irena, Sarasquete E Maria, Vicente-Dueñas Carolina, **Krzemiński Patryk**, Wiktorska Katarzyna, Corchete A Luis, Quwaider Dalia, Rojas A Elizabeta, Corral Rocío, Martín A Ana, Escalante Fernando, Bárez Abelardo, García L Juan, Sánchez-García Isidro, García-Sanz Ramón, San Miguel F Jesús, Gutiérrez C Norma.
Post-transcriptional modifications contribute to the upregulation of cyclin D2 in multiple myeloma.
Clinical Cancer Research, 2016, 22 (1), 207-217.
IF_{2016}=9.62, punkty $MNiSW_{2016}$=45

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na optymalizacji analizy metylacji DNA promotora genu Cykliny D2 i przeprowadzeniu odpowiednich doświadczeń z zastosowaniem 5 linii komórkowych szpiczaka plazmocytowego.

6. García L Juan, Lozano Ramon, Misiewicz-Krzemińska Irena, Fernández-Mateos Jorge, **Krzemiński Patryk,** Alfonso Sailyn, Marcos A Rosana, García Ramon, Gómez-Veiga Francisco, Virseda Álfredo, Herrero Mercedes, Olmos David, Cruz-Hernández J Juan.
A novel capillary nano-immunoassay for assessing androgen receptor splice variant 7 in plasma. Correlation with CD133 antigen expression in circulating tumor cells.
Clinical and Translational Oncology, 2017, 19 (11), 1350-1357.
IF_{2017}=3, punkty $MNiSW_{2017}$=15

   Mój wkład polegał na wykryciu i wykonaniu analizy białka ARV-7 w lizatach linii komórkowych i próbkach pochodzących od pacjentów, interpretacji wyników i wsparciu merytorycznym.

7. Quwaider Dalia, Corchete A Luis, Misiewicz-Krzemińska Irena, Sarasquete E María, Pére J José, **Krzemiński Patryk**, Puig Noemí, Mateos V María, García-Sanz Ramón, Herrero B Ana, Gutiérrez C Norma.
DEPTOR maintains plasma cell differentiation and favorably affects prognosis in multiple myeloma.
Journal of Hematology & Oncology, 2017, 10 (1), 92.
IF_{2017}=7.3, punkty $MNiSW_{2017}$=40

   Mój wkład polegał na wykonaniu części doświadczeń, wsparciu merytorycznym i analizie bibliograficznej.

8. Pankiewicz Piotr, Szybiński Marcin, Kisielewska Katarzyna, Gołębiowski Filip, **Krzemiński Patryk**, Rutkowska-Włodarczyk Izabela, Moszczyński-Petkowski Rafał, Gurba-Bryśkiewicz Lidia, Delis Monika, Mulewski Krzysztof, Damian Smuga, Dominowski Jakub, Janusz Artur, Górka Michał, Abramski Krzysztof, Napiórkowska Agnieszka, Nowotny Marcin, Dubiel Krzysztof, Kalita Katarzyna, Wieczorek Maciej, Pieczykolan Jerzy, Matłoka Mikołaj.
Do Small Molecules Activate the TrkB Receptor in the Same Manner as BDNF? Limitations of Published TrkB Low Molecular Agonists and Screening for Novel TrkB Orthosteric Agonists.
Pharmaceuticals, 2021, 14(8), 704.
IF_{2021}=4.28, punkty $MNiSW_{2021}$=100

   Mój wkład polegał na zoptymalizowaniu i wykonaniu badań przesiewowych biblioteki 600 związków zaprojektowanych tak żeby aktywować białko TrkB. Badania były wykonane stosując technikę termoforezy.

Liczba publikacji uzyskanych po otrzymaniu tytułu doktora niewchodzących w cykl habilitacyjny: **8**

Całkowity Impact factor publikacji uzyskanych po otrzymaniu tytułu doktora i *niewchodzących* w cykl habilitacyjny: **37.86**

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).
Nie dotyczy

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).
Nie dotyczy

7. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

7.1 Wystąpienia na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych- wykłady na zaproszenie

1. **Krzemiński Patryk,** Barańska Jolanta. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Grecja, 9-11 października 2008 (doniesienie ustne). Wykład na zaproszenie organizatorów.
2. **Krzemiński Patryk,** Barańska Jolanta. P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors and their role in modulation of cellular signaling in glioma cell lines. 43 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, I Kongres Polskiej Biochemii i Biologii Komórki, Olsztyn, 8-11 września 2008 (doniesienie ustne). Wykład na zaproszenie organizatorów.

7.2 Wystąpienia na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych- Doniesienia konferencyjne

1. Poster (Doniesienie konferencyjne): Expression levels of p53 mRNA isoforms refine prognosis in Multiple Myeloma. Rojas Elizabeta, Corchete Luis, De Ramón Cristina, Quwaider Dalia, **Krzemiński Patryk**, Martínez-López Joaquín, García-Sanz Ramón, Bladé Joan, Lahuerta Juan, San Miguel Jesús, Mateos V María, Misiewicz-Krzemińska Irena, Gutiérrez C Norma. 25th Congress of European-Hematology-Association, EHA Library. 06/12/20; 294791; EP874, 2020
2. Poster (Doniesienie konferencyjne): Transcriptome analysis after Dexamethasone exposure differentiates response to glucocorticoids in Multiple Myeloma. **Krzemiński Patryk** , Corchete Luis, García-Sanz Ramon, Gutiérrez C Norma, 24th Congress of European-Hematology-Association, Amsterdam, Holandia, HemaSphere 3, 947, 2019
3. Poster (Doniesienie konferencyjne): Molecular mechanisms of the novel c-Myc targeted compound IDP-501 in MM. **Krzemiński Patryk**, González Méndez Lorena, San Segundo Laura, Mogollón Pedro, Díaz Andrea, Ocio M Enrique. 06/15/18; 214969; PF515, 23rd Congress of European-Hematology-Association, Stockholm, Szwecja, 14-17 czerwca 2018, EHA Library
4. Poster (Doniesienie konferencyjne): Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in Multiple Myeloma reveals alteration related to relapse. **Krzemiński Patryk**, Corchete Luis, Martín Ana, López-Corral Lucía, Fermiñán Encarna, García Eva, García Juan, Hernández-Rivas Jesús, García-Sanz Ramón, San

Miguel Jesús, Gutiérrez Norma, EHA Library. Krzemiński P. 06/09/16; 132803; E1254, 2016

5. Poster (Doniesienie konferencyjne): Efecto de la modulación farmacológica del spliceosoma en el patrón de splicing de ARN de las células mielomatosas. Rojas Elizabeta, Misiewicz-Krzemińska Irena, Corchete Luis, Fermiñán Encarna, Isidro Isabel, **Patryk Krzemiński**, López-Corral Lucía, Gutiérrez Norma. LVI Congreso Nacional de la SEHH y XXX Congreso Nacional de la SETH, Madryt, Hiszpania, 2014
6. Poster (Doniesienie konferencyjne): Post-Transcriptional Modifications Explain the Overexpression of CCND2 in Multiple Myeloma. Misiewicz-Krzemińska Irena, Sarasquete Maria, Vicente-Dueñas Carolina, **Krzemiński Patryk**, Wiktorska Katarzyna, Quwaider Dalia, Rojas Elizabeta, Corral Rocío, Corchete Luis, Martin Ana, Escalante Fernando, Bárez Abelardo, Garcia Juan, Sanchez-Garcia Isidro, García-Sanz Ramón, San Miguel Jesus, Gutierrez Norma. 54th Annual Meeting and Exposition of the American-Society-of-Hematology (ASH), San Francisco, USA, 2014
7. Poster (Doniesienie konferencyjne): A novel function of DEPTOR in multiple myeloma: commitment to plasma cell maturation. Quwaider Dalia, Herrero Ana, **Krzemiński Patryk**, Corchete Luis, Puig Noemí, Mateos María, García-Sanz Ramón, Gutiérrez Norma. 15th International Myeloma Workshop. Włochy, September 23-26, Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia 15, e215-e216, 2015
8. Poster (Doniesienie konferencyjne): Mechanisms responsible for the de-regulation of cereblon as a central element in resistance to immunomodulators in multiple myeloma. Mogollon Pedro, Gonzalez-Mendez Lorena, Hernandez-Garcia Suzana, **Krzemiński Patryk**, Diaz-Tejedor Andrea, San-Segundo Laura, Algarin Esperanza, Martin-Sanchez Maria, Benayas Beltran, Corchete Luis, Gutierrez C Norma, Mateos V Maria, Garcia Juan, Paino Teresa, Garayoa Mercedes, Ocio Enrique.
   Congress of European-Hematology-Association, Stockholm, Szwecja, 14-17 czerwca 2018, EHA Library Haematologica V 103, 84-85, 2018
9. Poster (Doniesienie konferencyjne): Polymerization of actin in migrating and pinocytotic Amoeba proteus. Pomorski Paweł, Wasik Anna, **Krzemiński Patryk**, Wierzbicka Katarzyna, Barańska Jolanta. PP-935, FEBS congress, The Febs Journal 273, 2006
10. Poster (Doniesienie konferencyjne): Actin dynamic in Amoeba proteus motility: PP-938. Kłopocka Wanda, Pomorski Paweł, **Krzemiński Patryk,** Wasik Anna, Barańska Jolanta. FEBS congress, The Febs Journal 273, 2006
11. Poster (Doniesienie konferencyjne): Adenosine receptors in growth arrested glioma cells: PP-59. **Krzemiński Patryk,** Barańska Jolanta. FEBS congress, The Febs Journal 273, 2005
12. Poster (Doniesienie konferencyjne): Relation between P2Y and MAPK signaling in serum-deprived and non-starved C6 glioma cells. **Krzemiński Patryk,** Czajkowski Rafał, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta. Parnas conference. - 77, № 2 C. 63, 2005
13. Poster (Doniesienie konferencyjne): P2X receptors in glioma C6 cells. Anna Dygas, **Krzemiński Patryk**, Supłat Dorota, Bobeszko-Kacperska Marta, Barańska Jolanta. Parnas conference. - 77, № 2 - C. 52, 2005
14. Poster (Doniesienie konferencyjne): P2 nucleotide receptors on C2C12 cells. Supłat Dorota, **Krzemiński Patryk**, Banachewicz Wiktor, Pomorski Paweł, Barańska Jolanta. Parnas conference. - 77, № 2 C. 77, 2005
15. Poster (Doniesienie konferencyjne): Role of calcium signaling in compensation of Rho dependent kinase inhibition. Korczyński Jarosław, Gregor Arthur, **Krzemiński Patryk**, Pomorski Paweł, Wasik Anna, Kłopocka Wanda.
    Parnas conference. - 81, № 4 C. 88, 2005

8. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.
brak

9. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

9.1 Projekty w toku realizacji

1. TYTUŁ PROJEKTU: Badanie roli cykliny D w patogenezie szpiczaka mnogiego i jej znaczenia prognostycznego
   NUMER PROJEKTU: PI19 / 00674
   GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Instytut Zdrowia Im. Karola III, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 850 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2020 - 12.12.2023

2. TYTUŁ PROJEKTU: W kierunku medycyny precyzyjnej w szpiczaku: poszukiwanie biomarkerów predykcyjnych, pokonywanie oporności i poszukiwanie nowych celów terapeutycznych
   NUMER PROJEKTU: PROYE20047GUTI
   GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Fundacja Naukowa Hiszpańskiego Stowarzyszenia Walki z Rakiem
   UDZIELONA KWOTA: 1 200 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2021 - 12.12.2024

3. TYTUŁ PROJEKTU: Biologiczna ewaluacja nowych inhibitorów białka c-Myc
   NUMER PROJEKTU: nie dotyczy
   GŁÓWNY BADACZ: Santiago Esteban
   ROLA W PROJEKCIE: **kierownik wspomagający** (ang. co-leader)
   PODMIOT PRZYZNAJACY: IDP-Pharma, Hiszpania
   CZAS TRWANIA: od 01.01.2017

9.2 Projekty zrealizowane

4. TYTUŁ PROJEKTU: Identyfikacja genów niezbędnych do przeżycia komórek szpiczaka mnogiego za pomocą technologii CRISPR-Cas9
   NUMER PROJEKTU: GRS1833 / A / 18
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Zarząd Regionalny Zdrowia Publicznego Regionu Autonomicznego Kastylii i Leon, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 60 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2019 - 31.12.2019

5. TYTUŁ PROJEKTU: Badanie zaburzeń regulacji transkryptomu wywołanego deksametazonem w szpiczaku mnogim, jako cel pokonania oporności na glukokortykoidy
   NUMER PROJEKTU: GRS1654 / A / 17
   GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
   ROLA W PROJEKCIE: główny wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Zarząd Regionalny Zdrowia Publicznego Regionu Autonomicznego Kastylii i Leon, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 80 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2018 - 31.12.2018

6. TYTUŁ PROJEKTU: Badanie stanu funkcjonalnego p53 w szpiczaku mnogim i jego wpływ na odpowiedź terapeutyczną i przeżycie pacjentów
   NUMER PROJEKTU: PI16 / 01074
   GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Instytut Zdrowia Im. Karola III, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 600 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2017 - 31.12.2019

7. TYTUŁ PROJEKTU: Ocena aktywności przeciwnowotworowej amilorydu w przedklinicznych modelach szpiczaka mnogiego
   NUMER PROJEKTU: BIO / SA22 / 15
   GŁÓWNY BADACZ: Misiewicz-Krzemińska Irena
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Zarząd Regionalny Zdrowia Publicznego Regionu Autonomicznego Kastylii i Leon, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 120 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2015 - 31.12.2015

8. TYTUŁ PROJEKTU: Analiza markerów oporności w szpiczaku mnogim i opracowanie terapeutycznych możliwości przezwyciężenia oporności: projekt oparty na dwóch krajowych wieloośrodkowych badaniach
   NUMER PROJEKTU: GCB120981SAN_Cna
   GŁÓWNY BADACZ: García-Sanz Ramón
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   CZAS TRWANIA: 2013 - 2017
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Fundacja Naukowa Hiszpańskiego Stowarzyszenia Walki z Rakiem

9. TYTUŁ PROJEKTU: Badanie mechanizmów odpowiedzialnych za nabytą oporność na nowe leki przeciwko szpiczakowi mnogiemu
   NUMER PROJEKTU: PI11/01465
   GŁÓWNY BADACZ: Ocio San Miguel Enrique María
   ROLA W PROJEKCIE: wykonawca
   PODMIOT PRZYZNAJACY: Instytut Zdrowia Im. Karola III, Hiszpania
   UDZIELONA KWOTA: 500 000 złotych
   CZAS TRWANIA: 01.01.2012 - 31.12.2014

10. TYTUŁ PROJEKTU: Badanie genetycznych podstaw nawrotu szpiczaka mnogiego poprzez integrację analizy genomu i globalnej metylacji
    NUMER PROJEKTU: GRS 702/A/11
    GŁÓWNY BADACZ: Gutiérrez C Norma
    ROLA W PROJEKCIE: główny wykonawca
    PODMIOT PRZYZNAJACY: Fundacja Naukowa Hiszpańskiego Stowarzyszenia Walki z Rakiem
    UDZIELONA KWOTA: 400 000 złotych
    CZAS TRWANIA: 15/03/2011 - 15/03/2013

11. TYTUŁ PROJEKTU: Ekspresja receptorów nukleotydowych w komórkach glejaka C6 oraz glioblastomy multiforme T98g i glioblastomy LN-18
    NUMER PROJEKTU: 1945/P01/2007/32
    GŁÓWNY BADACZ: Barańska Jolanta
    ROLA W PROJEKCIE: wykonawca (grant promotorski)
    PODMIOT PRZYZNAJACY: Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego
    UDZIELONA KWOTA: 50 000 złotych
    CZAS TRWANIA: 01/03/2007 - 01/03/2008

Zrealizowane projekty: 11
Projekty w realizacji: 3

10. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Europejskie Stowarzyszenie Hematologiczne, członek zwyczajny
Polskie Towarzystwo Biochemiczne, członek zwyczajny
Polskie Towarzystwo Genetyczne, członek zwyczajny

11. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

01.07.2009- 09.09.2021, 11 lat, staż podoktorski, Centrum Badań nad Rakiem, Wydział Hematologii, Szpital Uniwersytecki w Salamance, Hiszpania (Centro de Investigación del Cáncer, Departamento de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, España)

12. Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).
brak

13. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

1. *International Journal of Cancer* 2020*,* 2 manuskrypty
2. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 1 manuskrypt
3. *Cancer Management and Research*, 2020, 1 manuskrypt
4. *European Journal of Haematology* 2017, 1 manuskrypt
5. *Cell Biochemistry & Function* 2015, 1 manuskrypt

Recenzja pracy inżynierskiej pt: "Konstrukcja wektora lentiwirusowego do wygenerowania modelu komórkowego ostrej białaczki szpikowej z mutacją *FLT3"*; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa i Biotechnologii.

14. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.
Brak

15. Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.

15.1. Udział jako kierownik wspomagający (ang. co-leader) w projekcie realizowanym we współpracy z Dr Enrique Ocio z Szpitala Uniwersyteckiego w Santanderze (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria), Santander, Hiszpania, i IDP-Pharma, Barcelona, Hiszpania

15.2. Współpraca z Dr Sara Lopez-Gomollon, RNA Silencing and Disease Resistance Group, Department of Plant Sciences University of Cambridge, Wielka Brytania, mająca na celu opracowanie nowej metody badania metylacji DNA.

15.3. Współpraca z Dr Juan Luis Garcia Hernandez z Uniwersyteckiego Szpitala w Salamance mająca na celu optymalizację badania metylacji DNA izolowanego z osocza pacjentów chorych na raka prostaty.

16. Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.
brak

III. INFORMACJA O WSPÓŁPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.
brak

2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym.

2.1 Koordynowanie doświadczeń realizowanych w ramach projektu poświęconego badaniu funkcji nowych inhibitorów białka cMyc. Mój udział polegał między innymi na ocenie hamowania interakcji białka cMyc z białkiem MAX pod wpływem działania nowego inhibitora, analizie i interpretacji wyników zaplanowaniu doświadczeń niezbędnych do otrzymania patentu. Doświadczenia były wykonywane we współpracy z IDP Pharma, Barcelona, Hiszpania i prezentowane w formie posterów na międzynarodowych konferencjach naukowych.

2.2 Badanie przesiewowe biblioteki związków wykazujących potencjalne wiązanie i aktywację receptora z rodziny Trk. Doświadczenia były wykonywane we współpracy z Celon Pharma, Kazuń, Polska i zostały opublikowane (Pankiewicz et al., 2021*).*

3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe.
Patent międzynarodowy: WO2019048679 - NEW TREATMENTS OF MULTIPLE MYELOMA

4. Informacja o wdrożonych technologiach.
brak

5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.
brak

6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych.
brak

7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.
nie dotyczy

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

1. Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Sumaryczny impact factor (IF): **77,38**
(według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania)

2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań): **271 (261)**
(według bazy Web of Science (WoS) na dzień 30-11-2021)

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha.

Indeks Hirscha: **11**
(według bazy Web of Science (WoS) na dzień 30-11-2021)

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **687**
(zgodnie z rokiem opublikowania)

Patryk Krzemiński
(podpis wnioskodawcy)