

AUTOREFERAT

Dr n. med. Agnieszka Malcher

Załącznik nr 3

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 2025

I. Dane wnioskodawcy

Agnieszka Malcher
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: agnieszka.malcher@igcz.poznan.pl
https://igcz.poznan.pl/pracownik/agnieszka-malcher-waclawska/
ORCID ID: 0000-0002-3433-6990

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Licencjat (2006), Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 3-letnie studia licencjackie; kierunek Biotechnologia

Tytuł pracy licencjackiej: „Choroby prionowe u ludzi i zwierząt”

Promotor: dr hab. Elżbieta Poręba, prof. UAM

Magister (2008), Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 2-letnie studia magisterskie; kierunek: Biotechnologia

Tytuł pracy magisterskiej: „Ocena zdolności wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do wykorzystywania dekstryn żółtych jako źródła węgla”

Promotor: prof. dr hab. Grażyna Lewandowicz

Podyplomowe Studia Menedżerskie (2009), Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu

Tytuł pracy podyplomowej: „Konflikt w organizacji - przyczyny, skutki i propozycje rozwiązania”

Promotor: Krzysztof Kotapski

Doktor nauk medycznych (2014), Instytut Genetyki Człowieka PAN, dyscyplina: biologia medyczna

Tytuł pracy doktorskiej: „Identyfikacja genów krytycznych dla procesu spermatogenezy; próba określenia molekularnych markerów azoospermii”

Promotor: prof. dr hab. Maciej Kurpisz,

Promotor pomocniczy: dr hab. Natalia Rozwadowska, prof. IGC PAN

Rozprawa wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN

III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2009-2013 **Doktorantka** w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, Środowiskowe Studium Doktoranckie przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

2013-2015 **Biolog** w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

2015 - obecnie **Adiunkt** w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

W latach **2014/2015** miałam 10 miesięczną przerwę w pracy z powodu urodzenia dziecka.

IV. 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 2021 r. Poz. 478 z późn. Zm.).

Osiągnięcie naukowe pt. „**Nowe geny i warianty genetyczne w zaburzeniach spermatogenezy – aspekty diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne**” zostało udokumentowane w formie cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach w otwartym dostępie (*Open Access*) w latach 2019-2025:

P1. Malcher A*, Stokowy T, Berman A, Olszewska M, Jedrzejczak P, Sielski D, Nowakowski A, Yatsenko A, Kurpisz M*. Whole genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia. *Andrology*. 2022;10(8):1605-1624.

DOI: <https://doi.org/10.1111/andr.13269>

Wskaźnik IF: 4.6

Punkty MNiSW: 140

*** autor współ-korespondujący**

P2. Malcher A*, Graczyk Z, Bauer H, Stokowy T, Berman A, Smolibowski M, Blaszczyk D, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *ESX1* gene as a potential candidate responsible for male infertility in nonobstructive azoospermia. *Scientific Reports* 2023;13(1):16563.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43854-9>

Wskaźnik IF: 3.8

Punkty MNiSW: 140

*** autor współ-korespondujący**

P3. Malcher A*, Smolibowski M, Stokowy T, Bauer H, Patyk A, Jedrzejczak A, Kostyk J, Graczyk Z, Ibrahim R, Bednarek-Rajewska K, Berger A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *TKTL1*: a new candidate gene in non-obstructive azoospermia. *Reproductive BioMedicine Online*. 2025 Mar 4;51(3):104895. Erratum in *Reprod Biomed Online*. 2025 Aug 8:105185.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2025.104895>

Wskaźnik IF: 3.5

Punkty MNiSW: 100

*** autor współ-korespondujący**

P4. Malcher A*, Kamieniczna M, Rozwadowska N, Stokowy T, Berger A, Jedrzejczak P, Wolski JK, Kurpisz M*. *HLA-DQB1* as a potential prognostic biomarker of hormonal therapy in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology* 2024;24(4):100949.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2024.100949>

Wskaźnik IF: 2.0

Punkty MNiSW: 100

*** autor współ-korespondujący**

P5. Malcher A, Jedrzejczak P, Stokowy T, Monem S, Nowicka-Bauer K, Zimna A, Czyzyk A, Maciejewska-Jeske M, Meczekalski B, Bednarek-Rajewska K, Wozniak A, Rozwadowska N, Kurpisz M. Novel Mutations Segregating with Complete Androgen Insensitivity Syndrome and their Molecular Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(21) pii: E5418.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20215418>

Wskaźnik IF: 4.556

Punkty MNiSW: 140

Łączna wartość współczynnika Impact Factor (IF) tych prac wynosi: 18.456 (wg Web of Science)

Łączna wartość punktów ministerialnych tych prac wynosi: 620 (wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW)

Wyżej wymienione oryginalne artykuły dotyczą poszukiwania genetycznych markerów molekularnych dla pacjentów z zaburzeniami procesu spermatogenezy, w szczególności dla pacjentów z idiopatyczną azoospermią nieobstrukcyjną (iNOA, ang. idiopathic non-obstructive azoospermia). We wszystkich pracach składających się na osiągnięcie habilitacyjne jestem pierwszym autorem, a w czterech z nich także autorem korespondującym.

Mój udział we wszystkich pracach był znaczący i obejmował: opracowanie koncepcji badań, planowanie i projektowanie eksperymentów, zbieranie i interpretację danych, analizę wyników, merytoryczne koordynowanie grupy badawczej i nadzór nad zadaniami, a także przygotowanie manuskryptów i uzyskanie finansowania na badania.

W Załączniku nr 5 zebrano kopie prac P1–P5, stanowiących osiągnięcie naukowe. Oświadczenia dotyczące mojego wkładu oraz wkładu głównych współautorów w powstanie poszczególnych prac zawarto w Załączniku nr 6.

Wprowadzenie

Niepłodność dotyka około 15% par w wieku rozrodczym, a czynnik męski odpowiada za połowę tych przypadków [1]. Problem ten obserwuje się coraz częściej na świecie w tym również w Polsce, dlatego obecnie niepłodność uznawana jest za chorobę cywilizacyjną XXI wieku [2]. Spośród różnych typów niepłodności męskiej związanych z nieprawidłowymi parametrami nasienia, jak: asthenozoospermia (nieprawidłowy ruch plemników), teratozoospermia (nieprawidłowa morfologia plemników), czy oligozoospermia (obniżona liczba plemników), najcięższą formą niepłodności męskiej jest azoospermia nieobstrukcyjna (NOA, ang. non-obstructive azoospermia) charakteryzująca się brakiem plemników w ejakulacie na skutek zaburzeń procesu spermatogenezy. Spermatogeneza jest procesem regulowanym przez wiele genów na poziomie przedmeiotycznym, meiotycznym i pomeiotycznym, jednak wciąż brakuje wiedzy na temat kluczowych genów, których zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu mogą prowadzić do niepłodności. Szacuje się, że interakcja ponad 2000 genów zaangażowanych w proces spermatogenezy jest niezbędna do powstania haploidalnych gamet [3], a dysfunkcja nawet jednego z nich może prowadzić do zatrzymania spermatogenezy na etapie:

- przedmeiotycznym, gdzie obserwuje się zespół samych komórek Sertoliego (SCOS, ang. Sertoli cell-only syndrome), czyli brak komórek gametogenicznych lub oprócz komórek Sertoliego obecne są spermatogonia, ale nie dochodzi do tworzenia się spermatocytów, spermatyd i dojrzałych plemników
- meiotycznym, gdzie obserwuje się tworzenie spermatocytów, ale nie dochodzi do tworzenia komórek gametogenicznych na dalszych etapach
- postmeiotycznym, gdzie obserwuje się tworzenie spermatyd, transformujących się w plemniki, które mogą być użyte do zapłodnienia pozaustrojowego.

Azoospermia nieobstrukcyjna dotyka 1% populacji mężczyzn i 10% niepłodnych mężczyzn, a jej przyczyny mogą wynikać z wielu aspektów, m. in. hormonalnych, immunologicznych, urazów jąder, ale przede wszystkim mają podłoże genetyczne [4]. Przyjmuje się, że im cięższy typ niepłodności tym większe prawdopodobieństwo jej genetycznej przyczyny. Przyczyny genetyczne wykazuje się u jednego na czterech do pięciu mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną.

Obecna diagnostyka NOA jest niewystarczająca, obejmuje jedynie ocenę nasienia, analizę hormonów i badania cytogenetyczne, które można rozszerzyć tylko o dwa badania genetyczne dostępne na rynku: analiza mikrodelecji w chromosomie Y (test AZF) i mutacji w genie *CFTR* (w celu wykluczenia azoospermii obstrukcyjnej) [5,6].

W związku z tym ponad 50% przypadków nadal pozostaje niewyjaśnionych i określa się ten stan jako idiopatyczną azoospermią nieobstrukcyjną (iNOA) [7]. Dlatego tak ważna jest identyfikacja nowych biomarkerów diagnostyczno-prognostycznych dla mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną w celu rozszerzenia obecnej diagnostyki.

Początkowo badania wysokoprzepustowe były ukierunkowane na identyfikację biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych na poziomie transkryptomu. W oparciu o różnice w profilach ekspresji genów w gonadach męskich pacjentów niepłodnych w porównaniu z mężczyznami o prawidłowej spermatogenezie, wyróżniono pulę genów istotnych dla płodności męskiej, a także transkryptów, które ulegają ekspresji na poszczególnych etapach spermatogenezy [8–18].

W ramach swojej pracy doktorskiej również poszukiwałam genów, które dotychczas nie były analizowane w kontekście męskiej niepłodności, a mogłyby być potencjalnymi biomarkerami dla pacjentów z NOA w oparciu o globalną analizę ekspresji genów. Wówczas zidentyfikowałam 6 nowych genów, których poziom ekspresji był istotnie obniżony w gonadach pacjentów z NOA w porównaniu z grupą kontrolną, obejmującą mężczyzn z prawidłową spermatogenezą na podstawie analizy danych z mikromacierzy ekspresyjnych [14]. Ponadto w ramach tych badań przeprowadziłam analizę mającą na celu identyfikację genów różnicujących grupę pacjentów z postmeiotycznym upośledzeniem spermatogenezy od mężczyzn, u których proces spermatogenezy był zatrzymany na etapie przedmeiotycznym [14]. Równocześnie prowadziłam też analizę globalnej ekspresji genów powiązanych ze stanem zapalnym, których poziom ekspresji korelował z genami istotnymi dla procesów spermatogenezy u pacjentów z azoospermią. Część zidentyfikowanych przeze mnie genów, m.in. *FAM71F1*, *SPACA4*, *ADCY10*, *SPATS1*, *GTSF1L* była dalej badana przez nasz Zespół i/lub inne ośrodki badawcze uznając je za geny istotne dla spermatogenezy, które mogą być wykorzystane jako potencjalny wskaźnik molekularny dla NOA [19–22].

Jednakże badania oparte na globalnej analizie ekspresji genów w gonadzie męskiej w kontekście identyfikacji potencjalnych biomarkerów mają pewne ograniczenia. Zróżnicowany poziom ekspresji genów może wynikać z obecności różnych typów i liczby komórek gametogenicznych w obrębie gonady męskiej, zależnie od stadium upośledzenia spermatogenezy, co utrudnia wskazanie bezpośredniej przyczyny azoospermii. Rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji otworzył nowe możliwości badania genetycznych uwarunkowań azoospermii nieobstrukcyjnej. W ostatnich latach, dzięki technologiom wysokoprzepustowym takim jak sekwencjonowanie całego egzomu udało się zidentyfikować potencjalne nowe warianty genetyczne o charakterze przyczynowym u pacjentów niepłodnych z upośledzoną spermatogenezą, w tym u mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną [23–29]. Należy tu przede wszystkim wyróżnić geny istotne dla procesu spermatogenezy, zwłaszcza na etapie meiotycznym, takie jak: *TEX11* (ang. *Testis Expressed 11*), *TEX14* (ang. *Testis Expressed 14*), *MEIOB* (ang. *Meiosis Specific with OB Domain*), *TDRD9* (ang. *Tudor Domain Containing 9*), *MEI1* (ang. *Meiotic Double-Stranded Break Formation*

Protein 1), *PIWIL1* (ang. *Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 1*), w których często identyfikowane są warianty genetyczne określone jako patogene u pacjentów z NOA. Osiągnięcia te otwierają nowe perspektywy diagnostyczne i prognostyczne dla tej grupy pacjentów.

Jednak, aby można zastosować nowe geny kandydujące i ich warianty genetyczne w diagnostyce niepłodności, należy również wykonać badania funkcjonalne w celu zbadania mechanizmów działania i wpływu na proces spermatogenezy. Trudnością jest brak dobrego modelu badawczego, w którym można by potwierdzić rolę nowo wytypowanych genów w procesie spermatogenezy. Trudno jest stworzyć model badawczy, który mógłby naśladować złożony proces jakim jest ludzka spermatogeneza. Przez ponad 2 dekady mysie modele były podstawą licznych badań dotyczących defektów genów u niepłodnych mężczyzn [30]. Niemniej jednak różnice między rozwojem komórek rozrodczych u człowieka i myszy mogą dawać różne efekty fenotypowe. Nie wszystkie ludzkie geny są obecne w genomie myszy, a różnice w strukturze genów mogą również przekładać się na ich funkcję [31]. Analiza funkcjonalna ludzkich genów również pozostaje problematyczna ze względu na ograniczoną dostępność próbek ludzkich i ograniczenia etyczne. Kwestie te są najbardziej zauważalne właśnie podczas badania azoospermii [32].

Zarówno w trakcie realizacji pracy doktorskiej, jak i w późniejszym etapie mojej działalności naukowej, kontynuowałam badania nad genetycznymi przyczynami męskiej niepłodności prowadzone w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Celem moich badań było pogłębienie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów azoospermii nieobstrukcyjnej oraz identyfikacja nowych genów o potencjale diagnostycznym i prognostycznym dla pacjentów z NOA. Po uzyskaniu stopnia doktora otrzymałam finansowanie z NCN i w ramach grantu SONATA rozszerzyłam badania o nowoczesne techniki sekwencjonowania całogenomowego (WGS), co umożliwiło identyfikację nowych wariantów genetycznych potencjalnie odpowiedzialnych za zaburzenia spermatogenezy. Dodatkowo, w celu funkcjonalnej weryfikacji nowo zidentyfikowanych genów, wprowadziłam analizy *in vitro* z wykorzystaniem modeli komórek gametogenicznych i systemu CRISPR, co pozwoliło na ocenę ich roli w procesach komórkowych związanych z rozwojem gamet.

Cel naukowy cyklu prac

Badania prowadzone w ramach cyklu prac miały na celu zidentyfikowanie nieopisanych dotąd wariantów genetycznych oraz biomarkerów prognostycznych związanych z zaburzeniami spermatogenezy – zarówno w znanych, jak i nowych genach. Cel ten został zrealizowany poprzez następujące cele szczegółowe:

- Analizę wyników sekwencjonowania całego genomu (WGS) u pacjentów z idiopatyczną azoospermia nieobstrukcyjną (iNOA), w tym również pacjentów, u których wcześniej nie wykryto wariantów przyczynowych za pomocą sekwencjonowania całego egzomu (WES).
- Badanie roli nowo zidentyfikowanych genów (*ESX1* i *TKTL1*) w modelach komórek gametogenicznych poprzez uzyskanie ich aktywacji za pomocą systemu CRISPR i/lub

nadekspresji oraz analizę transkryptomu komórek i pacjentów z NOA z/bez mutacji w badanych genach.

- Analizę sekwencji i poziomu ekspresji genu *HLA-DQB1* jako potencjalnego markera prognostycznego, przewidującego skuteczność terapii z zastosowaniem gonadotropin dla pacjentów z NOA.
- Identyfikacja wariantów przyczynowych i puli genów istotnych dla spermatogenezy w niezwykle rzadkich i unikatowych próbkach od osób z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny (CAIS), charakteryzującym się upośledzeniem procesu spermatogenezy.

Omówienie prac wchodzących w skład cyklu

- **P1. Malcher A***, Stokowy T, Berman A, Olszewska M, Jedrzejczak P, Sielski D, Nowakowski A, Yatsenko A, Kurpisz M*. Whole genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia. *Andrology*. 2022;10(8):1605-1624.

* autor współ-korespondujący

Wysokoprzepustowe techniki sekwencjonowania DNA otworzyły nowe możliwości identyfikacji wariantów przyczynowych w chorobach uwarunkowanych genetycznie. Początkowo większość badań koncentrowała się na regionach kodujących, wykorzystując sekwencjonowanie całego egzomu (WES). Jednak skuteczność diagnostyczna tej metody wynosi jedynie 25–50%. Dane literaturowe wskazują, że zastosowanie sekwencjonowania całego genomu (WGS) u pacjentów z wcześniejszym negatywnym wynikiem WES pozwala na ustalenie przyczyny w około 42% przypadków pominiętych przez WES [33]. Choć czułość i jakość WES znacząco się poprawiły w ostatnich latach, WGS nadal wykazuje przewagę pod względem pokrycia regionów kodujących. Co więcej, WGS obejmuje cały genom, co umożliwia wykrywanie nie tylko wariantów pojedynczych nukleotydów (SNV) i małych indeli, ale również zmian liczby kopii (CNV) oraz dużych wariantów strukturalnych, zapewniając pełne spektrum analizy – w tym także w regionach niekodujących.

Celem badań przedstawionych w publikacji było wypełnienie luki w wiedzy dotyczącej genetycznych przyczyn NOA poprzez identyfikację dotychczas nieopisanych w NOA wariantów genetycznych. Analiza obejmowała zarówno geny wcześniej powiązane z NOA, jak i nowe, dotąd niebadane w kontekście spermatogenezy i niepłodności męskiej. W tym celu zastosowaliśmy nowe podejście oparte na sekwencjonowaniu całego genomu, WGS. Badania przeprowadzono dla 39 pacjentów z iNOA, w tym dla 6 mężczyzn, u których wcześniejsze badania z wykorzystaniem WES nie pozwoliły ustalić przyczyny choroby.

WGS przeprowadzono z użyciem najnowszej generacji sekwencjonowania - Illumina HiSeq X. W ramach badań przeprowadzono zaawansowane analizy bioinformatyczne. Z milionów odczytów uzyskano listę rzadkich wariantów potencjalnie wpływających na strukturę białka. Warianty te zostały przefiltrowane z wykorzystaniem baz ExAC i gnomAD, a następnie poddane adnotacji w narzędziu Ensembl Variant Effect Predictor. Dalsze analizy *in silico* obejmowały ocenę znaczenia klinicznego (ClinVar, OMIM, dbSNP), konserwacji ewolucyjnej (phyloP), przewidywanego wpływu na funkcję białek (SIFT, MutationTaster, CADD) oraz powiązania z płodnością i spermatogenezą (NCBI, EMBL-EBI, Human Protein Atlas, PubMed).

Ponadto dla części wykrytych wariantów genetycznych przeprowadzono modelowanie białek strukturalnych.

Wyniki uzyskane w ramach powyższych analiz umożliwiły identyfikację nowych SNV związanych z azoospermią nieobstrukcyjną u 25 z 39 pacjentów, w tym, u 4 z 6 pacjentów poddanych wcześniej analizie WES, która nie ujawniła wariantów przyczynowych, analiza WGS zakończyła się sukcesem i umożliwiła wyłonienie genów kandydujących dla NOA. Ujawniliśmy nowe SNV w genach jak dotąd nieopisanych w aspekcie NOA, określone przez algorytmy predykcyjne jako nowe warianty patogenne (8 wariantów genetycznych w 4 nowych genach – *TKTL1*, *IGSF1*, *ZFPM2*, *VCX3A*). Zidentyfikowaliśmy również 30 wariantów w 20 genach związanych z niepłodnością, w tym nowe warianty w genach powiązanych z NOA, tj. *ESX1*, *TEX14*, *MEIOB*, *USP9Y*, *MEI1*, *PIWIL1*, *DNAH1*, *FANCM*. Ponadto ujawniliśmy 13 wariantów w 20 genach, które nie były nigdy badane w aspekcie płodności, a które mogą być potencjalnie zaangażowane w spermatogenezę. Pełna lista genów wraz z ich wariantami genetycznymi i szczegółowymi danymi została opisana w publikacji P1. Nasza uwaga skupiła się przede wszystkim na wariantach genetycznych w genach *ESX1* (*ang. ESX Homeobox 1*) i *TKTL1* (*ang. Transketolase Like 1*). Oba są zlokalizowane na chromosomie X i ulegają znaczącej ekspresji w gonadzie męskiej. W genie *ESX1* odkryliśmy dwa ultra-rzadkie warianty przyczynowe c.1040C>G/p.Pro347Arg i c.1042C>G/p.Leu348Val, które współwystępowały (jako podwójna mutacja) u dwóch pacjentów z NOA z zaburzeniem spermatogenezy na etapie postmeiotycznym. Z kolei w obrębie genu *TKTL1* zidentyfikowaliśmy dwa ultra-rzadkie warianty (c.268_268delG/p.Asp90Metfs*35 i c.1601A>G/p.Glu534Gly) u dwóch pacjentów z zatrzymaniem spermatogenezy na wczesnym etapie. Analiza strukturalna białek wykazała, że pierwszy wariant powoduje nie tylko zamianę aminokwasu hydrofilowego na hydrofobowy, ale także skraca białko poprzez powstanie przedwczesnego kodonu STOP. Drugi wariant prowadzi do zmiany aminokwasu w domenie C-końcowej, powodując destabilizację fałdowania domeny.

Wyniki przedstawione w publikacji P1 mają istotne znaczenie dla rozszerzenia diagnostyki pacjentów z NOA, która obecnie pozostaje niewystarczająca. Identyfikacja nowych wariantów genetycznych – zarówno w genach już wcześniej powiązanych z NOA, jak i w genach dotychczas nieopisywanych w tym schorzeniu – umożliwia opracowanie panelu diagnostycznego pozwalającego skuteczniej określać przyczyny NOA. Otwiera to również istotne możliwości aplikacyjne, dając podstawy do wykorzystania tej platformy zarówno w prywatnych, jak i publicznych klinikach zajmujących się leczeniem niepłodności. Nasze wyniki zostały potwierdzone przez inne grupy badawcze, które zidentyfikowały dodatkowe warianty genetyczne w genie *TKTL1* u pacjentów z NOA [34–36]. Podobnie było dla genu *ESX1*, w którym niezależna grupa badawcza wykryła dwa nowe warianty zidentyfikowane również w regionie bogatym w prolinę u pacjentów z NOA [37]. Wskazuje to, że oba geny są kluczowymi kandydatami do utworzenia diagnostycznego panelu genowego dla mężczyzn niepłodnych z NOA.

Mój wkład polegał na: zaprojektowaniu i koordynacji badań, analizie i selekcji wariantów przyczynowych zidentyfikowanych za pomocą WGS, analizie *in silico*, zbieraniu i interpretacji danych, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, koordynowaniu procesu

związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny oraz finansowaniu publikacji w ramach grantu własnego SONATA.

Badania były prowadzone w ramach grantu własnego SONATA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Pacjenci z idiopatyczną azoospermią nieobstrukcyjną zostali zakwalifikowani do badań przez zespół prof. dr hab. Piotra Jędrzejczaka z Pracowni Andrologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Część próbek została najpierw poddana sekwencjonowaniu całego egzomu w ramach współpracy z prof. Yatsenko z Uniwersytetu w Pittsburghu, a następnie sekwencjonowaniu całego genomu. Wybrane warianty i ich geny zostały poddane badaniom funkcjonalnym w celu poznania mechanizmów prowadzących do niepłodności (**P2** i **P3**).

Publikacja cieszy się dużym zainteresowaniem – została nagrodzona certyfikatem czasopisma Andrology (Wiley) za najczęściej pobierany artykuł w 2022 roku. Wyniki badań WGS pozwoliły również potwierdzić znaczenie nowych genów dla NOA, zidentyfikowanych przez zespół prof. Yatsenko i opisanych w trzech publikacjach, których jestem współautorem: J Assist Reprod Genet. 2025; Front Genet. 2023; Hum Genet. 2021 (badania opisane w pkt V. OPIS POZOSTAŁYCH KIERUNKÓW BADAWCZYCH).

- **P2. Malcher A***, Graczyk Z, Bauer H, Stokowy T, Berman A, Smolibowski M, Blaszczyk D, Jędrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *ESX1* gene as a potential candidate responsible for male infertility in nonobstructive azoospermia. Scientific Reports 2023;13(1):16563.

*** autor współ-korespondujący**

Zidentyfikowanie przez nas nowych genów kandydujących i ich wariantów genetycznych za pomocą analizy WGS (**publikacja P1**) wymaga przeprowadzenia badań funkcjonalnych, których celem jest poznanie mechanizmów ich działania oraz wpływ na proces spermatogenezy, tak aby możliwe było ich wykorzystanie w diagnostyce. Do tego celu zazwyczaj stosowany jest model myszy, jednak nie wszystkie ludzkie geny mają swoje odpowiedniki w genomie myszy, a różnice w strukturze genów mogą przekładać się na ich funkcję. Obecnie brak jest odpowiedniego modelu badawczego, w którym można by potwierdzić rolę nowo wytypowanych genów w procesie spermatogenezy. Dotyczy to m. in. genu *ESX1*, którego sekwencja różni się w 34% u człowieka i myszy, głównie w obrębie domeny C-końcowej, co może wskazywać, że funkcja tego regionu jest odmienna u naczelnych i gryzoni [38]. Warianty c.1040C>G/p.Pro347Arg oraz c.1042C>G/p.Leu348Val w genie *ESX1*, które zidentyfikowaliśmy we wcześniejszych badaniach (**publikacja P1**), powodują zmiany w sekwencji aminokwasów białka właśnie w domenie C-końcowej. Dlatego rola genu *ESX1* w ludzkiej spermatogenezie była dotychczas nieznana. Jednak ze względu na obecność domen typowych dla regulatorów transkrypcji, takich jak regiony bogate w prolinę oraz motywy umożliwiające wiązanie z chromatyną i innymi elementami transkrypcyjnymi, przypuszcza się, że może on pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego.

Celem badań było określenie wpływu zidentyfikowanych wariantów na strukturę białka *ESX1*, a przede wszystkim ustalenie roli genu *ESX1* w komórkach gametogenicznych poprzez jego aktywację z wykorzystaniem systemu CRISPR. W tym celu przeprowadziliśmy analizę *in silico* struktury białka *ESX1* dla wykrytych wariantów genetycznych. Analiza *in silico* wykazała, że

warianty c.1040C>G/p.Pro347Arg oraz c.1042C>G/p.Leu348Val zlokalizowane są w białku ESX1 w regionie powtórzeń bogatym w prolinę (PRR), co może wpływać na prawidłowe fałdowanie się białka. Zaobserwowano, że PRR wiążą się z głównym rowkiem DNA, dlatego przewiduje się, że zidentyfikowane warianty wpływają na właściwą strukturę helikalną dla PRR, potencjalnie wpływając na interakcje ze specyficznymi sekwencjami DNA.

Aby zbadać funkcję genu *ESX1*, zaktywowaliśmy ten gen metodą CRISPR, wykorzystując wektor px335_G2P z wklonowanym gRNA specyficznym dla *ESX1* i drugim wektorem ze zdezaktywowanym białkiem Cas9 i aktywatorem VPR (dCas9_VPR_doxy). Wektory wprowadzono za pomocą transfekcji przejściowej do ludzkich komórek gametogenicznych – linii komórkowej TCam-2, pochodzącej z seminoma, czyli nowotworu złośliwego jądra, która nie wykazuje endogennej ekspresji genu *ESX1*. Aktywacja została potwierdzona zarówno na poziomie mRNA za pomocą PCR w czasie rzeczywistym oraz na poziomie białka za pomocą immunoblotowania typu Western i immunofluorescencji. Następnie komórki zostały poddane analizie sekwencjonowania RNA (RNA-seq). Stanowiło to pierwszy krok w celu zbadania potencjalnej funkcji genu *ESX1*, wskazując pulę genów regulowanych przez *ESX1*. Aktywacja genu *ESX1* w komórkach TCam-2 przebiegła pomyślnie, poziom ekspresji *ESX1* był istotnie podwyższony zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w genetycznie zmodyfikowanych komórkach TCam-2 w porównaniu do komórek kontrolnych typu dzikiego, jak i do kontroli negatywnej z niespecyficznym gRNA dla ludzkiego genomu. Za pomocą RNA-seq wyznaczono sieć ponad 50 genów istotnie różniących się poziomem ekspresji pomiędzy badanymi grupami i potencjalnie regulowanymi przez gen *ESX1*. Spośród nich wybrano 6 kluczowych genów, tj. jest *NANOG* (ang. *Nanog homeobox*), *PDE1C* (ang. *Phosphodiesterase 1C*), *CXCR4* (ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*), *LINC00662* (ang. *Long intergenic non-protein coding RNA 662*), *RPS6KA5* (ang. *Ribosomal Protein S6 Kinase A5*) i *CCND1* (ang. *Cyclin D1*), które mogą być regulowane przez gen *ESX1*. Wyniki uzyskane z sekwencjonowania RNA zostały również zweryfikowane na materiale z gonady męskiej od pacjentów z azoospermią z/bez mutacji w genie *ESX1*, a także odniesione do kontroli z prawidłową spermatogenezą. Porównując te wyniki z wynikami uzyskanymi dla komórek TCam-2 z aktywacją genu *ESX1*, zaobserwowano odwrotną korelację w poziomach ekspresji tych 6 genów u pacjenta z mutacją w genie *ESX1*.

Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono, że gen *ESX1* może brać udział w promowaniu różnicowania komórek w spermatocyty i/lub regulowaniu równowagi pomiędzy proliferacją a różnicowaniem komórek, poprzez bezpośrednią interakcję z genem *NANOG*, który bierze udział w procesie proliferacji, oraz *ELF3*, biorącym udział w różnicowaniu komórek.

Badania opisane w publikacji P2 pozwoliły częściowo określić funkcję genu *ESX1* oraz podkreśliły jego istotną rolę w procesie spermatogenezy. Wyniki te wskazują, że gen *ESX1* może być jednym z kluczowych kandydatów do opracowania molekularnej platformy diagnostycznej dla mężczyzn z NOA. Ponadto zastosowanie technologii CRISPR stwarza nowe perspektywy terapeutyczne dla pacjentów z NOA poprzez potencjalną możliwość naprawy niefunkcyjnych genów.

Mój wkład polegał na: zaprojektowaniu i koordynacji badań, zaprojektowaniu eksperymentów dotyczących aktywacji za pomocą systemu CRISPR, przeprowadzeniu selekcji

genów z analizy RNA-seq, zbieraniu i interpretacji danych, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin i tabel, koordynowaniu procesu związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny oraz zdobyciu środków na finansowanie badań w ramach grantu własnego SONATA.

Badania zostały wykonane we współpracy z *Department of Developmental Genetics* w *Max Planck Institute for Molecular Genetics* w Berlinie, gdzie w ramach odbytego stażu naukowego miałam możliwość zdobycia odpowiedniej wiedzy i umiejętności dotyczącej metody CRISPR.

Publikacja P2 otrzymała nagrodę za najlepszą pracę naukową z zakresu biologii rozrodu opublikowaną w roku 2023 przyznaną przez Towarzystwo Biologii Rozrodu. W ramach badań powstała praca magisterska pt. „*Optymalizacja oraz weryfikacja aktywacji genu ESX1 za pomocą technologii CRISPR w ludzkich komórkach pochodzących z gonady męskiej*” (2021), a wyniki prezentowane były na konferencjach międzynarodowych jak i krajowych, a także w ramach kampanii promującej istotność prowadzenia badań w oparciu o nowoczesne technologie i identyfikacji genów w celu poprawy diagnostyki skierowanej dla pacjentów.

- **P3. Malcher A***, Smolibowski M, Stokowy T, Bauer H, Patyk A, Jedrzejczak A, Kostyk J, Graczyk Z, Ibrahim R, Bednarek-Rajewska K, Berger A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *TKTL1: a new candidate gene in non-obstructive azoospermia*. *Reprod Biomed Online*. 2025 Mar 4;51(3):104895. Erratum in *Reprod Biomed Online*. 2025 Aug 8:105185.

*** autor współ-korespondujący**

W ramach badań z wykorzystaniem sekwencjonowania całego genomu (WGS) zidentyfikowaliśmy dwa nowe ultra-rzadkie warianty powodujące NOA: c.268_268delG/p.Asp90Metfs*35 i c.1601A>G/p.Glu534Gly w genie *TKTL1* u 2 z 39 pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną z zatrzymaniem spermatogenezy na początkowym etapie (**publikacja P1**). U obu pacjentów stwierdzono brak ekspresji genu *TKTL1* na poziomie mRNA i białka w tkance jąder (**publikacja P1**). Pierwszy wariant - c.268_268delG spowodował nie tylko zmianę ujemnie naładowanej reszty kwasu asparaginowego do hydrofobowego aminokwasu metioniny, ale skrócił także większość białka. Z kolei drugi wariant - c.1601A>G doprowadził do zmiany aminokwasu p.Glu534Gly w domenę C-końcowej, co prowadzi do destabilizacji fałdowania w tej domenie (**publikacja P1**).

Rola genu *TKTL1* w spermatogenezie nie była dotychczas poznana, wiadomo było jednak, że kodowane przez ten gen białko jest enzymem szlaku pentozofosforanowego. Gen *TKTL1*, podobnie jak wcześniej analizowany gen *ESX1* (**publikacja P2**), został wybrany do przeprowadzenia badań funkcjonalnych. Również w przypadku genu *TKTL1*, nie było możliwe zbadanie jego funkcji z wykorzystaniem modelu mysiego. Choć białko ludzkie TKTL1 i mysie Tktl1 wykazują znaczne podobieństwo sekwencji, występują między nimi istotne różnice w określonych regionach, szczególnie w domenach funkcjonalnych, które mogą być krytyczne dla funkcji białka TKTL1 [39]. Wykazano nawet, że myszy typu ‘knockout’ genu *Tktl1* nie prezentowały defektów reprodukcyjnych ani zaburzeń zapłodnienia [40]. Tymczasem nasze wyniki (**publikacja P1**), jak również niezależne badania innych grup badawczych, wykazały, że pacjenci z mutacją *TKTL1* charakteryzowali się fenotypem NOA [34–36].

Celem badań było określenie roli genu *TKTL1* w modelu komórek gametogenicznych. Posłużyliśmy się linią komórkową TCam-2, która nie wykazuje endogennej ekspresji genu *TKTL1*. Dlatego przeprowadziliśmy aktywację genu *TKTL1* z wykorzystaniem systemu CRISPR

oraz nadekspresję z użyciem wektora lentiwirusowego. Aktywacja genu *TKTL1* w oparciu o system CRISPR w komórkach TCam-2 nie była aż tak wydajna, zwłaszcza na poziomie białka. Dlatego w przypadku genu *TKTL1* wykorzystano nowy model komórkowy – komercyjnie dostępną zawiesinę pierwotnych komórek pochodzących z gonady męskiej (hTPc, ang. human testicular primary cells), które również nie wykazywały endogennej ekspresji genu *TKTL1*. W komórkach tych wywołano nadekspresję genu *TKTL1* poprzez transfekcję stabilną z wykorzystaniem wektora lentiwirusowego zawierającego sekwencję cDNA dla *TKTL1*. Nadekspresja była potwierdzona zarówno na poziomie mRNA za pomocą PCR w czasie rzeczywistym, jak i na poziomie białka techniką immunoblotowania typu Western. Następnie zmodyfikowane genetycznie komórki poddane były RNA-seq celem określenia puli genów potencjalnie regulowanych przez *TKTL1*.

Uzyskano znaczącą nadekspresję genu *TKTL1* w oparciu o system lentiwirusowy w komórkach hTP potwierzona zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W oparciu o analizę bioinformatyczną danych uzyskanych z analizy RNA-seq komórek poddanych modyfikacji genetycznej ustaliliśmy sieć genów, które potencjalnie są regulowane przez *TKTL1*. Wyselekcjonowane geny poddano weryfikacji za pomocą PCR w czasie rzeczywistym w komórkach hTPc oraz w próbkach RNA pozyskanych z tkanki gonady męskiej od pacjentów NOA z/bez mutacji w genie *TKTL1* oraz od mężczyzn z prawidłową spermatogenezą. Podczas prowadzonych badań wykazano wpływ genu *TKTL1* na geny: *CSF3* (ang. *Colony Stimulating Factor 3*), *HERC5* (ang. *HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5*), *HES1* (ang. *Hes Family bHLH Transcription Factor 1*), *HSPA1B* (ang. *Heat Shock Protein Family A Member 1B*), które odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego – głównie w proliferacji i apoptozie komórek.

Wyniki opisane w ramach publikacji P3 sugerują, że gen *TKTL1* może pełnić kluczową rolę w utrzymaniu komórek gametogenicznych regulując proliferację tych komórek na wczesnym etapie różnicowania.

Mój wkład polegał na: zaprojektowaniu i koordynowaniu badań, zaprojektowaniu eksperymentów dotyczących aktywacji za pomocą systemu CRISPR oraz nadekspresji genu *TKTL1*, przeprowadzeniu selekcji genów z analizy sekwencjonowania RNA, zbieraniu i interpretacji danych, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, koordynowaniu procesu związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny oraz uzyskaniu finansowania na badania w ramach grantu własnego SONATA.

W wyniku badań nad genem *TKTL1* powstały trzy prace dyplomowe pod moim promotorstwem (dwie magisterskie: pt. „*Optymalizacja oraz weryfikacja aktywacji genu TKTL1 za pomocą technologii CRISPR w ludzkich komórkach pochodzących z gonady męskiej*”; „*Identyfikacja i walidacja puli genów przeanalizowanych za pomocą sekwencjonowania RNA w komórkach gametogenicznych z aktywowanym genem TKTL1*” i jedna licencjacka pt. „*Charakterystyka molekularna ludzkich komórek pochodzących z gonady męskiej*”). Ich rezultaty były prezentowane zarówno na konferencjach międzynarodowych, jak i krajowych.

- **P4. Malcher A***, Kamieniczna M, Rozwadowska N, Stokowy T, Berger A, Jedrzejczak P, Wolski JK, Kurpisz M*. *HLA-DQB1* as a potential prognostic biomarker of hormonal therapy in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology* 2024;24(4):100949.
* **autor współ-korespondujący**

Identyfikacja nowych genów i ich wariantów genetycznych jest istotna nie tylko z punktu widzenia poznania przyczyn niepłodności, ale również dla opracowania nowych form terapii oraz prognozowania ich skuteczności. Obecnie pacjenci z NOA są kierowani na oligobiopsję jąder w celu ekstrakcji plemników (jeśli są obecne). W przypadkach, gdy w kanalikach nasiennych znajdują się pojedyncze plemniki, możliwe jest ich wykorzystanie do zapłodnienia pozaustrojowego (*in vitro*), co stanowi szansę na potomstwo dla pacjentów z NOA. Niestety, u większości z nich proces spermatogenezy jest zahamowany już na wczesnych etapach, co uniemożliwia uzyskanie nawet pojedynczych plemników, a tym samym wykonanie procedury zapłodnienia *in vitro*.

W ostatnich latach wykazano, że terapia hormonalna (hCG/FSH) może poprawić spermatogenezę i stymulować produkcję plemników. Jednak tylko niewielki odsetek pacjentów pozytywnie reaguje na takie leczenie. Obecnie terapia gonadotropinami jest stosowana „na ślepo”, a jej skuteczność szacuje się na około 30%, co oznacza, że większość pacjentów jest narażona na kosztowną, długotrwałą (do 9 miesięcy) i obciążającą organizm terapię bez gwarancji poprawy [41].

Celem badań była identyfikacja biomarkerów prognostycznych pozwalających na określenie szans powodzenia stymulacji spermatogenezy przy zastosowaniu leczenia hormonalnego u pacjentów z NOA.

Za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych przeprowadzono analizę porównawczą profilu ekspresji genów w próbkach z oligobiopsji gonady męskiej pobranych od trzech pacjentów z NOA, którzy pozytywnie zareagowali na złożoną terapię hormonalną (hCG/rFSH), oraz trzech pacjentów niewykazujących odpowiedzi na leczenie. Analiza globalnej ekspresji genów wykazała, że poziom ekspresji genu *HLA-DQB1* był podwyższony u pacjentów nieodpowiadających na terapię w porównaniu z pacjentami, którzy odpowiedzieli pozytywnie. Badania rozszerzono o większą grupę pacjentów, w ramach których przeprowadzono sekwencjonowanie Sangera w celu określenia wariantów genetycznych genu *HLA-DQB1* u pacjentów z NOA poddanych terapii hormonalnej. Genotypowanie wariantów genu *HLA-DQB1* u wszystkich sześciu pacjentów ujawniło, że heterozygotyczność względem tego genu występowała wyłącznie u mężczyzn reagujących na leczenie. Warianty genu *HLA-DQB1* zbadano na większej grupie pacjentów z NOA (n=18), potwierdzając, że określenie wariantów genetycznych tego genu może mieć znaczenie prognostyczne w kontekście skuteczności terapii hormonalnej.

Ponadto porównano profil ekspresji genów w tkance gonady męskiej od jednego pacjenta przed i po leczeniu gonadotropinami, identyfikując ponad 600 genów o zmienionej ekspresji, w tym geny kluczowe dla spermiogenezy. Wyniki te wskazują, że proces spermatogenezy został skutecznie zainicjowany i ukończony. W ten sposób udokumentowano, że zastosowanie gonadotropin może efektywnie stymulować spermatogenezę u pacjentów z NOA.

W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy zidentyfikowano potencjalny biomarker prognostyczny skuteczności terapii hormonalnej (hCG/FSH) u mężczyzn z NOA.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że złożona terapia hormonalna hCG/rFSH może prowadzić do stymulacji spermatogenezy i pojawienia się plemników w ejakulacie, a także zwiększać skuteczność pobrania plemników z gonady, co w połączeniu z zapłodnieniem *in vitro* stwarza realną szansę na ojcostwo dla pacjentów z azoospermią.

Określenie poziomu ekspresji i wariantów genu *HLA-DQB1* może w przyszłości umożliwić ograniczenie kosztownej i obciążającej terapii hormonalnej jedynie do pacjentów, którzy mają realne szanse na pozytywną odpowiedź na leczenie.

Mój wkład polegał na: zaprojektowaniu i nadzorze eksperymentów, przygotowaniu materiału i przeprowadzeniu analizy wyników z sekwencjonowania Sangera, przeprowadzeniu analizy porównawczej profili ekspresji genów próbek przed i po leczeniu, selekcji genów, zbieraniu i interpretacji danych, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, koordynowaniu procesu związanego z procedurą wydawniczą jako autor korespondencyjny.

Praca P4 stanowi kontynuację badań rozpoczętych w ramach mojej pracy doktorskiej, które zostały następnie rozszerzone w kierunku identyfikacji biomarkera prognostycznego. Po zakończeniu doktoratu rozwinęłam projekt, obejmując badaniami większą grupę pacjentów z NOA oraz dokonując pełnej analizy i interpretacji danych, co umożliwiło potwierdzenie oraz pogłębienie wcześniejszych wyników pilotażowych.

- **P5. Malcher A**, Jedrzejczak P, Stokowy T, Monem S, Nowicka-Bauer K, Zimna A, Czyżyk A, Maciejewska-Jeske M, Meczekalski B, Bednarek-Rajewska K, Wozniak A, Rozwadowska N, Kurpisz M. Novel Mutations Segregating with Complete Androgen Insensitivity Syndrome and their Molecular Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 30;20(21) pii: E5418.

Zastosowanie technologii wysokoprzepustowych umożliwiło identyfikację licznych genów odgrywających kluczową rolę w procesie spermatogenezy oraz płodności. Pomimo tego, funkcje wielu genów pozostają wciąż nieokreślone. Pozyskanie niezwykle rzadkich i unikatowych próbek pochodzących od osób z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny (CAIS, *ang. Complete Androgen Insensitivity Syndrome*) umożliwiło pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw spermatogenezy oraz spojrzenie na ten proces z nowej, dotychczas niespotykanej perspektywy badawczej. Zespół niewrażliwości na androgeny (OMIM:300068) jest to rzadkie, wrodzone zaburzenie rozwoju płci, charakteryzujące się upośledzeniem procesu spermatogenezy. Objawia się szerokim spektrum cech żeńskich u osób z prawidłowym kariotypem męskim 46,XY — od łagodnej postaci zespołu niewrażliwości na androgeny (MAIS), przez częściową (PAIS), aż po całkowitą niewrażliwość na androgeny, skutkującą żeńskim fenotypem i obecnością zewnętrznych narządów płciowych typowych dla kobiet (CAIS) [38]. Częstość występowania CAIS szacuje się na około 1 przypadek na 62 000 osób genetycznie męskich (46,XY).

Celem badań była identyfikacja nowych genów potencjalnie zaangażowanych w proces spermatogenezy, które dotychczas nie były analizowane w kontekście męskiej niepłodności.

Początkowo przeprowadzono RNA-seq w celu wykrycia wariantów genetycznych u osób z CAIS (n=3) z oligobiopsji gonad. Analiza RNA-seq umożliwiła identyfikację wariantów genetycznych w genach związanych z zaburzeniami rozwoju płci. Następnie, w celu potwierdzenia uzyskanych wyników, przeprowadzono sekwencjonowanie metodą Sanger na poziomie DNA. Przeprowadziliśmy również weryfikację na poziomie mRNA z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) oraz na poziomie białka, stosując immunoblotowanie typu Western i techniki immunohistochemiczne. Dane z RNA-seq wykorzystano docelowo do analizy globalnej ekspresji genów, porównując materiał z oligobiopsji gonad osób z CAIS (n=3) z próbkami pochodzącymi od mężczyzn z prawidłową spermatogenezą (n=3).

W ramach prowadzonych badań przedstawiliśmy trzy dotychczas nieujawnione przyczyny choroby CAIS. W przypadku osoby nr 1 zidentyfikowano nową mutację w pierwszym egzonie w domenie transaktywacyjnej (w domenie N-końcowej), w pozycji c.840delT, w genie kodującym receptor androgenowy (AR). Delecja tyminy spowodowała przesunięcie ramki odczytu i w ten sposób wprowadziła przedwczesny kodon stop, powodując znaczne skrócenie sekwencji białka i prawdopodobnie jego degradację, ponieważ można wyraźnie zaobserwować brak produktu białkowego receptora androgenowego u tej osoby. W przypadku osoby nr 2 zaobserwowano niesynonimiczną mutację w pozycji c.2491C>T genu kodującego receptor androgenowy w domenie wiążącej ligand. Substytucja cysteiny na treoninę spowodowała zmianę kodonu leucyny (CTT) na kodon fenyloalaniny (TTT) w pozycji 196 białka AR. Mutacja ta spowodowała nieprawidłową lokalizację receptora androgenowego, który zamiast ulegać ekspresji wewnątrz kanalików nasiennych, widoczny był wokół nich, co zostało zaobserwowane przy pomocy immunohistochemii. Z kolei u osoby nr 3 nie wykryto mutacji w genie AR, jednak zidentyfikowano nową heterozygotyczną mutację polegającą na substytucji glicyny na treoninę, w pozycji c.73G>T, w genie kodującym cytochrom P450 z rodziny 11 i podrodziny A polipeptyd 1 (*CYP11A1*), który odgrywa rolę w biosyntezie hormonów steroidowych. Mutacja powoduje przesunięcie ramki i wprowadzenie przedwczesnego kodonu stop. Większość zgłoszonych do tej pory przypadków całkowitej niewrażliwości na androgeny dotyczy mutacji w genie AR. Tylko 5% przypadków nie ma mutacji w tym genie, a zmienność fenotypowa w AIS może być częściowo wyjaśniona przez warianty w genach odpowiedzialnych za biosyntezę i metabolizm steroidów [42]. W literaturze znaleźliśmy podobne heterozygotyczne mutacje w *CYP11A1* [43–45], które w konsekwencji mogą prowadzić do rzadkiego zaburzenia genetycznego powodującego pierwotną niewydolność nadnerczy z zaburzeniami rozwoju płciowego 46,XY. W przypadku osoby nr 3 zidentyfikowana mutacja prowadziła do obniżenia poziomu testosteronu, a tym samym do zmniejszenia wiązania z receptorem androgenowym i dezaktywacją szlaku sygnałowego AR.

W przedstawionej pracy po raz pierwszy zaprezentowano profile ekspresji genów wyraźnie odróżniające osoby z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny (CAIS) od mężczyzn z prawidłową spermatogenezą. Pomimo zróżnicowanego podłoża genetycznego osób z CAIS, profile ekspresji genów wykazywały podobny wzorec na poziomie całego transkryptomu. Najistotniejszym jednak aspektem badań była analiza mająca na celu identyfikację nowych genów istotnych dla procesu spermatogenezy. Zidentyfikowano geny, które dotychczas nie były badane w kontekście zespołu niewrażliwości na androgeny ani spermatogenezy, lecz

których funkcja i ekspresja mogą mieć znaczenie dla zdolności reprodukcyjnych — przykładem są geny: *FOXJ1* (ang. *Forkhead Box J1*), *CCNB2* (ang. *Cyclin B2*), *TM4SF18* (ang. *Transmembrane 4 L Six Family Member 18*). Ponadto wyróżniono geny potencjalnie regulowane przez receptor androgenowy, wśród których znalazły się szczegółowo przez nas zbadane geny *ESX1* i *TKTL1*. Te geny wraz z innymi genami bezpośrednio zaangażowanymi w spermatogenezę, takimi jak *SOHLH1* (ang. *Spermatogenesis and Oogenesis Basic Helix-Loop-Helix 1*), *TEX11* (ang. *Testis Expressed 11*) czy *TDRD9* (ang. *Tudor Domain Containing 9*), które wykazywały obniżoną ekspresję u osób z mutacją w genie *AR*, mogą wskazywać na bezpośrednią regulację przez receptor androgenowy. Wątek ten stanowi interesujące podejście do potwierdzenia roli bezpośredniej regulacji transkrypcyjnej tych genów przez *AR*.

Badania przeprowadzone w ramach publikacji P5 umożliwiły ujawnienie nowych wariantów genetycznych prowadzących do zespołu całkowitej niewrażliwości na androgeny, co w konsekwencji wywołało u badanych osób zaburzenie rozwoju płci i upośledzenie procesu spermatogenezy. Z kolei w aspekcie cyklu prac wchodzących w osiągnięcie habilitacyjne, zostały zidentyfikowane nowe geny regulowane przez receptor androgenowy, a także genów potencjalnie istotnych dla procesu spermatogenezy. Nasze odkrycia będą pomocne nie tylko w diagnostyce molekularnej osób z CAIS, ale zidentyfikowane geny mogą być również potencjalnymi biomarkerami procesu różnicowania komórek gametogenicznych w zaburzeniach procesu spermatogenezy.

Mój wkład polegał na: ustaleniu koncepcji pracy, analizie wyników sekwencjonowania Sangera za pomocą programu CLC Main Workbench, przygotowaniu materiału do RNA-seq, analizie wyników RNA-seq, przygotowaniu próbek do immunoblotowania typu Western, przeprowadzeniu barwień immunohistochemicznych wraz z dokumentacją zdjęć, weryfikacji wyników za pomocą PCR w czasie rzeczywistym, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin i tabel, uczestniczeniu w procesie związanym z procedurą wydawniczą oraz częściowym finansowaniu badań w ramach grantu własnego SONATA.

W ramach prowadzonych badań pełniłam rolę opiekuna naukowego pracy magisterskiej pt. „*Sequence analysis of androgen receptor gene (AR) in patients with androgen insensitivity syndrome (AIS)*”. Wyniki tych badań zostały przedstawione na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych badań

1. Za pomocą analizy WGS ujawniliśmy 8 nowych SNV w 4 genach jak dotąd nieopisanych w aspekcie NOA (*TKTL1*, *IGSF1*, *ZFPM2*, *VCX3A*), określone jako nowe warianty patogenne. Zidentyfikowaliśmy również 30 wariantów w 20 genach związanych z niepłodnością, w tym nowe warianty w genach powiązanych z NOA, tj. *ESX1*, *TEX14*, *MEIOB*, *USP9Y*, *MEI1*, *PIWIL1*, *DNAH1*, *FANCM*. Ponadto, ujawniliśmy 13 wariantów w 20 genach, które nie były nigdy badane w aspekcie płodności, a które mogą być potencjalnie zaangażowane w spermatogenezę. Nasza uwaga skupiła się przede wszystkim na wariantach genetycznych w genach *TKTL1* i *ESX1*. Zidentyfikowane warianty i ich geny są potencjalnymi biomarkerami diagnostycznymi dla pacjentów z azoospermia nieobstrukcyjną.

2. U czterech z sześciu pacjentów, u których wcześniejsza analiza WES nie ujawniła wariantów przyczynowych, analiza WGS wykazała przyczynę NOA.

3. Utworzono model komórkowy *in vitro* z aktywowanym genem *ESX1* w linii komórkowej pochodzącej z nasieniaka gonady męskiej – TCam2 w oparciu o edytowanie genomu za pomocą metody CRISPR, dzięki czemu określono pulę genów potencjalnie regulowanych przez gen *ESX1*. Gen *ESX1* najprawdopodobniej bierze udział w promowaniu różnicowania komórek w spermatocyty i/lub w regulowaniu równowagi pomiędzy proliferacją a różnicowaniem komórek.

4. Uzyskano nadekspresję genu *TKTL1* w pierwotnych komórkach pochodzących z gonady męskiej (hTPC) w oparciu o system lentiwirusowy i określono pulę genów potencjalnie regulowanych przez gen *TKTL1*. Gen *TKTL1* może pełnić kluczową rolę w utrzymaniu komórek gametogenicznych regulując proliferację tych komórek na wczesnym etapie różnicowania.

5. Zidentyfikowano gen *HLA-DQB1* jako potencjalny biomarker prognostyczny dla pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjnych poddanych terapii hormonalnej gonadotropinami.

6. Zidentyfikowano nowe warianty przyczynowe w genie *AR* i *CYP11A1* w niezwykle rzadkich i unikatowych próbkach od osób z zespołem całkowitej niewrażliwości na androgeny. Przede wszystkim w ramach prowadzonych badań zostały zidentyfikowane nowe geny regulowane przez receptor androgenowy, wśród których znalazły się geny *ESX1* i *TKTL1* wraz z innymi genami bezpośrednio zaangażowanymi w spermatogenezę, takimi jak *SOHLH1*, *TEX11* i *TDRD9*, a także geny potencjalnie istotne dla procesu spermatogenezy *FOXJ1*, *CCNB2*, *TM4SF18*.

Badania wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego koncentrują się na identyfikacji nowych genów i nowych wariantów genetycznych związanych z zaburzeniami spermatogenezy oraz na określeniu ich znaczenia funkcjonalnego i klinicznego. W badaniach zastosowano zintegrowane podejście obejmujące analizy genomowe, bioinformatyczne i eksperymentalne, które pozwoliły na odkrycie zmian o potencjalnym wpływie na proces spermatogenezy i płodność mężczyzn. Osiągnięcie ma potencjał aplikacyjny – jego celem było nie tylko poznanie mechanizmów molekularnych, lecz także wskazanie biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych oraz potencjalnych celów terapeutycznych, co stanowi krok w kierunku praktycznego wykorzystania wyników badań podstawowych w medycynie rozrodu.

Literatura

- [1] Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotelling JM, Giwercman A, Hwang K, Cheng YS. Male infertility. *Nat Rev Dis Prim* 2023; 9:49.
- [2] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6 th edition. Geneva. vol. Edition, V. 2021.
- [3] Joshi M, Singh R. Molecular Regulation of Sperm Production Cascade. *Genetics of Male Infertility*. Springer International Publishing; 2020:19–37.
- [4] Sharma M LS. Azoospermia. *StatPearls* 2023.
- [5] Caroppo E, Colpi GM. Update on the Management of Non-Obstructive Azoospermia: Current Evidence and Unmet Needs. *J Clin Med* 2021; 11:62.
- [6] Tang Q, Su Q, Wei L, Wang K, Jiang T. Identifying potential biomarkers for non-obstructive azoospermia using WGCNA and machine learning algorithms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023; 14:1108616.

- [7] Tahmasebi-Birgani M. Commentary on Non-obstructive Azoospermia (NOA); From Past to the Present. *Jentashapir J Cell Mol Biol* 2021; 12:115298.
- [8] King HC. Gene Expression Profile Analysis by DNA Microarrays 2001; 286:2280-8.
- [9] Fox MS, Ares VX, Turek PJ, Haqq C, Reijo Pera R a. Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Mol Reprod Dev* 2003; 66:403–21.
- [10] Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, Menezo Y, Benkhalifa M. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:3–10.
- [11] Rockett JC, Patrizio P, Schmid JE, Hecht NB, Dix DJ. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res* 2004; 549:225–40.
- [12] Lin Y-H, Lin Y-M, Teng Y-N, Hsieh T-YT, Lin Y-S, Kuo P-L. Identification of ten novel genes involved in human spermatogenesis by microarray analysis of testicular tissue. *Fertil Steril* 2006; 86:1650–8.
- [13] Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess a-N. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2007; 13:33–43.
- [14] Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Kolanowski T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertil Steril* 2013; 100:1686–1694.e7.
- [15] Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M. The Gene Expression Analysis of Paracrine/Autocrine Factors in Patients with Spermatogenetic Failure Compared with Normal Spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70:522-8.
- [16] Wacławska A, Kurpisz M. Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2012; 58:229–35.
- [17] Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF, Krawetz S a. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007; 16:763–73.
- [18] Garrido N, Martínez-Conejero J a, Jauregui J, Horcajadas J a, Simón C, Remohí J, Meseguer M. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 2009; 91:1307–10.
- [19] Morohoshi A, Miyata H, Oyama Y, Oura S, Noda T, Ikawa M. FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice. *Dev* 2021; 148:dev199644.
- [20] Alagundagi DB, Ghate SD, Shetty P, Gollapalli P, Shetty P, Patil P. Integrated molecular-network analysis reveals infertility-associated key genes and transcription factors in the non-obstructive azoospermia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2023; 288:183–190.
- [21] Yao W, Fu J, Zhang D, Chen S, Zhou Y, Jiang X, Zheng X, Zhang M, Wu F. Establishment and clinical significance of genetic factor screening method for patients with nonobstructive azoospermia based on whole exon sequencing technology. *Transl Androl Urol* 2025; 14:1005–1014.
- [22] Liu S, Bian Y chao, Wang W lun, Liu TJ, Zhang T, Chang Y, Xiao R, Zhang C ling. Identification of hub genes associated with spermatogenesis by bioinformatics analysis. *Sci Rep* 2023; 13:18435.
- [23] Krausz C, Riera-Escamilla A, Moreno-Mendoza D, Holleman K, Cioppi F, Algaba F, Pybus M, Friedrich C, Wyrwoll MJ, Casamonti E, Pietroforte S, Nagirnaja L, et al. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med* 2020; 22:1956–1966.
- [24] Yatsenko AN, Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A, Yatsenko SA, Kliesch S, Schlatt S TF, Albrecht R, J. BA, Thomas J, Marta O, Birgit W, Joseph S, Kurpisz M, Aleksandar R, Svetlana AY, Sabine K, et al. X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men 2015; 372:2097-107.
- [25] Wyrwoll MJ, Temel ŞG, Nagirnaja L, Oud MS, Lopes AM, van der Heijden GW, Heald JS, Rotte N, Wistuba J, Wöste M, Ledig S, Krenz H, et al. Bi-allelic Mutations in M1AP Are a Frequent Cause

- of Meiotic Arrest and Severely Impaired Spermatogenesis Leading to Male Infertility. *Am J Hum Genet* 2020; 107:342–351.
- [26] Arafat M, Har-Vardi I, Harlev A, Levitas E, Zeadna A, Abofoul-Azab M, Dyomin V, Sheffield VC, Lunenfeld E, Huleihel M, Parvari R. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J Med Genet* 2017; 54:633–639.
- [27] Hardy JJ, Wyrwoll MJ, Mcfadden W, Malcher A, Rotte N. Variants in GCNA, X- linked germ - cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure. *Hum Genet* 2021:1–14.
- [28] Qureshi S, Hardy JJ, Pombar C, Berman AJ, Malcher A, Gingrich T, Hvasta R, Kuong J, Munyoki S, Hwang K, Orwig KE, Ahmed J, et al. Genomic study of TEX15 variants: prevalence and allelic heterogeneity in men with spermatogenic failure. *Front Genet* 2023; 14:1134849.
- [29] Clavijo RI, Arora H, Gibbs E, Cohen S, Griswold A, Bakircioglu E, Bademci G, Tekin M, Ramasamy R. Whole Exome Sequencing of a Consanguineous Turkish Family Identifies a Mutation in GTF2H3 in Brothers With Spermatogenic Failure. *Urology* 2018; 120:86–89.
- [30] Tamowski S, Aston KI, Carrell DT. The use of transgenic mouse models in the study of male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2010; 56:260–273.
- [31] Krafft PR, Rolland WB, Duris K, Lekic T, Campbell A, Tang J, Zhang JH. Modeling intracerebral hemorrhage in mice: Injection of autologous blood or bacterial collagenase. *J Vis Exp* 2012; 22:e4289.
- [32] Page ST, Amory JK, Bremner WJ. Advances in male contraception. *Endocr Rev* 2008; 29:465–493.
- [33] Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, Leach R, Klein R, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014; 511:344–347.
- [34] Nagirnaja L, Lopes AM, Charng WL, Miller B, Stakaitis R, Golubickaite I, Stendahl A, Luan T, Friedrich C, Mahyari E, Fadial E, Kasak L, et al. Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure. *Nat Commun* 2022; 13:1–18.
- [35] Riera-Escamilla A, Vockel M, Nagirnaja L, Xavier MJ, Carbonell A, Moreno-Mendoza D, Pybus M, Farnetani G, Rosta V, Cioppi F, Friedrich C, Oud MS, et al. Large-scale analyses of the X chromosome in 2,354 infertile men discover recurrently affected genes associated with spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 2022; 109:1458–1471.
- [36] Khan MR, Akbari A, Nicholas TJ, Castillo-Madeen H, Ajmal M, Haq TU, Laan M, Quinlan AR, Ahuja JS, Shah AA, Conrad DF. Genome sequencing of Pakistani families with male infertility identifies deleterious genotypes in SPAG6, CCDC9, TKTL1, TUBA3C, and M1AP. *Andrology* 2023; 13:1093–1104.
- [37] Ma Q, Du Y, Luo X, Ye J, Gui Y. Association of ESX1 gene variants with non-obstructive azoospermia in Chinese males. *Sci Rep* 2021; 11:4587.
- [38] Wang X, Zhang J. Rapid, evolution of primate ESX1, an X-linked placenta- and testis-expressed homeobox gene. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2053–2060.
- [39] Pinson A, Xing L, Namba T, Kalebic N, Peters J, Oegema CE, Traikov S, Reppe K, Riesenberger S, Maricic T, Derihaci R, Wimberger P, et al. Human TKTL1 implies greater neurogenesis in frontal neocortex of modern humans than Neanderthals. *Science (80-)* 2022; 377:eabl6422.
- [40] Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, et al. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:7704–7710.
- [41] Laursen RJ, Alsbjerg B, Olesen Elbaek H, Povlsen BB, Brock K, Jensen S, Lykkegaard J, Esteves SC, Humaidan P. Recombinant gonadotropin therapy to improve spermatogenesis in nonobstructive azoospermic patients-A proof of concept study. *Int Braz J Urol* 2022; 48:471–481.
- [42] Jääskeläinen J. Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 352:4–12.
- [43] Parajes S, Chan AOK, But WM, Rose IT, Taylor AE, Dhir V, Arlt W, Krone N. Delayed diagnosis of

- adrenal insufficiency in a patient with severe penoscrotal hypospadias due to two novel P450 side-chain cleavage enzyme (CYP11A1) mutations (p.R360W; p.R405X). *Eur J Endocrinol* 2012; 167:881–885.
- [44] Tajima T, Fujieda K, Kouda N, Nakae J, Miller WL. Heterozygous Mutation in the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme (P450scc) Gene in a Patient with 46,XY Sex Reversal and Adrenal Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3820–3825.
- [45] Jung EJ, Im DH, Park YH, Byun JM, Kim YN, Jeong DH, Sung MS, Kim KT, An HJ, Jung SJ, Lee KB. Female with 46 , XY karyotype. *Obs Gynecol Sci* 2017; 60:378–382.
- [46] Olszewska M, Malcher A, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Jackowiak H, Suszyska-Zajczyk J, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M. Effects of Tcte1 knockout on energy chain transportation and spermatogenesis: implications for male infertility. *Hum Reprod Open* 2024; 2024:hoae020.

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

- **OPIS POZOSTAŁYCH KIERUNKÓW BADAWCZYCH, W KTÓRE BYŁAM LUB JESTEM ZAANGAŻOWANA, POZA OSIĄGNIĘCIEM WYNIKAJĄCYM Z ART. 219 UST. 1. PKT. 2B USTAWY**

Identyfikacja genów związanych z zaburzeniami procesu spermatogenezy poza cyklem prac wchodzących w osiągnięcie habilitacyjne

Geny GCNA, TEX15 i DMC1

W ramach współpracy z Profesorem Alexandrem Yatsenko z Uniwersytetu z Pittsburgha (USA), który również prowadzi badania nad identyfikacją genów związanych z azoospermia nieobstrukcyjną, udało się **ujawnić nowe geny – GCNA, TEX15 i DMC1 oraz ich warianty genetyczne odpowiedzialne za zaburzenie procesu spermatogenezy**. Było to możliwe dzięki połączeniu wyników uzyskanych z WES przeprowadzonego przez Zespół Profesora Alexandra Yatsenko dla pacjentów z NOA zarówno z Europy jak i USA w połączeniu z wynikami WGS i/lub sekwencjonowania Sangera dla polskiej populacji mężczyzn z NOA, w ramach kierowanego przeze mnie projektu SONATA. Zidentyfikowane warianty genetyczne zostały uznane za warianty przyczynowe NOA, a **wyniki zostały opublikowane** we współpracy ze znanymi naukowcami w dziedzinie niepłodności męskiej w znaczących czasopismach naukowym ***Human Genetics, Frontiers in Genetics i Journal of Assisted Reproduction and Genetics***.

Hardy JJ, Wyrwoll MJ, Mcfadden W, **Malcher A**, Rotte N, Pollock NC, Munyoki S, Veroli MV, Houston BJ, Xavier MJ, Kasak L, Punab M, Laan M, Kliesch S, Schlegel P, Jaffe T, Hwang K, Vukina J, Brieño-Enríquez MA, Orwig K, Yanowitz J, Buszczak M, Veltman JA, Oud M, Nagirnaja L, Olszewska M, O'Bryan MK, Conrad DF, Kurpisz M, Tüttelmann F, Yatsenko AN; GEMINI Consortium. Variants in GCNA, X-linked germ-cell genome integrity gene, identified in men with primary spermatogenic failure. *Hum Genet.* 2021 Aug;140(8):1169-1182.

Qureshi S, Hardy JJ, Pombar Ch, Berman AJ, **Malcher A**, Gingrich T, Hvasta R, Kuong J, Munyoki S, Hwang K, Orwig KE, Ahmed J, Olszewska M, Kurpisz M, Conrad DF, Jaseem Khan M, Yatsenko AN. Genomic study of TEX15 variants: prevalence and allelic heterogeneity in men with spermatogenic failure. *Front Genet.* 2023 May 10;14:1134849.

Ullah N, Pombar C, Hvasta-Gloria R, Berman AJ, Malizio M, Khan MJ, Nazli R, Fatima S, Riera-Escamilla A, Castillo-Madeen H, **Malcher A**, Olszewska M, Xavier MJ, Lillepea K, Dutta A, Castro CA, Valkna A, Inno R, Orwig KE, Conrad DF, Kurpisz M, Veltman JA, Laan M, Yatsenko AN. Identification of missense DMC1 variants in males with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2025 Aug 15. doi: 10.1007/s10815-025-03591-6.

Geny DDX53 i RBMXL3

Byłam również współautorem i współwykonawcą projektu OPUS NCN 2017/25/B/NZ5/01231 pt. „*Modelowanie spermatogenezy człowieka dla potrzeb badania, diagnozy i terapii męskiej niepłodności*” pod kierownictwem dr hab. Natalii Rozwadowskiej, profesor IGC PAN. W ramach tego projektu badaliśmy funkcję dwóch genów *DDX53* i *RBMXL3*, których warianty genetyczne zostały wcześniej zidentyfikowane u niepłodnych mężczyzn przy pomocy WES prowadzonych przez prof. Yatsenko oraz WGS w ramach grantu własnego SONATA. Moją rolą w ramach tego projektu było koordynowanie zadań związanych: z selekcją genów za pomocą sekwencjonowania RNA i ich weryfikacją przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym, charakterystyką na poziomie białka metodą frakcjonowania i immunoblotowania typu Western, a także z modyfikacjami genetycznymi komórek. Dotychczasowe dane sugerują, że *RBMXL3* może uczestniczyć w regulacji dynamiki transkryptomu w komórkach gametogenicznych, jednak jego szersze znaczenie funkcjonalne wymaga dalszego zbadania. Wyniki dotyczące genu *RBMXL3* zostały opublikowane na ten moment na serwerze bioRxiv, z kolei drugi manuskrypt dotyczący genu *DDX53* jest w trakcie przygotowywania.

Barszcz A, Tutak K, Zyprych-Walczak J, Dassi E, Ilaslan E, Dabrowska M, **Malcher A**, Olszewska M, Cysewski D, Nadel A, Kolanowski T, Madeja Z, Hrab M, Yatsenko A, Kurpisz M, Warkocki Z, Rozwadowska N. Multi-omic screening identifies RBMXL3 as a primate-specific RNA-binding protein and candidate regulator of RNA metabolism in human spermatogenesis. *bioRxiv* 2025.09.23.677621; doi: 10.1101/2025.09.23.677621.

Geny TCTE1, FAM71F1, TEX13B i EFCAB6

W ramach prowadzonych badań dotyczących niepłodności męskiej byłam również zaangażowana w projekt NCN OPUS 2015/17/B/NZ2/01157: *Poszukiwanie nowych genów istotnych dla ludzkiej oligo- i azoospermii - model myszy 'knockout'* pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa, który realizowany był również we współpracy z prof. Yatsenko z Uniwersytetu w Pittsburgu. Zespół prof. Yatsenko zidentyfikował warianty genetyczne w genie *TCTE1*, *TEX13B* i *EFCAB6* u pacjentów z oligozoospermią i NOA za pomocą WES. Z kolei gen *FAM71F1* był zidentyfikowany przeze mnie w badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, gdzie wykazałam, że poziom ekspresji tego genu był znacząco obniżony u pacjentów z NOA w stosunku do mężczyzn z prawidłową spermatogenezą. Wszystkie 4 geny zostały poddane badaniom funkcjonalnym w modelu mysim typu 'knockout' w oparciu o metodę CRISPR. W ramach tych badań odpowiedzialna byłam za zaprojektowanie i koordynację eksperymentów związanych z: genotypowaniem przy pomocy PCR i sekwencjonowaniem typu Sangera, globalną analizą profilu ekspresji genów za pomocą RNA-seq, określeniem poziomu ekspresji przy pomocy PCR w czasie rzeczywistym, określeniem ilości produktu białkowego za pomocą immunoblotowania typu Western, określeniem lokalizacji badanych produktów białkowych poprzez immunofluorescencję. W ramach prowadzonych badań opublikowano wyniki dotyczące mysiego genu *Tcte1*, gdzie zaskakujące okazało się, że myszy 'knockout' tego genu powodował zaburzenie ruchliwości plemników, czyli asthenozoospermię, a nie zaburzenie w ilości plemników w ejakulacie czy też całkowity ich brak jak w przypadku pacjentów, u których zidentyfikowano warianty genetyczne w genie *TCTE1* [46]. Badania na temat pozostałych genów nadal trwają.

Olszewska M, **Malcher A**, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Jackowiak H, Suszyńska-Zajczyk J, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M. Effects of *Tcte1* knockout on energy chain

transportation and spermatogenesis: implications for male infertility. Hum Reprod Open. 2024 Apr 4;2024(2):hoae020. doi: 10.1093/hropen/hoae020.

Gen AR

Ponadto, byłam współwykonawcą zadania badawczego K 140/P01/2007/1.2.2.3 pt. „Związek niepłodności męskiej z jakością nasienia, fenotypem osobniczym oraz występowaniem wariantów receptora dla androgenów” realizowanego w ramach zamawianego projektu badawczego PBZ-MEiN-8/2/2006 „Epidemiologia zagrożeń prokreacyjnych w Polsce - wielośrodkowe, prospektywne badania kohortowe”. Moim zadaniem była analiza polimorfizmu powtórzeń CAG i GGN w genie kodującym receptor androgenowy (AR) w męskiej populacji polskiej, a także porównanie rozkładu tych powtórzeń pomiędzy mężczyznami zdrowymi i niepłodnymi. Rozkład CAG pod względem najczęściej występujących alleli GGN, tj. 23 i 24 wykazał, że populacja mężczyzn niepłodnych charakteryzowała się wyższą kopią CAG w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki wskazują również, że zakres powtórzeń CAG w genie AR w badanej populacji młodych Polaków były porównywalne z danymi pochodzącymi z Europy Zachodniej. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu zostały przedstawione na wielu konferencjach krajowych i zostały opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie **Medical Science Monitor**.

Kamieniczna M, Fraczek M, Malcher A, Rozwadowska N, Czernikiewicz A, Jedrzejczak P, Semczuk M, Kurpisz M. Semen Quality, Hormonal Levels, and Androgen Receptor Gene Polymorphisms in a Population of Young Male Volunteers from Two Different Regions of Poland. Med Sci Monit. 2015 Aug 24;21:2494-504. doi: 10.12659/MSM.893628

Proteom ludzkiego plemnika

W ramach projektu badawczo-rozwojowego NCBiR N R13 0066 06: „Niepłodność małżeńska-identyfikacja przyczyn na podłożu molekularnym, jako bazy do utworzenia algorytmów w celu jej efektywnego przeciwdziałania”, który w dużej części obejmował zakres zadań zrealizowanych podczas mojej pracy doktorskiej, byłam również zaangażowana w realizację zadania badawczego mającego na celu poszukiwanie biomarkerów diagnostycznych w plazmie nasiennej dla pacjentów niepłodnych. Zidentyfikowano 25 białek w plazmie nasiennej wykazujących wpływ na funkcjonowanie mitochondriów w plemniku, a co za tym idzie mogących mieć bezpośredni związek z asthenozoospermią. W ramach tego projektu brałam też udział w analizie porównawczej wyników z globalnej ekspresji genów na poziomie mRNA wykonanej za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych i wyników z globalnej analizy białek plemników od zdrowych i niepłodnych mężczyzn (z normozoospermią, kryptozoospermią, azoospermią nieobstrukcyjną i obstrukcyjną). Udało się wytypować kilka białek, które wykazywały odmienny poziom ekspresji genów kodujących te białka u mężczyzn niepłodnych, a które były obecne na powierzchni plemników w badaniu proteomu zdrowych osobników. Takim przykładem jest białko HSPA2, które nie występowało w plazmie nasiennej u pacjentów z azoospermią, jednak w przypadku kryptozoospermii wyniki były zróżnicowane. Stąd sugerujemy, że HSPA2 byłby doskonałym biomarkerem monitorującym stan spermatogenezy, zwłaszcza w przypadku pacjentów z kryptozoospermią.

W ramach prowadzonych badań powstały 3 prace z moim udziałem:

Nowicka-Bauer K, **Malcher A**, Włoczkowska O, Kamieniczna M, Olszewska M, Kurpisz MK. Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status. *Reprod Biol.* 2022 Mar;22(1):100597. doi: 10.1016/j.repbio.2021.100597.

Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M, Stanski L, Olszewska M, **Malcher A**, Skrzypczak W, Kurpisz MK. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J Physiol Pharmacol.* 2018 Jun;69(3); doi: 10.26402/jpp.2018.3.05.

Nowicka-Bauer K, Ozgo M, Lepczynski A, Kamieniczna M, **Malcher A**, Skrzypczak W, Kurpisz M. Human sperm proteins identified by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry and their relevance to a transcriptomic analysis. *Reprod Biol.* 2018, 18(2):151-160. doi: 10.1016/j.repbio.2018.02.003.

Komórki macierzyste

Badania prowadzone w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych IGC PAN, pod kierunkiem prof. dr hab. M. Kurpisa, od początku mojej pracy naukowej obejmowały zarówno zagadnienia związane z niepłodnością, jak i z komórkami macierzystymi, dzięki czemu miałam możliwość uczestniczenia również w realizacji kilku projektów dotyczących komórek macierzystych. Początkowo zaangażowana byłam w grant badawczy N403 065 31/3011 pt. „Transplantacja mioblastów szkieletowych w leczeniu kardiomiopatii o podłożu innym niż niedokrwienność”. Projekt dotyczył badań przedklinicznych na komórkach macierzystych przeprowadzonym na zwierzęcym modelu serca pozawałowego. Moim głównym zadaniem była hodowla mioblastów zawierających konstrukt genetyczny z sekwencją kodującą koneksynę 43 oraz analiza obecności produktu białkowego za pomocą metod immunoblotowania typu Western oraz barwienia immunofluorescencyjne. Wyniki z tych badań zostały opisane w trzech publikacjach, których jestem współautorem:

Rozwadowska N, Kolanowski T, **Waclawska A (nazwisko panięskie)**, Fraczek M, Kurpisz M. Transgenic line of C2C12 myoblasts with constitutive overexpression of connexin-43 (GJA 1). In: *New Frontiers in Heart Disease*. Asher Kimchi (ed.). MEDIMOND 2012, pp. 1-8. (rozdział w książce) MNiSW 5

Kolanowski TJ, Rozwadowska N, **Malcher A**, Szymczyk E, Kasprzak JD, Mietkiewski T, Kurpisz M. In vitro and in vivo characteristics of connexin 43-modified human skeletal myoblasts as candidates for prospective stem cell therapy for the failing heart. *Int J Cardiol.* 2014, 173: 55-64

Wiernicki B, Rozwadowska N, **Malcher A**, Kolanowski T, Zimna A, Rugowska A, Kurpisz M. Human myoblast transplantation in mice infarcted heart alters the expression profile of cardiac genes associated with left ventricle remodeling. *Int J Cardiol.* 2016 Jan 1;202:710-21.

Badania nad komórkami macierzystymi w aspekcie terapii regeneracyjnej mięśni były prowadzone również w ramach projektu badawczo-rozwojowego N R13 0065 06 pt. „Mioblasty i ich funkcja w medycynie regeneracyjnej; badania kliniczne i przedkliniczne” i zostały dodatkowo poszerzone o badania kliniczne. Projekt ten prowadzony był z udziałem pacjentów z ciężką niewydolnością serca, którzy nie zostali zakwalifikowani do programu transplantacji; oraz pacjentów z uszkodzonym mięśniem zwieracza odbytu. Do moich obowiązków należała hodowla mioblastów na dużą skalę dla pacjentów zakwalifikowanych do tego programu, a także przygotowanie komórek modyfikowanych genetycznie z nadeskpresją koneksyny 43. Zajmowałam się także analizami molekularnymi związanymi z określeniem: (1)

poziomu ekspresji genów miogennych za pomocą PCR w czasie rzeczywistym; (2) długości telomerów za pomocą Southern blot; (3) starzenia się komórek poprzez barwienie na obecność markerów starzenia (enzym β -galaktozydaza); (4) żywotności, miogenności i cyklu komórkowego mioblastów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. W ramach tego projektu opublikowano następujące publikacje:

Romaniszyn M, Rozwadowska N, Nowak M, **Malcher A**, Kolanowski T, Walega P, Richter P, Kurpisz M. Successful implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of faecal incontinence due to external sphincter rupture. A case report. *International Journal of Colorectal Disease* 2013 Jul;28(7):1037.

Janeczek A, Zimna A, Rozwadowska N, Fraczek M, Kucharzewska P, Rucinski M, Mietkiewski T, Kolanowski T, **Malcher A**, Kurpisz M. Genetically modified human myoblasts with eNOS may improve regenerative ability of myogenic stem cells to infarcted heart. *Pol Heart J* 2013; 71(10):1048-1058.

Romaniszyn M, Rozwadowska N, **Malcher A**, Kolanowski T, Walega P, Kurpisz M. Implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of fecal incontinence: results of an experimental pilot study. *Tech Coloproctol.* 2015 Nov;19(11):697

Rozwadowska N, **Malcher A**, Baumann E, Kolanowski TJ, Rucinski M, Mietkiewski T, Fiedorowicz K, Kurpisz M. In vitro culture of primary human myoblasts by using the dextran microcarriers Cytodex3. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):81-90.

Gwizdala A, Rozwadowska N, Kolanowski TJ, **Malcher A**, Cieplucha A, Perek B, Seniuk W, Straburzynska-Migaj E, Oko-Sarnowska Z, Cholewinski W, Michalak M, Grajek S, Kurpisz M. Safety, feasibility and effectiveness of first in-human administration of muscle-derived stem/progenitor cells modified with connexin-43 gene for treatment of advanced chronic heart failure.

Zimna A, Wiernicki B, Kolanowski T, Rozwadowska N, **Malcher A**, Labedz W, Trzeciak T, Chojnacka K, Bednarek-Rajewska K, Majewski P, Kurpisz M. Biological and Pro-Angiogenic Properties of Genetically Modified Human Primary Myoblasts Overexpressing Placental Growth Factor in In Vitro and In Vivo Studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2018 Apr;66(2):145-159.

Rugowska A, Wiernicki B, Maczewski M, Mackiewicz U, Chojnacka K, Bednarek-Rajewska K, Kluk A, Majewski P, Kolanowski T, **Malcher A**, Rozwadowska N, Kurpisz M. Human skeletal muscle-derived stem/progenitor cells modified with connexin-43 prevent arrhythmia in rat post-infarction hearts and influence gene expression in the myocardium. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Dec;70(6).

Co więcej umiejętność hodowli mioblastów oraz zaznajomienie się z techniką mikromacierzy umożliwiło mi wzięcie udziału w realizacji projektu badawczego NN 401 097 937 pt. „Pozycjonowanie chromosomów w różnicujących się komórkach macierzystych pochodzenia mięśniowego”, w ramach którego hodowałam komórki *in vitro* oraz przygotowywałam próbki do analizy mikromacierzy ekspresyjnych. Z tego tematu powstała publikacja dostępna w czasopiśmie PLoS One:

Rozwadowska N, Kolanowski T, Wiland E, Siatkowski M, Pawlak P, **Malcher A**, Mietkiewski T, Olszewska M, Kurpisz M. Characterisation of Nuclear Architectural Alterations during In Vitro Differentiation of Human Stem Cells of Myogenic Origin. *PLoS One.* 2013 Sep 3;8(9):e73231.

Kolejnym projektem, w którym byłam zaangażowana, był projekt badawczy NCBiR (STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014) w ramach programu STRATEGMED, pt. „Niskocząsteczkowe modulatory epigenetyczne jako aktywatory pluripotencji komórek dla

potrzeb medycyny regeneracyjnej – EPI CELL”, którego celem było tworzenie systemów reporterowych umożliwiających monitorowanie pluripotencji w komórkach indukowanych oraz różnicowania ich w komórki kardiomiogenne. Moim zadaniem była charakterystyka molekularna specyficznych markerów dla otrzymanych komórek przy pomocy PCR w czasie rzeczywistym i immunofluorescencji. W ramach tego tematu zostały opublikowane poniższe artykuły, których jestem współautorem:

Lewandowski J, Rozwadowska N, Kolanowski TJ, **Malcher A**, Zimna A, Rugowska A, Fiedorowicz K, Łabędź W, Kubaszewski Ł, Chojnacka K, Bednarek-Rajewska K, Majewski P, Kurpisz M. *The impact of in vitro cell culture duration on the maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of myogenic origin. Cell Transplant. 2018 Jul;27(7):1047-1067.*

Fiedorowicz K, Rozwadowska N, Zimna A, **Malcher A**, Tutak K, Szczербal I, Nowicka-Bauer K, Nowaczyk M, Kolanowski TJ, Łabędź W, Kubaszewski Ł, Kurpisz M. *Tissue-specific promoter-based reporter system for monitoring cell differentiation from iPSCs to cardiomyocytes. Scientific reports. 2020 Feb 5;10(1):1895.*

Charakterystyką mioblastów zajmowałam się również w ramach projektu badawczego NCBiR w ramach Programu Badań Stosowanych nr PBS3/A7/27/2015 pt. „Molekularne obrazowanie (z zastosowaniem nanotechnologii) dla monitorowania implantowanych komórek macierzystych i ich funkcji regeneracyjnych – STEMNanoT”. W ramach realizacji projektu zostało opracowane obrazowanie mioblastów transdukowanych różnymi lentiwirusowymi systemami reporterowymi i superparamagnetycznymi nanocząsteczkami tlenku żelaza.

Wierzbinski KR, Szymanski T, Rozwadowska N, Rybka JD, Zimna A, Zalewski T, Nowicka-Bauer K, **Malcher A**, Nowaczyk M, Krupinski M, Fiedorowicz M, Bogorodzki P, Grieb P, Giersig M, Kurpisz MK. *Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. Sci Rep. 2018 Feb 27;8(1):3682.*

Prace nad zastosowaniem komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej były również prowadzone w ramach terapii dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD), m.in. we współpracy z prof. dr hab. Aleksandrą Klimczak z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu oraz w ramach projektu pt. „Autologiczne komórki pochodzenia miogenego od pacjentów dystroficznych poddane korekcie genetycznej i zasocjowane z biodegradowalnymi nanokapsułami jako nowa formuła terapii choroby Duchenne'a” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisz. Moim głównym zadaniem była izolacja i hodowla mioblastów na dużą skalę, ich charakterystyka oraz przygotowanie komórek w celu ich implementacji do mięśni pacjentów chorujących na DMD, co zaowocowało dwoma pracami z moim współautorstwem:

Klimczak A, Zimna A, **Malcher A**, Kozłowska U, Futoma K, Czarnota J, Kemnitz P, Bryl A, Kurpisz M. *Co-Transplantation of Bone Marrow-MSCs and Myogenic Stem/Progenitor Cells from Adult Donors Improves Muscle Function of Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. Cells. 2020 Apr 30;9(5):1119.*

Budzińska M, **Malcher A**, Zimna A, Kurpisz M. *In Vitro Gene Therapy Using Human iPS-Derived Mesoangioblast-Like Cells (HIDEMs) Combined with Microdystrophin (μ Dys) Expression as the New Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Experimental Treatment. Int J Mol Sci. 2024 Nov 5;25(22):11869.*

W ramach badań dotyczących komórek macierzystych miałam przyjemność koordynować zadania w ramach projektu NCN 2014/13/B/NZ3/04646 pt. „Badania nad cytoprotekcją rolą antyoksydantów wobec ludzkiej komórki mięśniowej rezerwuaru tkankowego (mioblast)

w warunkach *in vitro* i *in situ*”, którego głównym celem było zmniejszenie oddziaływania stresu oksydacyjnego na mioblasty hodowane *in vitro* i spowolnienie postępowania procesu starzenia komórkowego. W wyniku prowadzonych badań wykazaliśmy, że mioblasty zmodyfikowane genem zewnątrzkomórkowej dysmutazy nadadtlenkowej 3 (*SOD3*) i jednocześnie chronione w medium przeciwutleniaczem PBN osłaniają komórki przed wpływem stresu oksydacyjnego na poziomie *in vitro*. Ponadto zastosowanie mioblastów zmodyfikowanych genem *SOD3* i chronionych przeciwutleniaczem PBN wykazały pozytywny efekt wobec regeneracji blizny pozawałowej i poprawiały parametry hemodynamiczne lewej komory u myszy. Projekt prowadzony był we współpracy z Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Krakowie (zespół pod kierunkiem prof. dr hab. Stefana Chłopickiego), który wniósł do projektu innowacyjne techniki badawcze pozwalające na kompleksowe podejście metodologiczne dotyczące analiz mysich serc pozawałowych po interwencjach komórkowych. W ramach tego projektu miałam przyjemność pełnić rolę promotora pomocniczego dysertacji dr Magdaleny Nowaczyk, w ramach której powstał cykl poniższych publikacji, a kolejna związana z badaniami *in vivo* jest w trakcie przygotowania.

Nowaczyk M, **Malcher A**, Zimna A, Łabędź W, Kubaszewski Ł, Fiedorowicz K, Wierzbński K, Rozwadowska N, Kurpisz M. *Transient and Stable Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase Is Positively Associated with the Myogenic Function of Human Skeletal Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells*. *Antioxidants* 2020 Sep 2;9(9):817.

Nowaczyk M, **Malcher A**, Zimna A, Łabędź W, Kubaszewski Ł, Barczak W, Rubiś B, Rozwadowska N and Kurpisz M. *Addition of Popular Exogenous Antioxidant Agent, PBN, to Culture Media may be an Important Step to Optimization of Myogenic Stem/Progenitor Cell Preparation Protocol*. *Antioxidants* 2021, 10(6), 959.

Nowaczyk M, **Malcher A**, Zimna A, Rozwadowska N, Kurpisz M. *Effect of miR-195 inhibition on human skeletal muscle-derived stem/progenitor cells*. *Kardiologia Polska*. 2022;80(7-8):813-824.

• OBECNIE

W naszym Zakładzie trwa obecnie kontynuacja wcześniej zainicjowanych przeze mnie badań z wykorzystaniem sekwencjonowania całego genomu w celu wykrywania wariantów przyczynowych u pacjentów niepełnych. Jestem współautorem i koordynatorem projektu grantowego NCN 2020/37/B/NZ5/00549 pt. „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa, którego głównym celem jest zidentyfikowanie nieznanych dotąd wariantów genetycznych w DNA pacjentów z asthenozospermią i azoospermią nieobstrukcyjną. W odróżnieniu od projektu SONATA, prowadzonego pod moim kierownictwem, w niniejszym grantie zastosowano analizę trio. Obejmuje ona próbki od mężczyzn niepełnych oraz ich rodziców i/lub rodzeństwa, co w znacznym stopniu ułatwia identyfikację wariantów genetycznych w porównaniu z analizą pojedynczych próbek. Takie podejście pozwala na bardziej precyzyjną i skuteczną interpretację nowych wariantów przyczynowych. Dotychczas udało się zidentyfikować wiele nowych i istotnych wariantów przyczynowych wykazujących znaczący wpływ kliniczny prowadzących do niepełności. Wyniki zostaną ostatecznie przedstawione w dysertacji doktorskiej mgr Rim Ibrahim, w której pełnię rolę promotora pomocniczego. Wyniki jej badań były przedstawione dotychczas jako doniesienia zjazdowe na konferencjach międzynarodowych i krajowych:

Ibrahim R, **Malcher A***, Stokowy T, Yatsenko AN and Kurpisz M*. *Uncovering the genetic causes of asthenozoospermia using whole genome sequencing in three consanguineous families.* KonDokPAN2024, Warszawa, Polska 11-13.10.2024.

Doktorantka zajęła II miejsce za najlepszą prezentację.

***autorzy korespondencyjni**

Ibrahim R, **Malcher A***, Stokowy T, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *“Uncovering the genetic causes of asthenozoospermia using whole genome sequencing in three consanguineous families”.* W ramach III Poznańskiej TBR-ówki, Poznan, Poland 24.02.2025

***autorzy korespondencyjni**

Ibrahim R, **Malcher A***, Olszewska M, Stokowy T, Pastuszak K, Srivastava A, Ullah N, Khan MJ, Pombar C, Hvasta-Gloria R, Berman AJ, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *“Uncovering the genetic causes of asthenozoospermia using whole genome sequencing in three consanguineous families”.* 23rd European Testis Workshop (ETW), Sint-Michielsgestel, Netherland 13-17.04.2025

***autorzy korespondencyjni**

Ibrahim R, **Malcher A***, Olszewska M, Stokowy T, Pastuszak K, Srivastava A, Berman A, Ullah N, Khan MJ, Pombar C, Hvasta-Gloria R, Berman A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *Genetic insights into asthenozoospermia: Novel variants identified in consanguineous families.* Polsko-Ukraińskie Sympozjum Naukowe, 22-24 maja 2025, Poznań, Polska

*** autorzy współ-senioralni**

Ibrahim R, **Malcher A***, Olszewska M, Stokowy T, Pastuszak K, Srivastava A, Berman A, Ullah N, Khan MJ, Pombar C, Hvasta-Gloria R, Berman A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *Exploring genetic variants in asthenozoospermia: New findings from consanguineous families.* XVIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 26-27.06.2025 Toruń, Polska.

Doktorantka otrzymała nagrodę - I miejsce za najlepszą prezentację w sekcji Biologii i Nauk Medycznych.

*** autorzy współ-senioralni**

Ibrahim R, **Malcher A***, Olszewska M, Stokowy T, Pastuszak K, Srivastava A, Berman A, Ullah N, Khan MJ, Pombar C, Hvasta-Gloria R, Berman A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *Whole genome analysis reveals novel genetic variants associated with asthenozoospermia in consanguineous families.* V Kongres Młodej Nauki, 17-19.07. 2025, Gdańsk, Polska

*** autorzy współ-senioralni**

Z kolei w ramach drugiego projektu grantowego finansowanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego NdS-II/SP/0288/2024/01 pt. „Poszukiwanie przyczyn męskiej niepłodności - wysokoprzepustowe badania genomowe populacji polskiej” (pod kierownictwem dr hab. Marty Olszewskiej, prof. IGC PAN), którego również jestem współautorem i głównym wykonawcą, poszukujemy nowych wariantów genomowych, ale tym razem w grupie pacjentów z obniżonymi parametrami nasienia, tj. głównie asthenozoospermia, teratozoospermia i oligozoospermia. W ramach tego projektu moim zadaniem jest koordynowanie zadań związanych z sekwencjonowaniem całego genomu, ale także promocją i rozpowszechnianiem wiedzy na temat projektu. Projekt jest w początkowej fazie realizacji i obecnie jesteśmy na etapie kolekcjonowania próbek i przygotowywania ich do sekwencjonowania całego genomu.

- **PLANY**

1. Kontynuacja poszukiwań genetycznych przyczyn NOA

W mojej dalszej karierze naukowej chciałabym kontynuować badania nad poszukiwaniem genetycznych przyczyn NOA. W najbliższym czasie skupię się na analizie danych WGS w celu identyfikacji wariantów strukturalnych u pacjentów z NOA, u których nie ujawniono przyczynowych wariantów SNV. To uzupełni wiedzę na temat mutacji genetycznych prowadzących do azoospermia nieobstrukcyjnej i razem z wcześniej zidentyfikowanymi przyczynowymi wariantami SNV posłużą do opracowania unikalnej bazy danych dla pacjentów z NOA, a co więcej będą stanowić biomarkery do stworzenia platformy diagnostycznej dla tych pacjentów.

2. Stworzenie nowego diagnostycznego panelu genowego dla pacjentów NOA

Opracowanie nowego diagnostycznego panelu genowego dla pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną znacząco poprawiłoby obecną diagnostykę NOA. Dotychczasowe kliniczne procedury diagnostyczne NOA obejmują jedynie ocenę nasienia, analizę hormonów i badania cytogenetyczne, które można rozszerzyć tylko o dwa badania genetyczne dostępne na rynku: mikrolekcji w chromosomie Y (test AZF) i mutacji w genie *CFTR* (w celu wykluczenia azoospermii obstrukcyjnej), co nie wystarcza do pełnej oceny genetycznych przyczyn niepłodności. Oczekujemy, że w przyszłości, utworzony panel genowy będzie mógł wejść do rutynowej diagnostyki pacjentów NOA i być dostępny analogicznie do testów AZF i *CFTR*, co znacząco rozszerzy obecnie niewystarczającą diagnostykę molekularną dla pacjentów z NOA. W przypadku, gdzie panel genowy NOA nie wskaże wariantu przyczynowego, zostanie zastosowane bardziej spersonalizowane podejście przy pomocy sekwencjonowania całego genomu w celu identyfikacji nowych, jeszcze nieznanach wariantów przyczynowych wywołujących NOA. Zidentyfikowane nowe warianty przyczynowe będą szerzej zbadane przy pomocy transkryptomiki przestrzennej, która jest obecnie jedną z najbardziej innowacyjnych metod umożliwiającą badanie jednocześnie profilu ekspresji genów charakterystykę morfologiczną tkanki. Otworzy to nowe możliwości badania wpływu nowych wariantów NOA w indywidualnych tkankach pacjentów i umożliwi zrozumienie mechanizmów pod wpływem odkrytych zmian genomicznych, wyjaśniające etiologię heterogennej choroby, jaką jest azoospermia nieobstrukcyjna.

Ze względu na ograniczoną diagnostykę pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną, istnieje silna potrzeba stworzenia takiego diagnostycznego panelu genowego w celu identyfikacji wariantów przyczynowych w próbkach pacjentów z NOA. Stworzony panel będzie pomocny dla andrologów, którzy na co dzień zmagają się z problemem diagnostyki pacjentów z NOA i będą mogli na podstawie panelu wskazać genetyczną przyczynę niepłodności, a co więcej może ułatwić podjęcie właściwej decyzji klinicznej w zakresie leczenia niepłodności.

Obecnie staram się o pozyskanie finansowania na realizację tego projektu.

3. Stworzenie nowego modelu *in vitro* gonady męskiej

Stworzenie nowego modelu *in vitro* gonady męskiej umożliwi nowe podejście do badania azoospermii nieobstrukcyjnej. Spermatogeneza jest dynamicznym i złożonym procesem

podziałów i różnicowania komórek, przez co trudno jest stworzyć model badawczy odzwierciedlający ludzką spermatogenezę. Od ponad trzech dekad myszy stanowią podstawę dla badań związanych z określeniem genetycznych przyczyn męskiej niepłodności. Jednakże, istnieją liczne ograniczenia modelu mysiego do badania ludzkiej spermatogenezy między innymi wynikające z istotnej różnicy w rozwoju pierwotnych komórek germinalnych. Dlatego też, chcielibyśmy stworzyć model *in vitro* do badania azoospermii w oparciu o ludzkie indukowane komórki pluripotenne od pacjentów z NOA z nowymi wariantami genowymi, a następnie podjąć próbę zróżnicowania ich w komórki gametogeniczne, co umożliwiłoby badanie wpływu wykrytych wariantów na proces różnicowania komórkowego. Oczekujemy, że w przyszłości stworzony model *in vitro* nie tylko będzie przydatny w badaniu funkcji genów i wpływu ich zidentyfikowanych wariantów przyczynowych na proces spermatogenezy, ale przede wszystkim będzie podstawą do stworzenia systemu naprawczego zidentyfikowanych wariantów przyczynowych w komórkach od pacjentów zmagających się z NOA, mając na celu leczenie azoospermii w przyszłości.

Obecnie staram się o pozyskanie finansowania na realizację tego projektu.

Wyżej wymienione podejścia umożliwią szersze spojrzenie na problem niepłodności męskiej. Z jednej strony umożliwi to stworzenie molekularnej platformy w celu polepszenia diagnostyki pacjentów z NOA, a z drugiej strony pozwoli na funkcjonalne badania nowo poznanych genetycznych wariantów przyczynowych. Z pewnością te strategie poprawiłyby diagnostykę NOA oraz pozwoliłyby zrozumieć molekularny mechanizm działania badanych wariantów genetycznych. Ponadto badania te mogą w przyszłości zaowocować rozwojem nowych terapii NOA.

• PODSUMOWANIE WSPÓŁPRACY NAUKOWEJ

1. University of Pittsburgh, USA, School of Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, USA (Prof. dr Alexander N. Yatsenko)

W ramach prowadzonych badań nad identyfikacją wariantów przyczynowych w oparciu o wysokoprzepustowe techniki, prof. Yatsenko zaoferował swoje eksperckie wsparcie w selekcji kluczowych genów. Zaowocowało to kilkoma znaczącymi publikacjami, w których prof. Yatsenko jest współautorem (w ramach przedstawionego cyklu prac **P1**, **P2** i **P3**). Moje wyniki z sekwencjonowania całego genomu, w ramach prowadzonego przeze mnie projektu SONATA, również przyczyniły się do opublikowania kilku istotnych artykułów w ramach prac opublikowanych przez Zespół prof. Yatsenko, których jestem współautorem, tj. Qureshi S, ..., **Malcher A**, et al. Front Genet. 2023; Hardy JJ, ..., **Malcher A**, et al. Hum Genet. 2021; Ullah N, ..., **Malcher A**, et al. J Assist Reprod Genet. 2025.

2. University of Pittsburgh, Dietrich School of Arts and Sciences, Department of Biological Sciences, USA (Dr Andrea J. Berman)

Dr Andrea J. Berman była zaangażowana w predykcję struktur białkowych wykrytych wariantów genetycznych (w genach *IGSF1*, *ZFPM2*, *VCX3A*, *TKTL1* i *ESX1*) w ramach prowadzonej przeze mnie analizy sekwencjonowania całego genomu u mężczyzn

z azoospermią nieobstrukcyjną i była ujęta jako współautor w ramach przedstawionego cyklu prac **P1** i **P2**. Obecnie nasza współpraca jest kontynuowana w ramach projektu NCN 2020/37/B/NZ5/00549 pt. „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu”, w ramach którego dr Berman przygotowuje przewidywania strukturalne zidentyfikowanych wariantów u pacjentów z asthenozoospermią.

3. University of Bergen, Norwegia (Dr hab. Tomasz Stokowy)

Współpraca z dr hab. Tomaszem Stokowym trwa od początku mojej pracy naukowej, a wyniki uzyskane w ramach niej były zarówno podstawą mojej pracy doktorskiej jak i osiągnięcia habilitacyjnego. Dr. hab. Stokowy początkowo zaangażowany był w analizę bioinformatyczną wyników RNA-seq z tkanki gonadalnej pacjentów NOA w ramach mojej pracy doktorskiej i kierowanego przeze mnie projektu PRELUDIUM. Przez ostatnie 10 lat stał się światowym ekspertem w dziedzinie genomiki i wywoływaniu rzadkich wariantów genetycznych, co było nieodzowną pomocą w analizie sekwencjonowania całego genomu i przyczyniło się do powstania 8 wartościowych publikacji (w tym P1-P5), 20 wystąpień i 4 projektów dotyczących genetycznych przyczyn niepłodności męskiej, w szczególności azoospermii nieobstrukcyjnej.

4. Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department of Developmental Genetics, Berlin, Niemcy (Dr Hermann Bauer)

Współpraca z dr Bauer rozpoczęła się w ramach mojego stażu podoktorskiej dotyczącego “The CRISPR/Cas9 system based spermatogenesis impairment in vitro modeling of human male gonad” w Department of Developmental Genetics w Max Planck Institute for Molecular Genetics w Berlinie. Dr Bauer był moim opiekunem i wspierał mnie w eksperymentach dotyczących projektowania gRNA, klonowania insertów do wektorów i przeprowadzania aktywacji i ‘knockout’ w oparciu o system CRISPR. Jest współautorem prac wchodzących w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego (praca **P2** i **P3**).

5. Ondokuz Mayiz University, Samsun, Turcja (Prof. dr hab. Sezgin Günes)

Współpraca z prof. Günes zaowocowała wspólnym projektem NCN 2020/37/B/NZ5/00549 pt. „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu”.

6. Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran (Prof. Nasrin Ghasemi, Askari R Ebrahimi, Sara Sadeghzadeh)

W ramach współpracy zostały skolekcjonowane próbki od członków spokrewnionych rodzin, w tym mężczyzn niepłodnych do projektu NCN 2020/37/B/NZ5/00549 pt. „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu”, którego jestem współautorem i koordynatorem zadań badawczych. Prace badawcze nadal trwają, ale już na tym etapie wyniki badań były zaprezentowane na międzynarodowej konferencji - 11th Yazd International Congress and Student Award in Reproductive Medicine with 6th Congress of Reproductive Genetics, przez

dwie doktorantki z Iranu (Askari R Ebrahimi i Sara Sadeghzadeh) i zostały nagrodzone w kategorii „Student Award in Reproductive Medicine”.

7. Klinika Pastelowa, Poznań (Prof. dr hab. Piotr Jędrzejczak i dr Anna Berger, wcześniej do IX 2022 w Pracowni Andrologii, Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu)

Od początku mojej pracy naukowej współpracuję z prof. dr hab. Jędrzejczakiem i dr Berger, a uzyskane w ramach tej współpracy wyniki zaowocowały kilkoma cennymi publikacjami zarówno w ramach mojej pracy doktorskiej (Malcher A, et al. Fertil Steril. 2013; Am J Reprod Immunol. 2013), jak i osiągnięcia habilitacyjnego (P1 - P5).

8. Klinika Leczenia Niepłodności „Novum”, Warszawa (dr Jan K. Wolski)

W ramach współpracy dr Wolski przeprowadzał klasyfikację pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną poddanych terapii hormonalnej, co zaowocowało wspólną publikacją wchodzącą w skład osiągnięcia habilitacyjnego – P4.

9. Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego, Poznań (dr hab. Maciej Brązert)

Z początkiem roku 2025 rozpoczęłam również nową współpracę z dr hab. Brązertem, który w ramach grantu finansowanego z MNiSW w programie Nauka dla Społeczeństwa NdS-II/SP/0288/2024/01: „Poszukiwanie przyczyn męskiej niepłodności - wysokoprzepustowe badania genomowe populacji polskiej”, klasyfikuje pacjentów z obniżonymi parametrami nasienia. Ponadto dzięki współpracy powstała również wspólna aplikacja grantowa do Agencji Badań Medycznych dotycząca terapii pacjentów z NOA.

10. Katedra Algorytmów i Modelowania Systemów, Politechnika Gdańska; Katedra Onkologii Translacyjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny; Centrum Biostatystyki i Bioinformatyki, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk (dr inż. Krzysztof Pastuszek)

W ramach współpracy z dr Pastuszkim realizujemy bioinformatyczną analizę genomów dotyczącą zadań badawczych projektu NCN 2020/37/B/NZ5/00549 pt. „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu” oraz w ramach grantu finansowanego z MNiSW, NdS-II/SP/0288/2024/01: „Poszukiwanie przyczyn męskiej niepłodności - wysokoprzepustowe badania genomowe populacji polskiej”.

• **REALIZACJA PROJEKTÓW GRANTOWYCH**

Udział w realizacji 15 projektów grantowych – szczegółowo opisanych w załączniku nr 4.

• **Finansowane z Narodowego Centrum Nauki:**

1. 2024/53/B/NZ5/02183 (2025-2029) – wykonawca zadań badawczych
2. 2020/37/B/NZ5/00549 (2021-2026) – współautor i główny wykonawca/ koordynator zadań badawczych

3. 2017/26/D/NZ5/00789 (2018-2023) – kierownik projektu
 4. 2017/25/B/NZ5/01231 (2018-2023) – współautor projektu/ koordynator wybranych zadań
 5. 2012/05/N/NZ/00893 (2013-2015) – kierownik projektu
 6. 2015/17/B/NZ2/01157 (2016-2019) – wykonawca
 7. 2014/13/B/NZ3/04646 (2015-2018) – koordynator zadań badawczych
- **Finansowane z Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:**
 1. NdSII/ SP/0288/2024/01 (2024-2027) – współautor projektu i koordynator wybranych zadań badawczych
 2. N N401 097937 (2009-2012) – wykonawca
 3. N40306531/3011 (2006-2009) – wykonawca zadań w ramach wolontariatu
 4. PBZ-MEiN-8/2/2006 (K140/P01/2007/1.2.2.3) (2006-2010) – wykonawca zadania badawczego
 - **Finansowane z Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (projekty badawczo-rozwojowe):**
 1. STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014 EPI CELL (2015-2019) – wykonawca
 2. STRATEGMED1/233209/12/NCBR/2015 GRP&ALS (2015-2019) - wykonawca
 3. NR13 0066 06 (2009-2013) – wykonawca w ramach doktoratu
 4. NR13 0065 06 (2009-2013) – wykonawca

• STAŻE NAUKOWE

1. University of Bergen, IT Division, Bergen, Norwegia; staż szkoleniowy „Staff mobility for teaching” w ramach stypendium Erasmus+ (6-10.03.2023)

Podczas stażu szkoleniowego na Uniwersytecie w Bergen przedstawiłam cykl wykładów (20 godzin) w 5 blokach pt.: „Whole genome sequencing (WGS) analysis in samples from infertile men”. W ramach pobytu przeprowadziliśmy również konsultacje dotyczące wyników z analizy sekwencjonowania RNA zarówno publikacji wchodzących w cykl osiągnięcia habilitacyjnego (P3 i P4) jak i dotyczących wyników z projektu dotyczącego myszy knockout, które stanowiły istotny wkład w opublikowane manuskrypty (poniżej tytuły).

Efektem stażu są następujące publikacje naukowe:

P3. Malcher A*, Smolibowski M, Stokowy T, Bauer H, Patyk A, Jedrzejczak A, Kostyk J, Graczyk Z, Ibrahim R, Bednarek-Rajewska K, Berger A, Yatsenko AN, Kurpisz M*. *TKTL1: a new candidate gene in non-obstructive azoospermia. Reproductive BioMedicine Online Reprod Biomed Online. 2025 Mar 4;51(3):104895. Erratum in Reprod Biomed Online. 2025 Aug 8:105185.*

P4. Malcher A*, Kamieniczna M, Rozwadowska N, Stokowy T, Berger A, Jedrzejczak P, Wolski JK, Kurpisz M*. *HLA-DQB1 as a potential prognostic biomarker of hormonal therapy in patients with non-obstructive azoospermia. Reproductive Biology 2024;24(4):100949.*

Olszewska M, **Malcher A**, Stokowy T, Pollock N, Berman AJ, Budkiewicz S, Kamieniczna M, Jackowiak H, Suszynska-Zajczyk J, Jedrzejczak P, Yatsenko AN, Kurpisz M. *Effects of Tcte1*

knockout on energy chain transportation and spermatogenesis: implications for male infertility. Hum Reprod Open. 2024 Apr 4;2024(2):hoae020.

2. Ondokuz Mayiz University Samsun, Turcja; staż szkoleniowy „Staff mobility for teaching” w ramach stypendium Erasmus+ (27.09-01.10.2021)

Podczas stażu szkoleniowego na Ondokuz Mayiz University Samsun przedstawiłam cykl wykładów (20 godzin) w 5 blokach pt.: „Karyotyping and Y-chromosome microdeletion tests”. W ramach pobytu przeprowadziliśmy również konsultacje dotyczące gromadzenia próbek od członków rodzin spokrewnionych zmagających się z niepłodnością, a także opracowaliśmy zadania dotyczące molekularnych eksperymentów w ramach wspólnego projektu.

Efektem stażu jest powstanie planu badawczego w ramach wspólnego projektu naukowy OPUS NCN 2020/37/B/NZ5/00549: „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa (2021-2026).

3. Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department of Developmental Genetics at the Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy (02.09-13.12.2019)

Podczas stażu naukowego w Max Planck Institute for Molecular Genetics zapoznałam się z metodą CRISPR/Cas; w szczególności byłam odpowiedzialna za projektowanie sekwencji gRNA dla podejść typu CRISPR aktywacja i CRISPR ‘knockout’, klonowałam sekwencje gRNA do wektorów i potwierdzałam obecność insertów. Przeprowadziłam transfekcję komórek, selekcję, pikowanie klonów, dokonywałam analizy ekspresji genów, genotypowałam komórki z usuniętym fragmentem genu. Skutecznie zaktywowałam geny *TKTL1* i *ESX1* w komórkach TCam-2 (CRISPR aktywacja) oraz efektywnie usunęłam gen *TEX13A* (CRISPR ‘knockout’).

Efektem stażu są dwie wspólne publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu osiągnięcia habilitacyjnego (P2 i P3). Na podstawie wiedzy i umiejętności zdobytych podczas stażu naukowego udało mi się stworzyć w Instytucie Genetyki Człowieka PAN nowy warsztat naukowy dotyczący aktywacji genów z wykorzystaniem systemu CRISPR.

4. Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Gliwice, Polska (24-28.10.2011)

Staż naukowy w Centrum Onkologii dotyczył przygotowania próbek i analizy całego transkryptomu za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych. Wiedza uzyskana podczas stażu zapoczątkowała badania nad poszukiwaniem biomarkerów diagnostycznych NOA w oparciu o badania globalnej ekspresji genów w ramach mojej pracy doktorskiej.

Efektem stażu są dwie wspólne publikacje naukowe w oparciu o wyniki uzyskane w ramach badań wykonanych w ramach mojej pracy doktorskiej:

- **Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Kolanowski T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M.** *Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. Fertil Steril. 2013 Dec;100(6):1686-94.e1-7.*

- **Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, Jedrzejczak P, Zietkowiak W, Kurpisz M.** The gene expression analysis of paracrine/autocrine factors in patients with spermatogenetic failure compared with normal spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Dec;70(6):522-8.

W Załączniku nr 8 przedstawiono certyfikaty potwierdzające odbycie staży naukowych.

- **WYKŁADY I DONIESIENIA ZJAZDOWE NA KONFERENCJACH KRAJOWYCH I ZAGRANICZNYCH**

Łącznie jestem autorką/współautorką 86 doniesień zjazdowych, z czego w 19 byłam autorką pierwszą i/lub senioralną. Wyniki swojej pracy naukowej prezentowałam na wielu konferencjach krajowych i zagranicznych. Miałam okazję uczestniczyć wielokrotnie w prestiżowych konferencjach międzynarodowych dotyczących tematyki rozrodu (Congress of the International Network for Young Researchers in Male Fertility, European Testis Workshop, European Congress of Andrology). Wyniki miałam również okazję prezentować na znaczących krajowych konferencjach, m.in. Polskiego Kongresu Genetyki, Zjeździe Towarzystwa Biologii Rozrodu oraz Konferencji Polskiego Towarzystwa Andrologicznego.

Szczegółowy opis wszystkich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku nr 4

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

Osiągnięcia organizacyjne

- **Kierownik projektów grantowych:**

1. SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789: „Nowe warianty genetyczne powodujące azoospermie: analiza całego genomu i funkcjonalne badania in vitro” (2018-2023)
2. PRELUDIUM NCN 2012/05/N/NZ5/00893: „Poszukiwanie nowych genów zaangażowanych w proces spermatogenezy i niepłodność męską” (2013-2016)

- **Współautor grantu i koordynator zadań badawczych:**

1. Nauka dla Społeczeństwa II NdS-II/SP/0288/2024/01: „Poszukiwanie przyczyn męskiej niepłodności - wysokoprzepustowe badania genomowe populacji polskiej” pod kierownictwem dr hab. Marty Olszewskiej, prof. IGC PAN (2024-2027)
2. OPUS NCN 2020/37/B/NZ5/00549: „Genomika systemowa w poszukiwaniu nowych genów/wariantów u spokrewnionych rodzin, w tym u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisza (2021-2026)
3. OPUS NCN 2017/25/B/NZ5/01231: „Modelowanie spermatogenezy człowieka dla potrzeb badania, diagnozy i terapii męskiej niepłodności” pod kierownictwem dr hab. Natalii Rozwadowskiej, prof. IGC PAN (2018-2023)

- **Koordynator zadań badawczych:**

1. OPUS NCN 2014/13/B/NZ3/04646 „Badania nad cytoprotekcyjną rolą antyoksydantów wobec ludzkiej komórki mięśniowej rezerwuaru tkankowego (mioblast) w warunkach in vitro i in situ” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa (2015-2018)

- **Członek komitetów organizacyjnych:**

1. Polsko-Ukraińskie Sympozjum Naukowe „Immunologiczne i genetyczne uwarunkowania niepłodności i chorób o podłożu autoimmunologicznym”. Jubileuszowe sympozjum naukowe podsumowujące 25 lat współpracy naukowej pomiędzy Instytutem Genetyki Człowieka PAN i Lwowskim Narodowym Uniwersytetem Medycznym im. Danyła Halickiego 22-24 maja 2025, Poznań – członek komitetu naukowego i organizacyjnego
2. Trzecia Poznańska TBR-ówka pt. „Genetyczne i niegenetyczne uwarunkowania ruchu plemników”. Mini-sympozjum połączone z warsztatami praktycznymi dotyczącymi testów wspomagających ocenę przyczyn obniżonych parametrów ruchu plemników, 24 lutego 2025, Poznań – członek komitetu naukowego i organizacyjnego
3. Druga edycja spotkania integracyjnego dla młodych pracowników naukowych IGC PAN pt. „R1&R2 meet and greet”, 22 maja 2024, Poznań – przewodnicząca komitetu organizacyjnego
4. Druga Poznańska TBR-ówka pt. „Genomika męskiej niepłodności i morfologia plemników”. Mini-sympozjum połączone z warsztatami praktycznymi dotyczącymi automatycznej analizy nasienia (CASA) – aspekty techniczne analizy różnych gatunków ssaków, 20 maja 2024, Poznań – członek komitetu naukowego i organizacyjnego
5. Pierwsza edycja spotkania integracyjnego dla młodych pracowników naukowych IGC PAN pt. „R1&R2 meet and greet”, 11.10.2023, Poznań – przewodnicząca komitetu organizacyjnego
6. Pierwsza Poznańska TBR-ówka pt. „Model myszy w badaniach niepłodności męskiej”. Mini-sympozjum połączone z warsztatami praktycznymi dotyczącymi analizy nasienia u myszy, 20 marca 2023, Poznań – członek komitetu naukowego i organizacyjnego
7. IX Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR), 2-4 września 2021, Poznań - członek komitetu organizacyjnego

Osiągnięcia dydaktyczne

- **Promotor pomocniczy prac doktorskich**

1. mgr Rim Ibrahim – w trakcie realizacji (Rozpoczęcie kształcenia w PSD IGC PAN: 01.10.2021)

Tytuł: *„Systematic genomic search for novel genes/variants in consanguineous families including males with reproductive failure”*

2. dr Magdalena Nowaczyk – stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne uzyskany z wyróżnieniem; nadany decyzją Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk dnia 25 marca 2024

Tytuł: *„Cytoprotekcyjna rola antyoksydantów (SOD3 i PBN) wobec ludzkiej komórki mięśniowej rezerwuaru tkankowego”*

- **Promotor prac magisterskich**

1. Wiktoria Maćkowiak – w trakcie realizacji

Tytuł: *„Globalna analiza wariantów przyczynowych i ekspresji genów u niepłodnych mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy”*. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii; Kierunek: Biotechnologia, Poznań

2. Emilia Karauda – w trakcie realizacji

Tytuł: *„Analiza wariantów strukturalnych u niepłodnych mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy”*. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii; Kierunek: Biotechnologia, Poznań

3. Wojciech Włoszek – w trakcie realizacji

Tytuł: *„ Funkcja genu *Fam71f1* w płodności męskiej - badania na mysim modelu knockout”*. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii; Kierunek: Biotechnologia, Poznań

4. Alicja Patyk

Praca pt. *„Identyfikacja i walidacja puli genów przeanalizowanych za pomocą sekwencjonowania RNA w komórkach gametogenicznych z aktywowanym genem *TKTL1*”*. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii; Kierunek: Biotechnologia, Poznań 2022.

Realizacja pracy magisterskiej w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789.

5. Mikołaj Smolibowski

Praca pt. „Optymalizacja oraz weryfikacja aktywacji genu *TKTL1* za pomocą technologii CRISPR w ludzkich komórkach pochodzących z gonady męskiej”. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Medyczny; Kierunek: Biotechnologia medyczna, Poznań 2021.

Realizacja pracy magisterskiej w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789.

- **Promotor prac licencjackich/inżynierskich**

1. Sebastian Pęcherz

Praca pt. „Charakterystyka molekularna indukowanych pluripotentnych komórek uzyskanych z ludzkich pierwotnych komórek pochodzących z gonady męskiej”. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2021.

Realizacja pracy licencjackiej w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789.

2. Jagoda Kostyk

Praca pt. „Charakterystyka molekularna ludzkich komórek pochodzących z gonady męskiej”. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2020.

Realizacja pracy licencjackiej w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789.

- **Opiekun naukowy prac magisterskich i licencjackich/inżynierskich**

1. Zuzanna Graczyk: „Optymalizacja oraz weryfikacja aktywacji genu *ESX1* za pomocą technologii CRISPR w ludzkich komórkach pochodzących z gonady męskiej” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Medyczny; Kierunek: Biotechnologia medyczna, Poznań 2021.

Realizacja pracy magisterskiej w ramach kierowanego przeze mnie grantu SONATA NCN 2017/26/D/NZ5/00789.

2. Oliwia Kordyl: „Ekspresja genu *Fam71f1* w mysim modelu typu „knockout” spermatogenezy męskiej” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2021

3. Aleksandra Apolinarek: „Ekspresja genu *Efcab6* w mysim modelu typu „knockout” spermatogenezy męskiej” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2019

4. Andromeda Flisiak: „Badanie poziomu ekspresji genu *Tex13b* w mysim modelu typu „knockout” spermatogenezy męskiej” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2019

5. Sylwia Budkiewicz: „Ekspresja genu *Tcte1* w mysim modelu typu „knockout” spermatogenezy męskiej” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii; kierunek: Biotechnologia, Poznań 2019

6. Soroosh Monem: „Sequence analysis of androgen receptor gene (*AR*) in patients with androgen insensitivity syndrome (AIS)” pod kierownictwem prof. dr hab. Macieja Kurpisa. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; kierunek: Biotechnologia (w języku angielskim), Poznań 2015

• **Opiekun naukowy praktykantów/stażystów**

1. Donald Bajja, UM Poznań, 7.07.2022-30.06.2023
2. Nicole Napierała, UP Poznań, 13.11-31.12.2023
3. Maria Nowak, UAM Poznań, 04.09- 30.09.2023
4. Gabriela Maciaszek, UAM Poznań, 04.09- 30.09.2023
5. Dominika Błaszczuk, UAM Poznań, 31.01 - 04.09.2022
6. Adrianna Bilińska, UP Poznań, 8.06-5.08.2022
7. Aleksandra Perkowska, UP Poznań, 20.09- 15.10.2021
8. Julia Szczęśniak, UP Poznań, 5.07-30.07.2021
9. Emilia Malinowska, UM Poznań, 21.06 - 31.12.2021
10. Zuzanna Stefaniak, UM Poznań, 17.02-31.12.2020
11. Mikołaj Smolibowski, UM Poznań, 01.01 – 12.2020
12. Sebastian Pęcherz, UAM Poznań, 25.09 - 23.10.2020
13. Alicja Wysocka, UP Poznań, 6.07-11.09.2020
14. Jagoda Kostyk, staż UE, UP Poznań, 18.03-24.05.2019
15. Mikołaj Smolibowski, UM Poznań, 14.03-15.04.2019
16. Kralaska Agnieszka, UAM Poznań, 01.07-31.12.2018
17. Dyżert Marta, UP, Poznań, 15.07-22.09.2019
18. Kujawski Maciej, UP Poznań, 18.03-18.04.2019
19. Bilnicka Aneta, staż UE, UJ Poznań, 30.08-30.11.2017

Działalność popularyzacyjno-naukowa:

1. Malcher A. Warsztaty I wykład dla Szkoły Podstawowej DaVinci „DNA, komórka i komórki nowotworowe” w ramach działalności Gen-i-już, 19.09.2025
2. Artykuł popularyzacyjno-naukowy pt. „ Co z pacjentami z brakiem plemników w ejakulacie?” opublikowany na portalu www.badanie-nasienia.pl, 2025
3. Krótki film promocyjny dla pacjentów, przygotowany w ramach programu Nauka dla Społeczeństwa, publikowany w mediach społecznościowych, dotyczący znaczenia badań genetycznych w diagnostyce niepłodności męskiej, 2025

4. Wywiad dla telewizji TVP World w ramach programu „Decoding Life: Poland’s Breakthroughs in Genetics. Poland Innovation Hub”, 2025
5. Krótki film promocyjny na temat nowoczesnych technologii i genu *ESX1* w azoospermii nieobstrukcyjnej, przygotowany do publikacji w mediach społecznościowych, 2024
6. Krótki film promocyjny prezentujący badania realizowane w ramach grantu pt. „Poszukiwanie przyczyn męskiej niepłodności - wysokoprzepustowe badania genomowe populacji polskiej” finansowanego przez MNiSW w programie Nauka dla Społeczeństwa, 2024
7. Malcher A. Warsztaty i wykład dla Szkoły Podstawowej DaVinci „Komórki i DNA czyli po nitce do kłębka” w ramach działalności Gen-i-już, 13.05.2022
8. Malcher A. Warsztaty i wykład dla przedszkolaków „DNA- cząsteczka życia” w ramach działalności Gen-i-już, 8.04.2019

VII. INNE ISTOTNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

Funkcje naukowe:

od 2025	Członek Rady Programowej w dyscyplinie nauki medyczne Instytutu Genetyki Człowieka PAN
od 2024	Inspektor ds. bezpieczeństwa GMO i GMM w IGC PAN
	Członek grupy roboczej ds. Europejskiej Karty Naukowca i Kodeksu Postępowania przy Rekrutacji Naukowców (HR Excellence in Research)
	Członek grupy roboczej ds. poprawy procedur w IGC PAN
	Członek zespołu ekspertów NCBiR
	Ekspert w Europejskim Centrum Badań Jakości
	Członek zespołu ekspertów FNP FENG
od 2023	Przewodnicząca Rady Młodych Pracowników Naukowców Instytutu Genetyki Człowieka PAN
2019 – 2022	Zastępca przewodniczącego Rady Młodych Pracowników Naukowców Instytutu Genetyki Człowieka PAN
2018–2023	Członek zespołu ekspertów FNP

Nagrody i wyróżnienia:

2024	Nagroda Towarzystwa Biologii Rozrodu za najlepszą publikację opublikowaną w roku 2023: „Gen <i>ESX1</i> jako potencjalny kandydat odpowiedzialny za niepłodność męską w nieobturacyjnej azoospermii” – praca P2 w cyklu.
------	---

2022	Wyróżnienie „Top Downloaded Article” przyznanie przez wydawnictwo Wiley za publikację: „Whole-genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia” – praca P1 w cyklu.
2019	Stypendium EMBO na realizację projektu „The CRISPR/Cas9 system based spermatogenesis impairment <i>in vitro</i> modeling of human male gonad” w Department of Developmental Genetics at the Max Planck Institute for Molecular Genetics in Berlin.
2019	Nominacja do Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2019 w kategorii Naukowiec przyszłości za projekt: „Nowe przyczynowe warianty genetyczne w azoospermii: analiza całogenomowa i funkcjonalne badania <i>in vitro</i> ”.
2014	Nagroda Polskiej Akademii Nauk za najlepszą publikację w 2013 r: „Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis”.
2014	Nagroda Instytutu Genetyki Człowieka PAN na podstawie wyróżnionej pracy doktorskiej.
2013	Nagroda Złota Helisa za plakat: „Potencjalne biomarkery diagnostyczne i prognostyczne u pacjentów z azoospermia nieobstrukcyjną zidentyfikowane za pomocą analizy profilu ekspresji genów” – IV Polski Kongres Genetyki, Poznań.
2012/2013	Stypendysta projektu „Wsparcie stypendialne dla doktorantów kształcących się na kierunkach uznanych za strategiczne dla rozwoju Wielkopolski”, Program Operacyjny Kapitał Ludzki, współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.
2012 – 2023	Nagrody Dyrektora IHG PAN za 7 publikacji o wysokim współczynniku wpływu.

Załącznik nr 8 zawiera certyfikaty potwierdzające przyznane nagrody.

Aktywność recenzencka:

Byłam recenzentką 17 manuskryptów w czasopismach międzynarodowych:

Scientific Reports – 3 manuskrypty w 2017, 2021, 2024

Balkan Journal of Medical Genetics – 1 manuskrypt w 2020

International Journal of Molecular Sciences – 3 manuskrypty w 2020, 2021

Clinica Chimica Acta – 1 manuskrypt w 2022

Systems Biology in reproductive Medicine – 1 manuskrypt w 2022

Cells – 1 manuskrypt w 2022

Journal of Applied Genetics – 1 manuskrypt w 2023

Andrologia – 2 manuskrypty 2024

Molecular Genetics & Genomic Medicine – 1 manuskrypt w 2024

Biomarkers in Medicine – 1 manuskrypt w 2024

BCM Genomics – 2 manuskrypty w 2024

Członkostwo w organizacjach naukowych:

od 2022	Członek międzynarodowej organizacji ANDRONET COST (CA20119)
od 2016	Członek Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR)
od 2014	Członek Polskiego Towarzystwa Andrologicznego (PTA)
2018 - 2021	Skarbnik Poznańskiego Oddziału Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR)
2011 - 2013	Członek International Network for Young Researchers in Male Fertility (INYRMF)

Kursy, szkolenia, warsztaty:

2024	Przepisy prawa i informacje praktyczne dla wnioskodawców i użytkowników GMM i GMO
2019	Szkolenie „Wprowadzenie do przetwarzania i analizy danych NGS” w Ideas4biology w Poznaniu
2018	Wymagania higieniczne i standardy pracy w pomieszczeniach czystych zgodnie z nowymi normami PN-EN ISO 14644-1:2016-03 i PN-EN ISO 14644-2:2016-03 oraz GMP
2010	Szkolenie z zakresu przygotowanie próbek do badań mikromacierzowych- Affymetrix w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej w Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach
2010	Kurs z zakresu mikromacierzy ekspresyjnych - projektowanie eksperymentów i analiza danych w Cemed Centrum w Warszawie

Seminaria naukowe:

1. Malcher A. Molecular characteristic of patients with complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). Seminarium IGC PAN, 22.11.2016, Poznań, Polska
2. Malcher A. Potential diagnostic and prognostic biomarkers in patients with non-obstructive azoospermia. Seminarium IGC PAN, 4.06.2019, Poznań, Polska
3. Malcher A. Genetic variants identified in the whole genome sequencing of 39 non-obstructive azoospermia cases. Seminarium IGC PAN, 15.06.2021, Poznań, Polska
4. Malcher A. *ESX1* as a new candidate gene for non-obstructive azoospermia. Seminarium IGC PAN, 26.03.2024, Poznań, Polska

Przerwy w pracy naukowej:

Urlop macierzyński - 18.04.2014 - 16.02.2015 r. (315 dni)

VIII. SKRÓCONY OPIS DOROBKU NAUKOWEGO

Dane bibliometryczne (z dnia 2025-10-03)

Sumaryczny Impact Factor: 151,45 ; Sumaryczna liczba MNiSW: 2730; indeks Hirscha: 14; liczba cytowań (wg Scopus): 706 (641 bez autocytowań)

Jestem autorką/współautorką łącznie 46 prac naukowych:

- 1 monografii
- 2 rozdziałów w monografiach naukowych
- 43 artykułów naukowych, w tym:
 - 42 w czasopismach z listy JCR
 - 37 prac oryginalnych
 - 4 prac poglądowych
 - 1 list do reakcji
 - 1 artykuł redakcyjne
- 9 prac z pierwszym autorstwem
- 9 prac z drugim autorstwem
- 1 prace jako autor korespondujący
- 6 prace jako autor współ-korespondujący
- 1 praca jako autor współ-senioralny

W 9 pracach jestem pierwszym autorem, w 7 jestem autorem korespondującym/współ-korespondującym i w 1 pracy jestem autorem współsenioralnym.

Sprawowałam/uję opiekę nad studentami:

- Promotor pomocniczy 2 rozpraw doktorskich – 1 ukończona i 1 w trakcie
- Promotor 5 studentów studiów magisterskich – 2 ukończonych i 3 w trakcie
- Promotor 2 studentów studiów licencjackich – ukończonych
- Opiekun naukowy 6 studentów prac dyplomowych – ukończonych
- Opiekun naukowy 19 praktykantów/stażystów – ukończonych

Udział w projektach (zakończonych i trwających):

- Kierownik 2 projektów NCN: PRELUDIUM i SONATA
- Koordynator naukowy 1 projektu NCN OPUS
- Współautor 3 projektów i koordynator zadań badawczych: 2 NCN OPUS i 1 MNiSW
- Wykonawca w 9 projektach: 2 NCN OPUS, 4 NCBiR, 3 MNiSW

Pobyty badawcze w kraju i za granicą

- Dwa staże szkoleniowe obejmujące 2 serie wykładów w ramach programu Erasmus+ (University of Bergen, IT Division, Bergen, Norwegia, 2023; Ondokuz Mayiz University Samsun, Turcja - 2021)

- Staż naukowy w ramach stypendium EMBO (Max Planck Inst. for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy 2019)
- Staż naukowy z analizy mikromacierzy całego transkryptomu (Centrum Onkologii -Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Gliwice, Polska, 2011)

Udział w konferencjach naukowych:

- Wygłoszenie 86 prezentacji na konferencjach naukowych, w tym:
 - 12 na zaproszenie
 - w tym pierwszoautorskie lub senioralne: 24
 - współautor 50 prezentacji na konferencjach naukowych

Działalność naukowo-popularyzatorska:

- Organizacja 2 spotkań integracyjnych młodych naukowców IHG
- Organizator i wykładowca 3 minisymposium Poznańskiego TBR-ówki
- Organizator 2 konferencji: SKEPTK i TBR
- 3 warsztaty i wykłady dla dzieci w ramach akcji „Gen-i-już”
- 1 artykuł popularnonaukowy
- 4 kampanie promujące wyniki

Szczegółowy opis wszystkich osiągnięć naukowych znajduje się w Załączniku nr 4