

Autoreferat

**Zaburzenia metylacji DNA w wybranych nowotworach człowieka
i ich znaczenie w patogenezie choroby nowotworowej.**

Mateusz Bujko

1. Imię i Nazwisko: **Mateusz Bujko**

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

2010	doktor nauk medycznych w dziedzinie: biologia medyczna
	rozprawa doktorska pt.: „ <i>Ocena wartości klinicznej zmian w genach naprawy DNA: MGMT, MLH1, MSH2, ATM i NBS1 dla skuteczności chemioradioterapii z zastosowaniem temozolomidu u chorych na glejaki o wysokim stopniu złośliwości</i> ”, promotor prof. dr hab. med. Janusz Aleksander Siedlecki, Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie
2003	magister inżynier biotechnologii, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
	praca magisterska pt.: „ <i>Opracowanie warunków dla wydajnej modyfikacji DNA kwaśnym siarczynem sodowym i amplifikacji DNA promotorów genów MTS1 i AR uczestniczących w karcinogenezie</i> ”

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

2009-2011	Młodszy specjalista, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej w Centrum Onkologii-Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie
od 2011	adiunkt w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej (dawniej Zakładzie Biologii Molekularnej) w Centrum Onkologii-Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego: **Zaburzenia metylacji DNA w wybranych nowotworach człowieka i ich znaczenie w patogenezie choroby nowotworowej.**

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

1. Kober P, Boresowicz J, Rusetska N, Maksymowicz M, Goryca K, Kunicki J, Bonicki W, Siedlecki JA, **Bujko M.**, data wydania: 15 września 2018, DNA methylation profiling in nonfunctioning pituitary adenomas. *Molecular and Cellular Endocrinology* 473:194-204.

2. **Bujko M**, Kober P, Statkiewicz M, Mikula M, Grecka E, Rusetska N, Ligaj M, Ostrowski J, Siedlecki JA.; data wydania: wrzesień 2017; Downregulation of *PTPRH* (Sap-1) in colorectal tumors. *International Journal of Oncology* 51(3):841-850

3. **Bujko M**, Kober P, Rusetska N, Wakula M, Goryca K, Grecka E, Matyja E, Neska J, Mandat T, Bonicki W, Siedlecki JA. data wydania: grudzień 2016; Aberrant DNA methylation of alternative promoter of *DLG1* isoform 1 in meningiomas. *Journal of Neuro-oncology* 130(3):473-484.
4. **Bujko M**, Kober P, Statkiewicz M, Mikula M, Ligaj M, Zwierzchowski L, Ostrowski J, Siedlecki JA. data wydania: 2015; Epigenetic-Mediated Downregulation of μ -Protocadherin in Colorectal Tumours. *Gastroenterology Research and Practice* 2015:317093.
5. Musialik E, **Bujko M**, Kober P, Wypych A, Gawle-Krawczyk K, Matysiak M, Siedlecki JA. data wydania: marzec 2015; Promoter methylation and expression levels of selected hematopoietic genes in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Research* 50(1):26-32
6. Musialik E, **Bujko M**, Kober P, Grygorowicz MA, Libura M, Przestrzelska M, Juszczynski P, Borg K, Florek I, Jakóbczyk M, Siedlecki JA. Data wydania: maj 2015; Promoter DNA methylation and expression levels of HOXA4, HOXA5 and MEIS1 in acute myeloid leukemia. *Molecular Medicine Reports* 11(5):3948-54.
7. Musialik E, **Bujko M**, Kober P, Grygorowicz MA, Libura M, Przestrzelska M, Juszczynski P, Borg K, Florek I, Jakóbczyk M, Baranowska A, Siedlecki JA. Data wydania: lipiec 2014; Comparison of promoter DNA methylation and expression levels of genes encoding CCAAT/enhancer binding proteins in AML patients. *Leukemia Research* 38(7):850-6.
8. **Bujko M**, Musialik E, Olbromski R, Przestrzelska M, Libura M, Pastwińska A, Juszczynski P, Zwierzchowski L, Baranowski P, Siedlecki JA. Data wydania: lipiec 2014 Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. *International Journal of Hematology* 100(1):79-87.
9. Kober P, **Bujko M**, Olędzki J, Tysarowski A, Siedlecki JA. Data wydania: listopad 2011; Methyl-CpG binding column-based identification of nine genes hypermethylated in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis* 50(11):846-56

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Epigenetyka w procesie transformacji nowotworowej

Istnieje kilka uzupełniających się teorii tłumaczących przyczyny rozwoju nowotworu. Jako przyczyny transformacji nowotworowej wskazywane są czynniki środowiskowe, predyspozycje dziedziczne i spontaniczne lub wywołane czynnikami środowiskowymi somatyczne zaburzenia materiału genetycznego, w tym mutacje punktowe, jak i różnego typu zmiany cytogenetyczne (1). Udział poszczególnych tych elementów w rozwoju choroby nowotworowej jest różny w zależności od wielu czynników m.in. lokalizacji narządowej, podtypu histologicznego czy narażenia na określony czynnik zewnętrzny. Od pewnego czasu jako równie istotne w transformacji nowotworowej uznaje się zaburzenia mechanizmów epigenetycznych. Zgodnie z ogólną definicją mechanizmy epigenetyczne to mechanizmy regulujące funkcje genomu, jego stabilność i określony wzór ekspresji genów warunkujący fenotyp komórki. To mechanizmy, które w przeciwieństwie do czynników genetycznych, determinują fenotyp komórki niezależnie od sekwencji DNA i pozwalają na dziedziczenie określonych cech przez komórki potomne powstałe na drodze podziału. Głównymi

elementami epigenetycznej regulacji genomu są kowalencyjne modyfikacje wprowadzane w precyzyjnie regulowany sposób w obrębie chromatyny: metylacja DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych. Według niektórych definicji do tych mechanizmów zaliczane są również procesy rearanżacji (remodelingu) chromatyny i regulacja ekspresji genów przez tzw. niekodujące RNA.

Metylacja cytozyny w obrębie dwunukleotydów CpG w DNA jest jedną z najlepiej poznanych modyfikacji epigenetycznych. Zmiany poziomu i wzoru metylacji w obrębie genomu jak i określonych genów są zjawiskiem często towarzyszącym procesowi kancerogenezy (2). Badanie skali i znaczenia zaburzeń wzoru metylacji DNA w nowotworach człowieka były osią mojej pracy badawczej od początku mojej kariery zawodowej.

Zaburzenia metylacji DNA w skali całego genomu

Procesowi transformacji nowotworowej towarzyszą zmiany w obrazie metylacji DNA w skali całego genomu, które obejmują zarówno zmiany w obrębie sekwencji kodujących, sekwencji regulatorowych jak i regionów niekodujących, w tym różnego typu sekwencji powtarzających się (2).

W ramach realizacji projektu Epigenetic regulation of haematopoietic stem cell differentiation and tumorigenesis realizowanego przy współpracy z Institut Universitaire d'Hematologie, INSERM U662, Hopital Saint-Louis w Paryżu wraz ze współpracownikami przeprowadziłem analizę globalnego poziomu metylacji DNA u chorych na najczęściej występującą białaczkę u dorosłych tj. ostrą białaczkę szpikową (OBS) oraz najczęstszy nowotwór hematologiczny u dzieci tj. ostrą białaczkę limfoblastyczną (OBL). W badaniu tym w próbkach DNA izolowanych z komórek jednojądrzastych krwi od chorych na białaczki oraz próbkach kontrolnych porównane zostały ogólna zawartość 5mC oraz poziom metylacji DNA w sekwencjach powtarzających się *LINE-1* oraz *Alu*. Materiał porównawczy dla próbek od chorych na białaczki OBS i OBL stanowiły komórki jednojądrzaste szpiku od dorosłych dawców oraz komórki jednojądrzaste krwi obwodowej dzieci. Badanie pokazało, że inaczej niż w guzach litych w białaczkach obserwuje się wyższy poziom metylacji DNA. Stwierdziliśmy wyższy poziom metylacji DNA w obrębie sekwencji *LINE-1* zarówno w analizie białaczek OBS i OBL względem materiału porównawczego, a także wyższy poziom metylacji sekwencji *Alu* i wyższą zawartość 5mC w próbkach OBL w porównaniu do prawidłowej krwi. Białaczki typu OBS stanowią dość heterogenną grupę nowotworów, które różnią się występowaniem określonych zaburzeń cytogenetycznych. Ocena tych zaburzeń ma znaczenie rokownicze dla chorych, a białaczki można podzielić na trzy grupy ryzyka w zależności od ich występowania. W prowadzonym badaniu stwierdziliśmy znamienne niższy poziom metylacji sekwencji powtórzonych u chorych na OBS z pośrednim rokowaniem, niż u chorych ze złym rokowaniem, a także niższą zawartość 5mC u chorych z pośrednim rokowaniem niż u pozostałych grup chorych. W czasie, kiedy rozpoczęliśmy nasze badanie zidentyfikowano u chorych na białaczki OBS mutacje w genach z wiązanych z procesami metylacji DNA: *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2* jako mutacje sprawcze w tej grupie nowotworów (3). W badaniu oceniliśmy status mutacji wymienionych genów u chorych na OBS włączonych do

naszego badania, jednak nie stwierdziliśmy znamiennej zależności pomiędzy występowaniem tych mutacji, a ogólnym poziomem metylacji DNA. Badanie, którego wyniki opisałem w pracy *Bujko M i wsp. 2014; Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. International Journal of Hematology 100(1):79-87*, pokazało że inaczej niż w guzach litych, gdzie obserwuje się obniżenie poziomu zawartości metylocytozyny i metylacji sekwencji powtórzonych, w rozwoju białaczki dochodzi do nasilenia metylacji DNA.

Odmienne podejście w globalnej analizie metylacji DNA wykorzystałem w innym badaniu – w analizie poziomów metylacji DNA w utkaniu nowotworowym nieczynnych funkcjonalnie gruczolaków przysadki i w prawidłowej tkance przysadki. Analiza przeprowadzona była w ramach realizacji grantu przyznanego przez Naukową Fundację Polpharmy, w którym byłem głównym wykonawcą. W badaniu tym poziom metylacji DNA oceniany był przy wykorzystaniu mikromacierzy oligonukleotydowych HumanMethylation 450K (Illumina). Narzędzie to pozwala na jednoczesną analizę poziomu metylacji około 450 000 wybranych dwunukleotydów CpG, w tym zarówno tych zlokalizowanych w obrębie znanych genów, jak również w przestrzeniach międzygenowych. Ponieważ mikromacierze pozwalają na ocenę wybranych miejsc, z pominięciem np. sekwencji powtórzonych, wyniki eksperymentu nie mogły być wykorzystane do oceny całkowitego poziomu metylacji DNA. Ogromna ilość danych pozwala jednak na uogólnione analizy uwzględniające ocenę metylacji DNA wszystkich miejsc CG pokrytych sondami mikromacierzy lub określonych klas sekwencji genomowych, np. promotorów genów czy sekwencji wzbogaconych w dwunukleotydy CG, tzw. wysp CpG. Ogólne porównanie profili metylacji DNA nieczynnych funkcjonalnie gruczolaków przysadki i prawidłowych wycinków przysadki, opisane w pracy *Kober P i wsp. 2018; DNA methylation profiling in nonfunctioning pituitary adenomas. Molecular and Cellular Endocrinology 473:194-204* pokazało zasadniczą różnicę we wzorze metylacji DNA pomiędzy tymi grupami próbek.

Zdecydowaną różnicę stwierdzono zarówno w analizie głównych składowych, jak i w analizie typu klastrowania hierarchicznego. Porównując uśredniony poziom sygnału ze wszystkich sond mikromacierzy HM450K obserwowano znamienne wyższy poziom metylacji DNA w gruczolakach przysadki niż wycinkach prawidłowego gruczołu. W badaniu tym ogólna analiza poziomu metylacji DNA stanowiła pierwszy etap badania zorientowanego na poszukiwanie tych regionów genomu, które charakteryzują się różnym poziomem metylacji DNA w badanych grupach próbek.

Identyfikacja regionów genomu o nieprawidłowym wzorze metylacji DNA.

O ile różnice w ogólnym poziomie metylacji DNA pomiędzy utkaniem nowotworowym a odpowiadającą tkanką prawidłową mogą wskazywać na udział komponenty epigenetycznej w procesie transformacji nowotworowej komórek danego typu tkanki, to dla poznania znaczenia zaburzeń

metylacji DNA w procesie transformacji nowotworowej niezbędna jest identyfikacja konkretnych regionów genomowych, w których dochodzi do zmian epigenetycznych. Szczególne znaczenie ma określenie tych miejsc w genomie, które pełnią funkcje regulatorowe dla transkrypcji określonych genów, takich jak promotory czy enhancery (sekwencje wzmacniające).

Celem części prowadzonych przeze mnie badań była identyfikacja regionów genomowych, w których dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA. W badaniach tego typu wykorzystywane są wielkoskalowe metody analizy molekularnej pozwalające na jednoczesne badanie wielu regionów w genomie.

W latach 2008-2011 byłem głównym wykonawcą projektu pt. *Poszukiwanie markerów epigenetycznych dla nowotworów jelita grubego przy użyciu kolumny wiążącej metylowane DNA* finansowanego przez MNiSW. W ramach tego projektu wraz ze współpracownikami podjęliśmy próbę identyfikacji regionów promotorowych genów, które ulegają nieprawidłowej metylacji w raku jelita grubego. W czasie, gdy planowaliśmy i rozpoczynaliśmy to badanie nie były dostępne jeszcze komercyjne rozwiązania do globalnej analizy metylomu. Osiągnięcie celów stawianych w badaniu wymagało opracowania metody pozwalającej na izolację metylowanego DNA. Aby rozdzielić metylowany i niemetylowany DNA izolowany z wycinków utkania raka jelita grubego i prawidłowego nabłonka jelita wykorzystaliśmy domenę białkową wiążącą metylowany DNA (ang. methylation binding domain, MBD). Gen kodujący białko MBD wraz z etykietami pozwalającymi na jego oczyszczenie i immobilizację na złożu wprowadzano w wektorze plazmidowym do bakterii *E. coli* i indukowano nadekspresję wprowadzonego konstruktu. Białko MBD, po oczyszczeniu, immobilizowane było na złożu i przepłukiwane roztworem badanego DNA. Fragmenty DNA o różnej zawartości 5metC były rozdzielane poprzez przepłukiwanie kolumny roztworami NaCl o różnych stężeniach. Zawartość frakcji bogatych w metylowane DNA z raków jelita grubego i wycinków kontrolnych porównana została przy wykorzystaniu mikromacierzy oligonukleotydowych GeneChip Human Promoter 1.0R Arrays (Affymetrix). Analiza bioinformatyczna pozwoliła na identyfikację ponad 500 regionów regulatorowych hipermetylowanych w raku jelita grubego. Procedura weryfikacji wyniku dla wybranych 9 genów, przeprowadzona niezależnymi metodami potwierdziła wyniki badania wielkoskalowego. Analizując dane kliniczne stwierdziliśmy związek metylacji promotora *GPR101* z czasem do wznowy u chorych na raka jelita grubego w stopniu IV. Wyniki badania opisane zostały w pracy Kober P. 2011; *Methyl-CpG binding column-based identification of nine genes hypermethylated in colorectal cancer. Molecular Carcinogenesis 50(11):846-56.*

Inne podejście eksperymentalne wykorzystałem wraz ze współpracownikami przy realizacji projektu „Identyfikacja zaburzeń metylacji DNA u chorych na nieczynne funkcyjnie gruczolaki przysadki i ocena ich wartości prognostycznej” finansowanego w ramach grantu Naukowej Fundacji Polpharmy. W badaniu dotyczącym zaburzeń metylacji DNA w nieczynnych funkcyjnie gruczolakach przysadki DNA izolowane z wycinków guzów przysadki oraz prawidłowych wycinków gruczołu analizowane było pod kątem metylacji DNA z wykorzystaniem mikromacierzy

oligonukleotydowych HumanMethylation 450K (Illumina), które nie wymagają rozdziału i wzbogacenia DNA we frakcje o wyższej zawartości 5metC. Porównanie wyników eksperymentu mikromacierzowego dla DNA z guzów i wycinków kontrolnych pozwoliło na opisane w poprzedniej sekcji ogólne analizy różnic w poziomie DNA, ale również umożliwiło identyfikację ponad 13 000 pozycji CpG o nieprawidłowej metylacji w guzach, w tym ponad 11 000 hipermetylowanych pozycji. Część ze zidentyfikowanych miejsc CpG zlokalizowana jest w regionach regulatorowych 1459 genów. Wykorzystując zdeponowane w publicznej bazie danych Gene Expression Omnibus dane na temat ekspresji genów w nieczynnych funkcjonalnie gruczolakach przysadki stwierdzono, że 859 genów spośród 1459 genów z nieprawidłową metylacją DNA w obrębie regionów regulatorowych to geny o nieprawidłowej ekspresji w tego typu guzach. Analiza wzbogacenia (ang. Gene Set Enrichment) w oparciu o atlas KEGG pathways wykazała, że geny te kodują białka zaangażowane w szlaki sygnałowe ważne dla procesu transformacji nowotworowej. Wyniki te wskazują na istotną rolę hipermetylacji DNA regionów regulatorowych genów w patogenezie nieczynnych funkcjonalnie gruczolaków przysadki.

Znaczenie zaburzeń metylacji DNA wybranych regionów regulatorowych genów.

Wielkoskalowe metody profilowania metylacji DNA pozwalają na efektywną identyfikację bardzo wielu regionów genomowych o nieprawidłowym poziomie metylacji. Jednak funkcjonalne znaczenie zaburzeń epigenetycznych danego fragmentu DNA wciąż najczęściej wymaga badań nad określonym regionem DNA i jego znaczeniem dla ekspresji genu, kontekstem innych modyfikacji epigenetycznych czy związkiem z określonymi parametrami klinicznymi.

Kontynuacją badania ukierunkowanego na identyfikację regionów genomowych hipermetylowanych w raku jelita grubego był prowadzony przeze mnie projekt MNiSW Iuventus plus „Ocena znaczenia zmian ekspresji i metylacji DNA regionów regulatorowych genów kodujących kadheryny E, N, P oraz kadherynę 17 w progresji nowotworów jelita grubego”.

W ramach realizacji tego projektu podjąłem się oceny związku pomiędzy nieprawidłową metylacją DNA i ekspresją wybranych cząsteczek powierzchniowych. W ramach prowadzonych prac analizy molekularne materiału tkankowego pobranego od chorych uzupełnione było o badania *in vitro* na liniach komórkowych wyprowadzonych z raka jelita grubego.

W badaniu wykazaliśmy zależną od metylacji DNA, nieprawidłową ekspresję genu *MUPCDH* kodującego cząsteczkę powierzchniową z rodziny kadheryn oraz przybłonowej fosfatazy tyrozynowej *PTPRH*, która, reguluje między innymi białko EGFR. W utkaniu raka jelita grubego stwierdziliśmy wyższy poziom metylacji DNA regionów regulatorowych obu badanych genów niż w prawidłowych wycinków jelita grubego pobranych od tych samych pacjentów. W próbkach raka jelita grubego ekspresja badanych genów i ich białkowych produktów była wyraźnie niższa niż w wycinkach prawidłowych. W liniach komórkowych raka jelita grubego, w których obserwowano wysoki poziom metylacji DNA w obrębie badanych genów, obserwowano wzrost ich ekspresji po hodowli z

inhibitorem metylotransferaz DNA. Zależności takiej nie obserwowano w liniach z niskim poziomem metylacji w promotorach *MUPCDH* i *PTPRH*. W liniach komórkowych niski poziom ekspresji i wysoki poziom metylacji DNA badanych genów związane były również z wyższym poziomem trimetylacji lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3) oraz niższym poziomem trimetylacji lizyny 4 histonu H3, będącymi markerami odpowiednio nieaktywnej i aktywnej chromatyny. Wyniki tych badań opisałem w artykułach *Bujko M i wsp. 2015; Epigenetic-Mediated Downregulation of μ -Protocadherin in Colorectal Tumours. Gastroenterology Research and Practice 2015:317093* oraz *Bujko M i wsp. 2017; Downregulation of PTPRH (Sap-1) in colorectal tumors. International Journal of Oncology 51(3):841-850.*

W ramach realizacji projektu Epigenetic regulation of haematopoietic stem cell differentiation and tumourigenesis wraz ze współpracownikami podjęliśmy się oceny znaczenia zaburzeń poziomu metylacji DNA w wybranych genach związanych z procesem hematopoezy w białaczkach: OBS u dorosłych oraz OBL u dzieci.

Białaczki to nowotwory powstające w wyniku proliferacji nieprawidłowych komórek krwiotwórczych, których proces różnicowania został zablokowany na wczesnym etapie. Ponieważ w prawidłowej hematopoezie epigenetyczna regulacja ekspresji genów ma istotny udział w koordynacji procesu różnicowania określonych typów komórek krwi (4), w podjętym badaniu skoncentrowałem się na określeniu zaburzeń poziomu metylacji DNA w obrębie regionów promotorowych wybranych genów kodujących czynniki transkrypcyjne o istotnej roli w hematopoezie.

W badaniu porównałem poziom metylacji DNA promotorów genów z rodziny CEBP (*CEBPA*, *CEBPD*, *CEBPE*, *CEBPZ*) oraz genów z rodziny HOX (*HOXA4*, *HOXA5* oraz *MEIS1*) w komórkach jednojądrzastych izolowanych z krwi od chorych na AML oraz w prawidłowych komórkach: komórkach szpiku od zdrowych dawców, prawidłowych komórkach macierzystych krwi (CD34⁺CD38⁻), komórkach częściowo zróżnicowanych (CD34⁺CD38⁺) oraz w prawidłowych komórkach mieloidalnych (CD15⁺). W białaczkach OBS stwierdziliśmy podwyższony poziom metylacji regionów regulatorowych *CEBPA* oraz *CEBPD*, podczas gdy były one niemetylowane w prawidłowych komórkach szpiku, komórkach macierzystych i prekursorowych krwi oraz dojrzałych komórkach mieloidalnych. Poziom ekspresji *CEBPA* oraz *CEBPD* był odwrotnie skorelowany z poziomem metylacji regionów promotorowych. Analiza danych klinicznych pokazała, że chorzy na AML z dobrym rokowaniem opartym na analizie profilu cytogenetycznego mają odmienny profil metylacji genów *CEBPA*, *CEBPD* i *CEBPE* niż chorzy z grupy złego i pośredniego ryzyka cytogenetycznego. Wyniki przedstawione zostały w pracy *Musialik E i wsp. 2014; Comparison of promoter DNA methylation and expression levels of genes encoding CCAAT/enhancer binding proteins in AML patients. Leukemia Research 38(7):850-6.* W kolejnej pracy z tego cyklu: *Musialik E i wsp. 2015; Promoter DNA methylation and expression levels of HOXA4, HOXA5 and MEIS1 in acute myeloid leukemia. Molecular Medicine Reports 11(5):3948-54* przedstawiliśmy wyniki porównania metylacji promotorów i ekspresji innych genów związanych z różnicowaniem komórek

krwi: *HOXA4*, *HOXA5* oraz *MEIS1*. Wyniki pokazały, że poszczególne populacje prawidłowych komórek krwi wyraźnie różniły się pod względem poziomu metylacji *HOXA4*, a także w pewnym stopniu pod względem poziomu metylacji *HOXA5*. W najliczniejszej grupie chorych w naszym badaniu tj. w grupie pacjentów z prawidłowym kariotypem stwierdziliśmy znamienne ujemną korelację pomiędzy metylacją promotora *HOXA4* a ekspresją tego genu.

W części badania dotyczącej dziecięcej białaczki typu OBL, opisanej w pracy Musialik E i wsp. 2015; *Promoter methylation and expression levels of selected hematopoietic genes in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood Research 50(1):26-32* komórki jednojądrzaste krwi od chorych i od zdrowych dawców porównaliśmy pod względem poziomu metylacji promotorów genów *HOXA4*, *HOXA5* i *MEIS1*, a także innych wybranych czynników transkrypcyjnych regulujących proces hematopoezy *TAL1*, *IRF8* oraz *IRF4*. Wyniki pokazały, że promotory genów *TAL1*, *IRF8*, *IRF4* oraz *MEIS1* są niemetylowane w prawidłowych komórkach krwi, a ich hipermetylację z różną częstością stwierdza się w krwi od chorych. W przypadku badanych genów z rodziny HOX, stwierdziliśmy w prawidłowej krwi bardzo zróżnicowany poziom metylacji regionów promotorowych i mógł być on uznany za podwyższony jedynie u nielicznych chorych. W tym badaniu nie udało się ustalić statystycznie znamiennej zależności pomiędzy poziomami metylacji DNA i ekspresji badanych genów.

W latach 2012-2014 kierowałem projektem badawczym “Znaczenie zaburzeń metylacji DNA w patogenezie i progresji oponiaków” finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach programu SONATA. W ramach tego projektu wraz ze współpracownikami przeprowadziliśmy profilowanie wzoru metylacji DNA w wycinkach utkania oponiaków oraz wycinkach prawidłowych opon mózgowych z użyciem mikromacierzy oligonukleotydowych HM450K. Analiza porównawcza wskazała na promotor genu *DLC1*, jako jeden z regionów genomowych o odmiennym poziomie metylacji DNA w oponiakach i próbkach kontrolnych. Gen ten koduje znane białko supresorowe pełniące funkcję inhibitora GTPazy rodziny Rho, którego wyciszenie epigenetyczne opisano już dla różnego typu nowotworów. Obserwacja wynikająca z porównania profili metylacji oponiaków i prawidłowych opon była interesująca ze względu na fakt, że zidentyfikowany region o odmiennym poziomie metylacji jest jednym z trzech alternatywnych promotorów *DLC1* i jednocześnie tym, którego nieprawidłowej metylacji wcześniej nie opisano. U człowieka zidentyfikowanych zostało 5 wariantów transkrypcyjnych tego genu, a poziom ekspresji różnych wariantów jest tkankowo-specyficzny. Badany przeze mnie region to promotor wariantu 1 genu *DLC1* (zgodnie z bazą danych Refseq), podczas gdy w piśmiennictwie najczęściej badany był wariant 2 (zgodnie z Refseq), który jest dominującym wariantem *DLC1* w większości tkanek. Analiza poziomu ekspresji wariantów genu *DLC1* pokazała, że w przypadku prawidłowych opon i oponiaków najsilniej wyrażony jest wariant 1, którego promotor zidentyfikowaliśmy jako hipermetylowany w oponiakach. Wariant 1 *DLC1* jest również jedynym wariantem, którego ekspresja jest znamienne obniżona w oponiakach.

Wyciszenie wariantu 1 *DLC1* w linii komórkowej KT21 wyprowadzonej z ludzkiego oponiaka potwierdziło supresorowy charakter tego genu. Porównując linię z wyciszonym wariantem 1 genu do linii kontrolnej obserwowano wzrost proliferacji, zwiększoną migrację komórek oraz wzrost aktywności białek Rho. Wyniki opublikowałem w pracy Bujko M i wsp. 2016; *Aberrant DNA methylation of alternative promoter of DLC1 isoform 1 in meningiomas. Journal of Neuro-oncology* 130(3):473-484.

Podsumowanie:

Jako cykl prac do dorobku habilitacyjnego wybrałem 9 publikacji przedstawiających moje badania nad znaczeniem zaburzeń metylacji DNA w wybranych nowotworach człowieka. W mojej pracy badawczej podejmowałem się zarówno oceny zmian ogólnego poziomu metylacji w wybranych nowotworach, jak i identyfikacji regionów, w obrębie których dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA. Podejmowałem próby oceny funkcjonalnego oraz klinicznego znaczenia zaburzeń metylacji DNA w regionach w wybranych w oparciu o przeprowadzone badania wielkoskalowe oraz przesłanki literaturowe.

W pracach: Bujko M i wsp. *Int J Hematol.* 100(1):79-87; Kober P i wsp. *Mol Carcinog.* 50(11):846-56 oraz Kober P i wsp. *Mol Cell Endocrinol.* 473:194-204 opisane zostały badania, które koncentrowały się na porównaniu utkania nowotworu z odpowiednią tkanką prawidłową pod względem poziomu i wzoru metylacji DNA w skali genomu oraz identyfikacji regionów genomowych, w których dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA w procesie transformacji nowotworowej. Badania były prowadzone na ludzkich białaczkach, raku jelita grubego i nieczynnych funkcjonalnie nowotworach przysadki.

W pracach Bujko M, i wsp. *Gastroenterol Res Pract.* 2015:317093; Bujko M i wsp. *Int J Oncol.* 51(3):841-850 przedstawione są wyniki dotyczące zależności pomiędzy nieprawidłową metylacją genów: *PTPRH* oraz *MUPCDH* i zaburzeniami ich ekspresji w nowotworach jelita grubego i związku poziomu metylacji DNA z określonym wzorem wybranych modyfikacji białek histonowych.

W cyklu prac Musialik E i wsp. *Blood Res.* 50(1):26-32, Musialik E i wsp. *Mol Med Rep.* 11(5):3948-54 oraz Musialik E i wsp. *Leuk Res.* 38(7):850-6 prezentowane są badania nad związkiem metylacji DNA i ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w różnicowanie się komórek krwi w ludzkich białaczkach.

W pracy Bujko M i wsp. *J Neurooncol.* 130(3):473-484. przedstawiono wyniki identyfikacji nieprawidłowej metylacji DNA w obrębie jednego z alternatywnych promotorów genu supresorowego *DLC1* w oponiakach. Wyniki wskazują, że nieprawidłowa metylacja tego regionu powoduje wyciszenie tkankowo-specyficznego wariantu transkrypcyjnego *DLC1*, co wpływa na aktywację RHO, zwiększoną proliferację i zdolność do migracji komórek w układzie modelowym.

Piśmiennictwo

1. Sonnenschein C & Soto AM. Theories of carcinogenesis : An emerging perspective. *Seminars*

- in *Cancer Biology* 2008 **18** 372–377.
2. Cheung HH, Lee TL, Rennert OM, & Chan WY. DNA methylation of cancer genome. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 2009 **87** 335–350.
 3. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, & Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature reviews. Cancer* 2012 **12** 599–612.
 4. Sashida G & Iwama A. Epigenetic regulation of hematopoiesis. *International Journal of Hematology* 2012 **96** 405–412.

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

Rozwijając moje zainteresowanie rolą zaburzeń epigenetycznych w patogenezie nowotworów człowieka brałem udział w innych badaniach dotyczących tego zagadnienia lub pracach, w których ocena metylacji DNA była częścią większego badania.

Uczestniczyłem w pracach nad znaczeniem zmian w poziomie modyfikacji białek histonowych: acetylacji i metylacji histonu H3 w nowotworach jelita grubego. Badania prowadzone były przez zespół Prof. Jerzego Ostrowskiego z Zakładu Genetyki Centrum Onkologii -Instytutu w Warszawie. Wynikiem tej współpracy były dwie publikacje:

Maryan N, Statkiewicz M, Mikula M, Goryca K, Paziewska A, Strzałkowska A, Dąbrowska M, **Bujko M**, Ostrowski J; 2015; Regulation of the expression of claudin 23 by the enhancer of zeste 2 polycomb group protein in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):728-36.

Karczmarski J, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, **Bujko M**, Kober P, Dadlez M, Ostrowski J; 2014; Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clin Proteomics*. 2014 Jun 3;11(1):24

Wziąłem udział w realizacji projektu badawczego Nr N N402 454739 "Oddziaływania między regulatorowymi limfocytami T a komórkami chłoniaków z komórek B. Nowe możliwości terapii adoptywnej i immunomodulującej", którym odpowiadałem za oznaczenia poziomu metylacji DNA genie *FOXP3*. Niska metylacja *FOXP3* stanowi jeden z markerów regulatorowych limfocytów T. W projekcie tym status tego markera monitorowany był w trakcie hodowli regulatorowych limfocytów T *in vitro*. Wyniki badania opublikowane zostały w formie artykułu:

Grygorowicz MA, Biernacka M, **Bujko M**, Nowak E, Rymkiewicz G, Paszkiewicz-Kozik E, Borycka IS, Bystydziński Z, Walewski J, Markowicz S; 2016; Human regulatory T cells suppress proliferation of B lymphoma cells. *Leuk Lymphoma*. 2016 Aug;57(8):1903-20.

Brałem udział w badaniach nad oceną częstości występowania zmian w metylacji w promotorze genu *MGMT* w glejakach, mięsakiach macicy i oponiakach. Gen *MGMT* koduje białko naprawy DNA odpowiedzialne za usuwanie adduktów w DNA. Leczenie nowotworów z użyciem leków alkilujących, w tym temozolomidu polega na wprowadzaniu określonych adduktów do DNA.

W ogólnie przyjętym mechanizmie wyciszenie genu *MGMT* wynikające z hipermetylacji DNA może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie leków alkilujących. Przydatność oceny hipermetylacji *MGMT* w stratyfikacji chorych na glejaki do leczenia temozolomidem oceniana była w badaniu podsumowanym wymienionym poniżej artykułem. W piśmiennictwie opisywane były próby stosowania temozolomidu również w nowotworach innych niż glejaki, w tym m.in. w oponiakach i mięsakiach macicy. Z tego względu podejmowałem się oceny częstości występowania hipermetylacji *MGMT* w tych dwóch typach nowotworów. Wyniki dotyczące znaczenia hipermetylacji promotora *MGMT* zostały opisane w pracach:

Czeremsińska B, **Bujko M**, Ibrón G, Onap-Karnak A, Nawrocki S; 2011; Treatment results, including clinical prognostic factors and *MGMT* gene promoter methylation, in patients with glioblastoma multiforme in Warmia and Mazury Oncology Centre; *Współczesna Onkol* 2011; 15 (4): 198–202

Bujko M, Kowalewska M, Danska-Bidzińska A, Bakula-Zalewska E, Siedecki JA, Bidziński M; 2012; The promoter methylation and expression of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in uterine sarcoma and carcinosarcoma. *Oncol Lett.* 2012 Sep;4(3):551-555.

Bujko M, Kober P; 2016; Targeted Bisulfite Sequencing-Based Analysis of *MGMT* Promoter Methylation in Meningiomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(5):2727-8.

W ramach współpracy z zespołem Prof. Jolanty Kupryjańczyk prowadzącej Zakład Patologii Molekularnej w Centrum Onkologii-Instytucie w Warszawie brałem udział w badaniu znaczenia zmian metylacji DNA w obrębie genów *BRCA1* oraz *CHFR* w rakach jajnika. Wyniki publikowane zostały w artykułach:

Rzepecka IK, Szafron L, Stys A, **Bujko M**, Plisiecka-Halasa J, Madry R, Osuch B, Markowska J, Bidziński M, Kupryjańczyk J; 2012; High frequency of allelic loss at the *BRCA1* locus in ovarian cancers: clinicopathologic and molecular associations. *Cancer Genet.* 2012 Mar;205(3):94-100

Ludwig AH, **Bujko M**, Bidziński M, Kupryjańczyk J. *CHFR* gene is neither mutated nor hypermethylated in ovarian cancer. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(3):257-61

W ramach prowadzonych badań dotyczących glejaków i białaczek podejmowałem próby oceny znaczenia zmian w genach, których białkowe produkty mają udział w edytowaniu wzorów metylacji DNA. Przeprowadzone badania zostały opisane w publikacjach:

Bujko M, Kober P, Matyja E, Nauman P, Dytus-Cebulok K, Czeremsińska B, Bonicki W, Siedlecki JA; 2010; Prognostic value of *IDH1* mutations identified with PCR-RFLP assay in glioblastoma patients. *Mol Diagn Ther.* 2010 Jun 1;14(3):163-9

Musialik E, **Bujko M**, Wypych A, Matysiak M, Siedlecki JA. *TET2* Promoter DNA Methylation and Expression Analysis in Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Rep.* 2014 Mar 28;6(1):5333.

Efektom podejmowanej współpracy i realizacji własnych badań nad molekularnym podłożem chorób nowotworowych było powstanie kilku innych publikacji:

Kowalewska M, Radziszewski J, Goryca K, **Bujko M**, Oczko-Wojciechowska M, Jarzab M, Siedlecki JA, Bidzinski M; 2012; Estimation of groin recurrence risk in patients with squamous cell vulvar carcinoma by the assessment of marker gene expression in the lymph nodes. *BMC Cancer*. 2012 Jun 6;12:223

Bujko M, Kowalewska M, Zub R, Radziszewski J, Bidzinski M, Siedlecki JA; 2012 Lack of microsatellite instability in squamous cell vulvar carcinoma; *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012 Mar;91(3):391-4

Bujko M, Kober P, Mikula M, Ligaj M, Ostrowski J, Siedlecki JA; 2015; Expression changes of cell-cell adhesion-related genes in colorectal tumors. *Oncol Lett*. 2015 Jun;9(6):2463-2470

Grygorowicz MA, Borycka IS, Nowak E, Paszkiewicz-Kozik E, Rymkiewicz G, Błachnio K, Biernacka M, **Bujko M**, Walewski J, Markowicz S; 2017; Lenalidomide potentiates CD4+CD25+Treg-related suppression of lymphoma B-cell proliferation. *Clin Exp Med*. 2017 May;17(2):193-207

Obecnie, w mojej pracy naukowej dzięki zacieśnieniu współpracy z Kliniką Nowotworów Układu Nerwowego Centrum Onkologii-Instytutu w Warszawie szczególnego znaczenia nabrały badania nad chorobami neuro-onkologicznymi. Prowadzone prace koncentrują się wokół identyfikacji różnego typu zaburzeń molekularnych w oponiakach i nowotworach przysadki u dorosłych. Dużą część tych prac dotyczy zaburzeń epigenetycznych, w tym prace wchodzące w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego. W badaniach nad oponiakami i guzami przysadki podejmowałem również prace nad oceną występowania innych zmian molekularnych, a przeprowadzone badania opisane zostały w pracach:

Boresowicz J, Kober P, Rusetska N, Maksymowicz M, Goryca K, Kunicki J, Bonicki W, **Bujko M**; 2018; Telomere length and TERT abnormalities in pituitary adenomas; *Neuro Endocrinol Lett*. 2018 Mar;39(1):49-55.

Bujko M, Machnicki MM, Grecka E, Rusetska N, Matyja E, Kober P, Mandat T, Rydzanicz M, Płoski R, Krajewski R, Bonicki W, Stokłosa T, Siedlecki JA; 2017; Mutational Analysis of Recurrent Meningioma Progressing From Atypical to Rhabdoid Subtype. *World Neurosurg*. 2017 Jan; 97: 754.e1-754.e6.

Kober P, **Bujko M**, Goryca K, Maksymowicz M, Kunicki J, Bonicki W, Siedlecki JA. Ocena metylacji wybranych genów w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki – weryfikacja doniesień literaturowych *Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji*, 2017 Jun;5(1):37-44

Bujko M, Rusetska N, Mikula M; 2016; Validating candidate reference genes for qRT-PCR-based gene expression analysis in nonfunctioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2016 Feb;19(1):110-2

Bujko M, Kober P, Zbijewska J, Kunicki J, Bonicki W; 2015; Microsatellite instability analysis in pituitary adenomas. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015;36(5):511-4.

Bujko M, Kober P, Tysarowski A, Matyja E, Mandat T, Bonicki W, Siedlecki JA; 2014; EGFR, PIK3CA, KRAS and BRAF mutations in meningiomas. *Oncol Lett*. 2014 Jun;7(6):2019-2022.

Mateusz Bujko