

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Lekarski I
Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii

Dr n. med. Anna Maria Barciszewska

**Zastosowanie całkowitej metylacji DNA
do oceny diagnostyczno-terapeutycznej
w guzach nowotworowych mózgowia i innych patologiach**

AUTOREFERAT



Poznań 2019

Spis treści

1. Imię i Nazwisko habilitanta	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
2.1. Dyplomy	3
2.2. Stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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)	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	5
4.3. Omówienie celu naukowego cyklu publikacji i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	6
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	28
5.1. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego	28
5.2. Tematyka prac nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego	28
5.2.1. Analiza modyfikowanych składników DNA w guzach mózgu u człowieka	29
5.2.1.1. Analiza wielkocząsteczkowych adduktów DNA	29
5.2.1.2. Analiza metylowanej cytozyny w DNA	30
5.2.2. Zmiany specyficznej metylacji DNA wybranych genów w guzach mózgu	31
5.2.3. Ocena zmian całkowitej metylacji DNA w innych patologiach	33
5.2.3.1. Całkowita metylacja DNA w nowotworach piersi i jelita grubego	33
5.2.3.2. Zmiany całkowitej metylacji DNA w nadciśnieniu tętniczym	34
5.2.3.3. Ocena zmian metylacji DNA w procesie starzenia	34
5.2.4. Technologie RNA	35
5.2.4.1. Ekspresja mikroRNA w guzach glejowych	35
5.2.4.2. Zastosowania interferencyjnego RNA w terapii glejaków	37
5.2.5. Analiza przypadków klinicznych	38
5.2.6. Bioimpedancja w patologiach wewnątrzczaszkowych	39
5.2.7. Genetyka kliniczna	39
5.2.8. Filozoficzne aspekty biologii i medycyny	40
5.2.9. Historia biologii i medycyny	41

1. Imię i nazwisko habilitanta:

Anna Maria Barciszewska

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

2.1 Dyplomy:

- Dyplom ukończenia Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 13.06.2005
kierunek studiów: **medycyna**, tytuł zawodowy: lekarz
- Dyplom ukończenia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 14.06.2005
kierunek studiów: **chemia ogólna**, tytuł zawodowy: magister
Tytuł pracy magisterskiej:
Chemiczne markery procesu nowotworowego
Promotor: prof. dr hab. Bohdan Skalski
- Dyplom ukończenia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 06.10.2008
kierunek studiów: **filozofia ogólna**, tytuł zawodowy: magister
Tytuł pracy magisterskiej:
O tym, co czyni człowieka człowiekiem. Aspekty biologiczne i kulturowe.
Promotor: prof. dr hab. Roman Kubicki
- Dyplom **specjalisty w dziedzinie neurochirurgii**, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, 22.11.2013
- Certyfikat European Examination in Neurosurgery: Part I, 1.10.2016

2.2. Stopnie naukowe:

- **Doktor nauk medycznych** (dyscyplina: medycyna, specjalność: neurochirurgia)
- stopień nadany uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z dnia 9 marca 2011
Tytuł rozprawy doktorskiej:
Analiza składników DNA guzów nowotworowych mózgu u człowieka
Promotor: prof. dr hab. med. Stanisław Nowak
Recenzenci: prof. dr hab. med. Włodzimierz Baranowski
prof. dr hab. Krzysztof Szyfter

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2005 – 22.11.2009

studium doktoranckie

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

01.10.2008 – 30.11.2013

Młodszy asystent

Oddział Kliniczny Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego, Poznań

23.11.2009 – 30.09.2013

Asystent

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

01.10.2013 - nadal

Adiunkt

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

01.12.2013 – nadal

Starszy asystent

Oddział Kliniczny Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego, Poznań

13.06.2014 - nadal

Kierownik

Pracownia Obrazowania Śródoperacyjnego, Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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)

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą wniosku habilitacyjnego, zostało udokumentowane powiązaniem tematycznie cyklem 3 oryginalnych publikacji naukowych o łącznym wskaźniku **Impact Factor 9.190** i wartości punktów **MNiSW (lista A) 100**.

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie całkowitej metylacji DNA do oceny diagnostyczno-terapeutycznej w guzach nowotworowych mózgowia i innych patologiach

4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Praca H1. **Barciszewska AM**, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ.

The degree of global DNA hypomethylation in peripheral blood correlates with that in matched tumor tissues in several neoplasia.

PLoS One. 2014 Mar 20;9(3):e92599.

IF 3.234, punktacja MNiSW (lista A) 40, liczba cytowań: 8

Praca H2. **Barciszewska AM**.

Global DNA demethylation as an epigenetic marker of human brain metastases.

Biosci Rep. 2018 Sep 25. pii: BSR20180731.

IF 2.899, punktacja MNiSW (lista A) 20, liczba cytowań: 0

Praca H3. **Barciszewska AM**, Gurda D, Głodowicz P, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ.

A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells.

PLoS One. 2015 Aug 26;10(8):e0136669.

IF 3.057, punktacja MNiSW (lista A) 40, liczba cytowań: 14

Wchodzące w skład cyklu publikacji prace powstały po uzyskaniu tytułu doktora nauk medycznych.

4.3 Omówienie celu naukowego cyklu prac i osiągniętych wyników wraz z oceną ich ewentualnego wykorzystania.

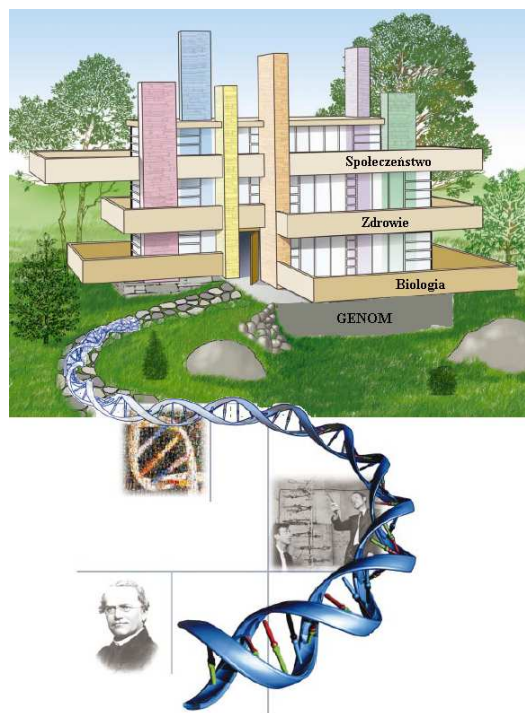
Wprowadzenie

Strategicznym celem moich badań, które doprowadziły do zdefiniowania habilitacyjnego osiągnięcia naukowego, jego opracowania oraz praktycznego wykorzystania, jest poznanie i zrozumienie mechanizmów molekularnych patogenezy guzów mózgu, a także innych patologii, u człowieka. Przeprowadzone w ciągu ostatnich lat szerokie badania genetyczne z wykorzystaniem metod biologii molekularnej i komórkowej pozwoliły na zgromadzenie kluczowych informacji o procesie karcynogenezy nowotworów ośrodkowego układu nerwowego [Woehrer et al. 2014]. Część z nich wykorzystano m.in. do opracowania nowej klasyfikacji guzów mózgu [Louis et al. 2016].

Zróznicowana ekspresja niektórych genów (np. czynników wzrostu i ich receptorów) pozwala na określenie stopnia złośliwości tych nowotworów oraz ich wykorzystanie prognostyczne [Müller et al. 2016, Lee et al. 2017]. Informacje te, chociaż ważne dla biologii molekularnej mózgu i użyteczne w praktyce klinicznej, mają ograniczony potencjał diagnostyczny i terapeutyczny ze względu na nieswoistość niektórych znaczników (markerów) [Cihoric et al. 2017].

Kamieniem milowym na drodze do zrozumienia patogenezy guzów mózgu, a także innych nowotworów, była realizacja projektu genomu człowieka oraz poznanie jego pierwszorzędowej struktury (sekwencji nukleotydowej) [Abascal et al. 2018]. Fakt ten rozbudził olbrzymie nadzieje na szybkie wykorzystanie wiedzy o genomie człowieka w medycynie, a w medycynie spersonalizowanej w szczególności. Ponadto genom człowieka stał się również podstawą innych ludzkich aktywności (Ryc. 1).

Poznanie sekwencji ludzkiego genomu uwidoczniało szereg nowych faktów, które zmuszają badaczy do głębokiej refleksji i podejmowania nowych badań wszelkich patologii człowieka. Szacuje się, że tylko 2% ludzkiego genomu jest odpowiedzialne za kodowanie białek, natomiast 98% genomu to część nie kodująca białek [Lander et al. 2001, Frith et al. 2005].

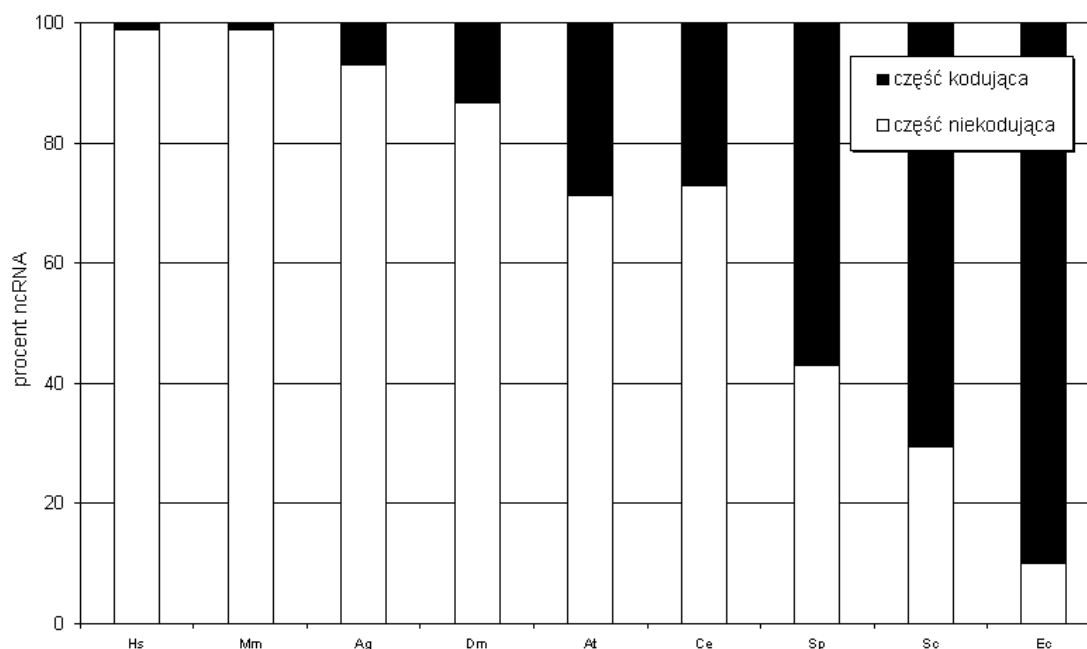


Rycina 1. Schematyczne przedstawienie połączenia poprzez podwójną helisę DNA początków genetyki (Georg Mendel) i biologii molekularnej (Francis Crick, James Watson) oraz sekwencji genomu człowieka, będącej podstawą obecnego postrzegania biologii człowieka, jego zdrowia oraz wpływu na społeczeństwo [Barciszewska 2009].

Pokazano, że genom człowieka, mimo że kodujący tyle samo genów białkowych (ok. 20000) co chwast (*Arabidopsis thaliana*) czy owad (*Drosophila melanogaster*), musi posiadać niezwykle precyzyjne i bardzo złożone mechanizmy kontroli ich ekspresji znajdujące się w niekodującej (białek) części genomu (Ryc. 2) [Abascal et al. 2018]. Ta ważna informacja regulatorowa (kontrolna) ma charakter epigenetyczny i jest zapisana ponad (obok) sekwencją nukleotydów kodujących białka.

Wobec takiej dysproporcji rozmieszczenia informacji genetycznej, w części kodującej białka i nie ulegającej translacji, wydaje się być konieczne i uzasadnione, aby obok zmian genetycznych w definiowaniu podłoża molekularnego wszelkich patologii uwzględniać również procesy epigenetyczne. Ten głęboki problem naukowy stał się również tematem medialnym, którego przykładem jest tytuł prasowy: „DNA is not our destiny; it’s just a very useful tool” z *The Guardian* (05.04.2018) oraz książka Stevena Heinego: „DNA Is Not Destiny: The Remarkable, Completely Misunderstood Relationship between You and Your Genes” (data wydania: 18.04.2017). Zatem ważna jest więc nie tylko sekwencja nukleotydów w DNA (czynnik genetyczny), ale również jej modyfikacja (ornamentacja), którą stanowi metylacja cytozyny DNA. Metylowana cytozyna w DNA stanowi element regulatorowy, kontrolujący

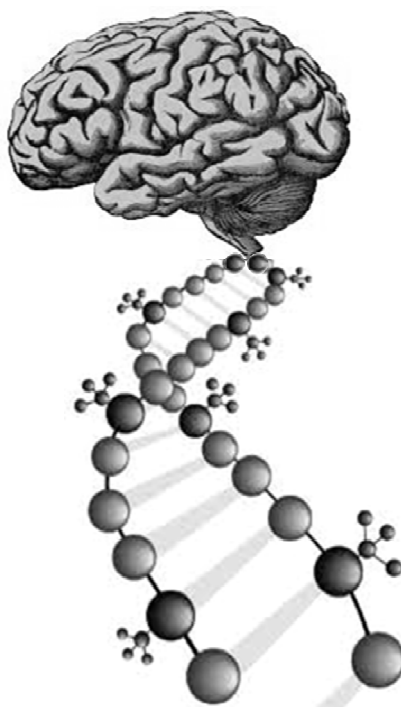
ekspresję genów oraz proces rozwoju i patologii organizmu. Zatem modyfikacja (metylacja) DNA, a także białek histonowych (m.in. metylacja i acetylacja chromatyny) wraz z niekodującym RNA stanowią nowy obszar wiedzy, który nazywa się **epigenetyką** [Bird 2002].



Rycina 2. Schematyczne porównanie wielkości (%) części kodującej (czarne słupki) i niekodującej (białe słupki) genomów Eukariota: Hs – *Homo sapiens*, Mm – *Mus musculus*, Ag – *Anopheles gambiae*, Dm – *Drosophila melanogaster*, At – *Arabidopsis thaliana*, Ce – *Caenorhabditis elegans*, Sp – *Schizosaccharomyces pombe*, Sc – *Sacharomyces cerevisiae*, Ec – *Encephalitozoon cuniculi* [Barciszewska & Barciszewski 2009].

Badania epigenetyczne opisują i wyjaśniają prawidłowy rozwój organizmu, a także etiologię złożonych chorób [Malzkorn et al. 2011, Armstrong et al. 2014]. Ten nowy kierunek badawczy oferuje mechanistyczny pomost między czynnikami genetycznymi i środowiskowymi działającymi na żywą komórkę. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów jest dynamicznym, reagującym i odwracalnym procesem, który konstytuuje homeostazę komórki [Day et al. 2013].

Właśnie epigenetyka jest obszarem wiedzy, gdzie lokuje się moja aktywność badawcza i osiągnięcie habilitacyjne dotyczące **całkowitej metylacji DNA**, przy pomocy którego chcę dotrzeć do mózgu, poznawać, zrozumieć, diagnozować oraz leczyć jego patologie. Ten obszar moich działań nazywam epigenetyką mózgu, której znak graficzny (logo), pokazujący metylowany DNA, widoczny jest na Ryc. 3.



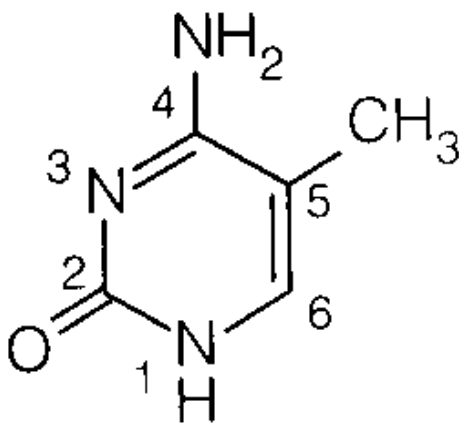
Rycina 3. Epigenetyka mózgu. Podwójna helisa DNA z widocznymi grupami metylowymi stanowi klucz do zrozumienia biologii molekularnej mózgu człowieka oraz stworzenia podstaw medycyny translacyjnej.

Metylacja DNA jest jednym z głównych elementów szerokiego programu epigenetycznego komórki eukariotycznej. Pod tym terminem rozumiemy 5-metylocytozynę (m^5C) (Ryc. 4), ale już nie inne metylowane składniki DNA, takie jak N4-metylocytozyna, N3-metylocytozyna czy N6-metyloadenozyna. W autoreferacie oraz w publikacjach używam dla uproszczenia nazwy zasady heterocyklicznej DNA, 5-metylocytozyny, chociaż w istocie analizowany jest nukleotyd tej zasady, 5-monofosforan cytydyny.

5-metylocytozyna jest znana od 1948 roku, ale jej nadrzędne, regulacyjne znaczenie ujawniło się szczególnie dopiero po poznaniu sekwencji ludzkiego genomu [Landner et al. 2001]. m^5C powstaje w reakcji przyłączenia grupy metylowej do węgla C5 cytozyny [Guz et al. 2010, Horvath 2013]. Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM) w reakcji katalizowanej przez DNA metylotransferazy (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) [Lokk et al. 2014].

Odrębność i swoistość m^5C jako znacznika epigenetycznego polega na tym, że grupa metylowa związana jest z pierścieniem heterocyklicznym cytozyny stabilnym wiązaniem kowalencyjnym węgiel-węgiel (C-C) (Ryc. 4), w odróżnieniu od innych modyfikacji, w których występuje o wiele słabsze wiązanie węgiel-azot (C-N) lub węgiel-tlen (C-O). Ze względu na dużą trwałość wiązania C-C w m^5C i brak swoistych enzymów demetylujących, proces

usuwania grupy metylowej (demetylacji) odbywa się poprzez utlenianie enzymatyczne z udziałem enzymów TET (ang. Ten-Eleven Translocation), lub poprzez spontaniczne utlenianie działaniem reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) [Shen et al. 2014]. Obecność grupy hydrofobowej w m⁵C w sekwencji nukleotydowej wpływa na zmianę właściwości DNA i modulację jego oddziaływań z białkami. Zmiana poziomu metylacji DNA (obniżenie – hipometylacja, lub podwyższenie – hipermetylacja) ma istotne znaczenie w inicjowaniu procesów patologicznych u ludzi zwiększając lub hamując ekspresję swoistych genów białkowych [Gu et al. 2010]. Zatem odpowiedni poziom znacznika epigenetycznego, m⁵C, w odpowiednim czasie i odpowiednim locus decyduje o rozwoju i zróżnicowaniu danej komórki [Bird 2002].



Rycina 4. Wzór chemiczny 5-metylocytozyny z oznaczeniem kolejnych atomów węgla i azotu tworzących pierścień pirymidynowy. Podstawnik metylowy przy węglu C-5 przyłączony jest wiązaniem węgiel-węgiel.

Profil zawartości m⁵C w DNA nie jest stały i ulega dynamicznym zmianom, które są indukowane przez czynniki środowiskowe i endogenne [Day et al. 2013]. Podczas kancerogenezy, genom ulega jednocześnie ogólnej hypometylacji, jak i regionalnej hipermetylacji [Wang et al. 2017]. Konsekwencją tego może być wyciszenie genów supresorowych, utrata mechanizmów naprawy, aktywacja onkogenów, wzrost częstotliwości mutacji punktowych w obrębie zmetylowanych dinukleotydów CpG i niestabilność mikrosatelitarnego DNA [Day et al. 2013, Lokk et al. 2014]. Zaburzenia metylacji związane są z występowaniem różnych zmian patologicznych i mogą zostać wykorzystane w profilaktyce, diagnostyce i terapii [Armstrong et al. 2014].

Te obserwacje natychmiast wskazują na celowość, a nawet konieczność, badania zmian zawartości m^5C w DNA w procesie nowotworzenia. Można zatem analizować poziom całkowitej metylacji genomu i lokalnej metylacji niektórych genów oraz ich wpływ na powstawanie i zaawansowanie choroby nowotworowej [Mazor et al. 2015]. Oba procesy są ważne i mogą być tematem badawczym oraz stanowić podstawę do diagnostyki i terapii. Zatem globalna demetylacja oraz specyficzna metylacja wybranych genów były obszarami moich badań. Prowadziłam ocenę lokalnych zmian metylacji wybranych genów oraz ich potencjał diagnostyczny i prognostyczny w nowotworach mózgu. Wyniki tych badań oraz wpływ metylacji na aktywację wybranych genów zostały omówione w pracach, których jestem współautorem [Majchrzak-Celińska et al. 2013, 2015a, 2015b, 2016]. Publikacje te są komplementarne i stanowią naturalne rozszerzenie oraz potwierdzenie moich prac dotyczących oceny całkowitej metylacji DNA przedstawionych jako habilitacyjne osiągnięcie naukowe.

Do bezpośredniej analizy całkowitej zawartości m^5C w DNA może być wykorzystywana wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Separację deoksyrybonukleotydów, w tym m^5C , otrzymanych w wyniku enzymatycznej hydrolizy DNA, uzyskuje się na kolumnach chromatograficznych. Inną metodą analizy zawartości 5-metylocytozyn w hydrolizatach DNA jest wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE). Czułość obydwu metod można zwiększyć przez ich sprzężenie ze spektrometrią mas [Bock et al. 2010]. Warunkiem zastosowania tych technik jest dostępność dużych (preparatywnych) ilości wysokiej jakości genomowego DNA, co nie zawsze jest możliwe (Tab. 1).

Tabela 1. Zestawienie metod globalnej oceny metylacji DNA i ilości DNA niezbędnej do wykonania danej analizy [Soozangar et al. 2018].

Metoda	Potrzebna ilość DNA (μg)
Immunodetekcja z wykorzystaniem swoistych przeciwciał	1–200
Spektrometria mas	10–100
HPLC z detekcją elektrochemiczną lub fluorescencyjną	1–100
^{32}P -postalabeling (znakowanie następcze)	1–10

Do szybkiej analizy metylacji DNA stosuje się również mikromacierze. W mikromacierzach przeznaczonych do analizy metylomu dla każdego dinukleotydu CpG

tworzone są dwie sondy oligonukleotydowe – jedna specyficzna dla sekwencji zmetylowanej, druga – niezmetrylowanej. Analizowany materiał po wyznakowaniu znacznikiem fluorescencyjnym hybryduje z sondami oligonukleotydowymi. Analizowany stopień metylacji CpG oceniany jest jako stosunek sygnałów fluorescencyjnych pochodzących od zmetylowanych cytozyn, do sumy sygnałów cytozyn zmetylowanych i niezmetrylowanych po amplifikacji techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i hybrydyzacji do tzw. macierzy koralikowej (ang. bead array). Waha się on w granicach od 0 (brak metylacji) do 1 (pełna metylacja) [Majchrzak et al. 2009, Bock et al. 2010, Morris & Beck 2015].

Dostępne są również metody oparte na sekwencjonowaniu następnej generacji (ang. next generation sequencing, NGS). Wykorzystują one modyfikację DNA poprzez konwersję cytozyny pod wpływem wodorosiarczanu sodu, trawienie DNA enzymem restrykcyjnym, immunoprecypitację 5-metylocytozyny, albo wiązanie grup metylowych przez białka MSDK (ang. Methylation-Specific Digital Karyotyping). Inne podejście, jak MSAP-Seq (ang. Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing), oparta jest na bezpośrednim sekwencjonowaniu metodami nowej generacji (NGS) produktów amplifikacji fragmentów uzyskanych po hydrolizie metylo-zależnymi enzymami restrykcyjnymi. Zautomatyzowana analiza uzyskanych danych pozwala na globalną identyfikację bardzo dużej ilości sekwencji, które podlegają zmianom w metylacji DNA, a także ilościową ocenę poziomu tych zmian. Możliwe jest zastosowanie także paneli celowanych, takich jak Methyl-Seq, określających stopień metylacji DNA w wybranych sekwencjach genomu o udowodnionym wpływie metylacji na regulację ekspresji genu. W celu określenia poziomu metylacji DNA w obrębie całego genomu możliwe jest przeprowadzenie analizy WGBS (ang. Whole-Genome Bisulfite Sequencing), co pozwala na precyzyjne wygenerowanie metylomu i przeprowadzenie analizy w skali genomowej [Yong et al. 2016]. Technika NGS daje większe możliwości w przypadku badania transkryptomu ze względu na większą czułość, co umożliwia wykrycie istotnych różnic w poziomie ekspresji wszystkich genów. Ponadto, ułatwia znalezienie nowych wariantów transkrypcyjnych, ponieważ nie ogranicza się jedynie do sekwencji określonych sond. Metody macierzowe charakteryzują się niższymi kosztami oraz łatwiejszą analizą wyników [Shen & Waterland 2007]. Oba podejścia, stosowane głównie w laboratoriach badawczych, są również, chociaż rzadko, wykorzystane w praktyce klinicznej.

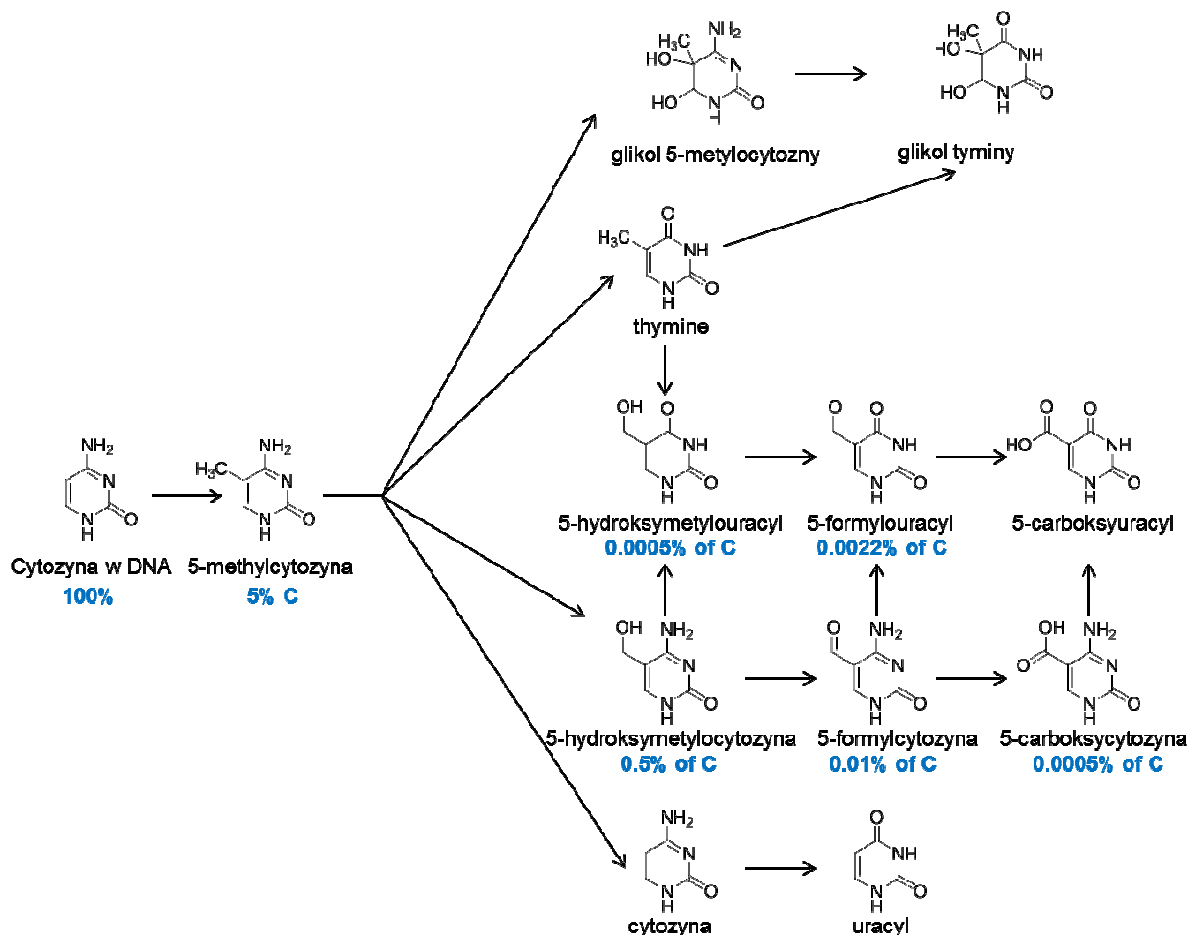
Dostępna jest olbrzymia ilość informacji wskazujących, że większość patologii u człowieka ma bezpośredni związek z modyfikacjami materiału genetycznego wywołanymi działaniem ROS [Matschke et al. 2019]. Takiej modyfikacji mogą ulegać wszystkie składniki DNA, w tym również m⁵C (Ryc. 5). Jest to niezwykle ważne, ponieważ m⁵C nie tylko tworzy parę zasad typu Watsona-Cricka z guanozyną, ale ze względu na swoje właściwości jest jednym z najważniejszych regulatorów epigenetycznej kontroli ekspresji genów [Bohr 2002, Bird 2002].

Bezpośrednie metody pomiaru ROS w materiale biologicznym byłyby trudne do zastosowania w praktyce klinicznej. Bardziej praktyczne i informatywne jest określanie zawartości produktów reakcji składników komórki z ROS, w szczególności z •OH, najbardziej reaktywnym rodnikiem tlenowym [Madugundu et al. 2014]. W moich badaniach do oceny stopnia uszkodzenia DNA używałam obniżenia poziomu 5-metylocytozyny, głównego znacznika epigenetycznego, który w reakcji utleniania, również z •OH, tworzy głównie 5-hydroksymetylocytozynę, furfurylocytozynę i karboksycytozynę, oraz inne pochodne (Ryc. 5).

Zróżnicowana zawartość modyfikowanych pochodnych cytozyny tworzy trudny problem ich ilościowej identyfikacji (Ryc. 5). W przypadku guzów mózgu dostępność analizowanej tkanki jest ograniczona, a więc bezpośrednia identyfikacja tych pochodnych jest bardzo złożona. Do rozpoznania tego problemu wykorzystałam własne przygotowanie chemiczne i zastosowałam jedną z metod analizy składników kwasów nukleinowych [Grosjean et al. 2007], sprawdzoną wcześniej (punkt 5.2.1.2). Jest to technika oparta o bezpośrednią ewaluację analizowanego związku w relacji z innymi składnikami DNA i dająca wynik procentowy, który łatwo skorelować z określoną patologią. Nie jest konieczne drogie wyposażenie i stosowanie metod sztucznej inteligencji (ang. Artificial Intelligence, AI).

Metoda oznaczania całkowitej zawartości m⁵C w DNA, którą zastosowałam w swoich badaniach, polega na enzymatycznej hydrolizie DNA, następczym znaczeniu radioaktywnym fosforem [γ ³²P] (³²P–postlabeling) nukleotydów oraz ich rozdziale chromatograficznym na cienkiej warstwie celulozy (ang. thin layer chromatography, TLC). Jest ona użyteczna do analizy niewielkich ilości materiału biologicznego dostępnych w praktyce klinicznej (jak próbki krwi obwodowej i fragmenty guzów mózgu). Jest to duża zaleta w porównaniu z metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, która wymaga drogiego sprzętu i znacznych ilości DNA. Znaczenie następcze jest klasyczną techniką wykorzystywaną w badaniach kwasów nukleinowych oraz bardzo informatywną, gdyż pozwala ocenić czystość i

jakość preparatu DNA oraz obecności domieszek RNA. Stosując to podejście wykazałam bezpośredni związek pomiędzy poziomem metylacji genomowej i nowotworami mózgu, a także innych narządów. Metoda ta pokazuje, że na podstawie zawartości m^5C można różnicować guzy mózgu oraz inne patologie (prace H1-H3).



Rycina 5. Produkty reakcji demetylacji 5-metylocytozyny (m^5C). Oprócz wielu modyfikowanych pochodnych cytozyny powstają również tymina i cytozyna, główne składniki DNA [opracowanie własne].

Jak wspomniałam wcześniej, poza metylacją DNA, do mechanizmów epigenetycznych zaliczamy również modyfikacje histonów [Sawan & Herzeg 2010] oraz działanie niekodujących RNA (ncRNA), w tym microRNA (miRNA) [Catalanotto et al. 2016]. Ocena możliwości wykorzystania miRNA w diagnostyce nowotworów mózgu wchodzi również w zakres moich zainteresowań badawczych. W pracach nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, których jestem autorem lub współautorem, zostały omówione miRNA, które mogą być znacznikami glejaków [Piwecka et al. 2015, Barciszewska 2016] (punkt 5.2.4.1).

Przedstawiona metoda oceny globalnej metylacji DNA odpowiada całkowicie filozofii **BBB** (ang. from Bed to Bench and Bed again), czyli analizie danych i materiałów klinicznych oraz ich ewaluacji w laboratorium badawczym, celem uzyskania nowych jakości, możliwych do zastosowania w praktyce klinicznej, jak również stanowi wkład w rozwój neurochirurgii molekularnej. Metoda ta ma szereg zalet, jest: prosta, tania, nie wymaga wysoce specjalistycznej aparatury, może być wprowadzona natychmiast do diagnostyki klinicznej, a także wykorzystana w innych obszarach, jak weterynaria i rolnictwo.

Cele badawcze

Przedstawiony przeze mnie jako habilitacyjne osiągnięcie naukowe cykl 3 publikacji, które pokazują:

- a) wykorzystanie oceny ilościowej 5-metylocytozyny w DNA do charakterystyki guzów mózgu i innych nowotworów,
- b) ocenę całkowitej metylacji DNA zarówno w aspekcie lokalnym (tkanka guza), jak i na poziomie organizmu (krew obwodowa),
- c) przeniesienie oceny patologii na poziom epigenetyczny,
- d) ocenę efektów leczenia guzów mózgu poprzez monitorowanie zawartości m⁵C.

Omówienie cyklu prac

Praca H1.

Barciszewska AM, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ.

The degree of global DNA hypomethylation in peripheral blood correlates with that in matched tumor tissues in several neoplasia.

PLoS One. 2014 Mar 20;9(3):e92599.

IF 3.234, punktacja MNiSW (lista A) 40, liczba cytowań: 8

Guzy mózgu są szczególnym typem nowotworów ze względu na swoją lokalizację. Najczęstsze typy tych nowotworów, ze względu na swój charakter wzrostu (szybki – przerzuty, i naciekający otoczenie – wysokozłośliwe glejaki, lub bardzo wolny – oponiaki) objawiają się najczęściej w stadium zaawansowanym, znacznie ograniczającym lub wręcz uniemożliwiającym ich efektywne leczenie [Woehrer et al. 2014]. Na podstawie aktualnej wiedzy patologicznej i cech molekularnych nie jest łatwo przewidzieć zachowanie nowotworu, wdrożyć zindywidualizowaną terapię lub przeprowadzić diagnostykę na poziomie subklinicznym. Do oceny obecności, postępów leczenia i ew. nawrotów nowotworów mózgowia używa się powszechnie metod radiologicznych – tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego. Badania te posiadają jednak swoje ograniczenia w zakresie charakterystyki wykrywanych patologii, jak i wysokich kosztów, narażenia pacjenta na działanie środków kontrastujących i promieniowania jonizującego, a także w zakresie dostępności, zasadniczo limitując ich wykorzystanie. Ponadto do oceny histopatologicznej, jak również stopnia złośliwości nowotworu, ew. markerów molekularnych, konieczne jest uzyskanie fragmentu guza, drogą biopsji lub resekcji.

Dlatego konieczne jest lepsze zrozumienie mechanizmów patogenetycznych, aby zapewnić platformę do badań klinicznych. Skuteczne leczenie każdej patologii, w tym nowotworowej, wymaga szybkiego i precyzyjnego rozpoznania, najlepiej na jak najwcześniejszym etapie choroby. Stąd pojawia się konieczność poszukiwania nowych biomarkerów, które pozwolą na diagnozę, a także na monitorowanie procesu leczenia. Również materiał biologiczny, w którym można ocenić obecność markera, powinien być stosunkowo łatwo dostępny, dla zapewnienia powtarzalności badania. Oprócz tkanki

nowotworowej jest to krew obwodowa (pełna, niekoniecznie z wyodrębnionym cfDNA [ang. circulating free DNA]) [Qin et al. 2016, Volik et al. 2016].

W obecnej pracy badania skupiły się na ocenie korelacji całkowitej metylacji DNA wyizolowanego z guzów mózgu i z krwi obwodowej u pacjentów z nowotworami mózgowia. W omawianym artykule analizowałam 183 osoby z guzem mózgu w wieku od 22 do 77 lat. Oceniałam całkowitą zawartość genomowego m^5C w ekstrahowanym DNA z tkanki nowotworowej i próbek krwi obwodowej u tych samych pacjentów. Okazało się, że zawartość m^5C w dopasowanych parach tkanki nowotworowej i próbki krwi dobrze korelują ze sobą, jak i z danymi patologicznymi. Poziom m^5C w DNA z obu próbek u tych samych pacjentów był bardzo podobny, jeśli nie identyczny (współczynnik korelacji 0.9). Ten wynik jest uderzający i nigdy nie był wcześniej obserwowany dla guzów mózgu, a także dla innych chorób. W porównaniu dla tkanki nowotworowej krew obwodowa jest bardzo pożądanym źródłem biomarkerów ze względu na jej dostępność.

Moja analiza sugeruje, że zawartość m^5C w DNA krwi obwodowej można wykorzystać bezpośrednio jako narzędzie diagnostyczne w neuroonkologii. Ponadto potwierdziłam, że poziom m^5C w DNA z guza mózgu (i krwi tego samego pacjenta) ujemnie koreluje ze stopniem złośliwości guza. Oznacza to, że rosnącej demetylacji towarzyszy wzrost stopnia złośliwości. Np. u pacjentów z gwiaździakiem włóknikowym (stopień II wg WHO) zawartość m^5C w DNA (R) wynosi około 1.5, ale już dla gwiaździaka anaplastycznego (WHO III) tylko 1, natomiast glejak wielopostaciowego (WHO IV), charakteryzuje się wartościami R poniżej 0.5. Dla porównania, ostatnio opublikowana klasyfikacja guzów ośrodkowego układu nerwowego bazuje na klasach metylacji DNA określonych przy pomocy mikromacierzy i wykorzystuje techniki sztucznej inteligencji do przyporządkowania guzów do określonych klas [Capper et al. 2018], co jest dużo bardziej złożone niż moje podejście.

Pokazanie, że całkowita metylacja DNA w próbce krwi obwodowej koreluje z metylacją w tkance nowotworowej mózgu jest faktem absolutnie **przełomowym** w neurochirurgii molekularnej. Jest to otwarcie drogi do szybkiej i **wczesnej diagnostyki** schorzenia, nawet przed pojawieniem się objawów klinicznych czy zmian w badaniach obrazowych, jak również do rozwoju badań oceniających stopień izolacji mózgowia lub nowotwory narządowe jako obraz choroby całego organizmu.

W pracy schematycznie pokazałam również wyniki własne całkowitej metylacji (R) w próbkach krwi obwodowej uzyskane przeze mnie dla guzów mózgu, raka piersi i jelita

grubego, nadciśnienia tętniczego i innych patologii oraz grup kontrolnych (Praca H1, Ryc. 6). Wyraźnie widać, że poziom całkowitej metylacji w DNA obniża się przy nawet „łagodnych” patologiach w porównaniu z grupą kontrolną oraz w zależności od wieku (grupa kontrolna).

Powszechnie wiadomo, że każda analiza i wszelkie testy powinny być oparte na natywnym materiale biologicznym. Tkanki i krew do diagnostyki molekularnej muszą być pobierane i przechowywane w dobrze zdefiniowanych i optymalnych warunkach. W omawianej pracy (Praca H1) pokazałam, jak istotny dla metylacji DNA jest sposób obróbki pobranej tkanki. Pobrany fragment niskozłośliwego guza (oponiak, WHO I) został podzielony na 3 części. Jedna została natychmiast zamrożona, druga poddana obróbce w formalinie i parafinie (ang. formalin-fixed paraffin embedded, FFPE; jest to standardowy sposób przygotowania tkanki do badań histopatologicznych), a trzecia pozostawiona na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Wyniki jednoznacznie pokazują, że im większy jest stopień ekspozycji na działanie czynników zewnętrznych (np. temperatura), tym większe obniżenie metylacji w DNA. Dla tego samego guza zamrożonego natychmiast po pobraniu poziom metylacji (R) wynosił ok. 2.0, dla tkanek FFPE nieco ponad 1.0, natomiast dla tkanek pozostawionych w temperaturze pokojowej – ok. 0.5 (Praca H1, Ryc. 4). **Dotychczas w literaturze nie przedstawiono takiej zależności.** Stąd ważny jest sposób pobierania tkanek do badań metylacji. Badane tkanki po pobraniu muszą być natychmiast zamrażane (-80°C). Wydaje się, że szeroko dostępne bloczki parafinowe mają ograniczone zastosowanie do badań metylacji DNA i RNA, chociaż mogą być wykorzystywane do innych badań cytologicznych [Shen et al. 2014].

Obserwowana demetylację DNA w tkankach nowotworowych oraz krwi obwodowej pozwala zaproponować hipotezę, że ważnym czynnikiem molekularnym w rozwoju guzów mózgu jest stres oksydacyjny manifestujący się spontanicznym utlenianiem DNA poprzez reakcję z ROS [w przygotowaniu].

Praca H2.

Barciszewska AM.

Global DNA demethylation as an epigenetic marker of human brain metastases.

Biosci Rep. 2018 Sep 25. pii: BSR20180731.

IF 2.899, punktacja MNiSW (lista A) 20, liczba cytowań: 0

Celem tej pracy było wykazanie użyteczności całkowitej metylacji DNA do rozpoznawania i klasyfikacji przerzutów nowotworowych do mózgu.

Przerzuty do mózgu są najczęstszymi guzami wewnątrzczaszkowymi u dorosłych. Zwykle pochodzą z: raka płuc i piersi, czerniaka, raka jasnokomórkowego nerki i nowotworów przewodu pokarmowego. Rokowanie w przypadku przerzutów do mózgu jest złe, a klasyczne leczenie łączące chirurgię i radioterapię powinno być silnie wspierane metodami molekularnymi. Jednak ich skuteczne zastosowanie zależy od głębokiego zrozumienia nie tylko genetycznego, ale także epigenetycznego tła choroby. Przyczyni się to do wcześniejszej i lepszej diagnozy oraz skutecznego leczenia, a także zindywidualizowanej oceny wyników klinicznych i rokowania.

W tej pracy przedstawiłam wyniki analizy całkowitej metylacji DNA (R) u 139 pacjentów operowanych z powodu guzów przerzutowych mózgowia, w wieku od 32 do 77 lat. Dla 45 pacjentów wykonano porównanie metylacji DNA we krwi obwodowej. Największą grupę pacjentów stanowili chorzy z rakiem płuca (70.5%), następnie z rakiem jelita grubego i czerniakiem skóry (po 5.7%), oraz rakiem piersi (5.0%).

Pokazałam, że zawartość 5-metylocytozyny w DNA (R) z przerzutów do mózgu zmienia się w szerokim zakresie (Praca H2, Ryc. 3), pokrywa się z poziomem we krwi (Praca H2, Ryc. 5), i koreluje ze zmniejszeniem stopnia zróżnicowania nowotworu (Praca H2, Ryc. 4). Najniższe globalne wartości metylacji DNA ($R < 0.6$) obserwowano w raku skóry, pęcherza moczowego i endometrium. Koreluje to z obserwacjami klinicznymi czerniaka, który jest guzem najłatwiej przerzutującym do mózgu. Jednak przerzuty do mózgu z raka endometrium, najczęstszego nowotworu ginekologicznego, występują rzadko, a ich obecność u tych pacjentek oznacza bardzo złe rokowanie. Dlatego możemy przypuszczać, że przerzuty do mózgu występują w najbardziej złośliwych z tych guzów, co znajduje odzwierciedlenie w głębokiej demetylacji DNA. Zaobserwowałam też stosunkowo wysoką metylację DNA w grupie przerzutów z raka jajnika (> 1.0). Ten nowotwór jest zwykle wykrywany w zaawansowanym stadium i ma stosunkowo złe rokowanie, ale przerzuty do mózgu są rzadkie. Rak jajnika przerzutuje na wczesnym etapie rozwoju, często zanim zostanie zdiagnozowany, co koreluje z wysokim stopniem całkowitej metylacji DNA.

Największą analizowaną przeze mnie podgrupą byli pacjenci z przerzutami z raka płuca. Dla tej grupy wykazałam, że stopień demetylacji DNA koreluje ze zmniejszeniem stopnia zróżnicowania nowotworu. Dobrze zróżnicowane guzy (G1) wykazują wyższą

zawartość m⁵C w DNA niż słabo zróżnicowane (G3). Ta obserwacja koreluje z wcześniejszą, pokazaną dla guzów pierwotnych mózgowia (Praca H1) [Zukiel et al. 2004]. Ponadto, dla analizowanej grupy guzów przerzutowych mózgowia, potwierdziłam korelację wartości R (obrazującej całkowitą metylację w DNA) dla tkanki nowotworowej i krwi obwodowej u tych samych pacjentów. Współczynnik korelacji wyniósł 0.69.

Wyniki badań zawarte w tej pracy wskazują, że genomowa metylacja DNA może stanowić użyteczną informację do wykrywania i różnicowania przerzutów w mózgu.

Praca H3.

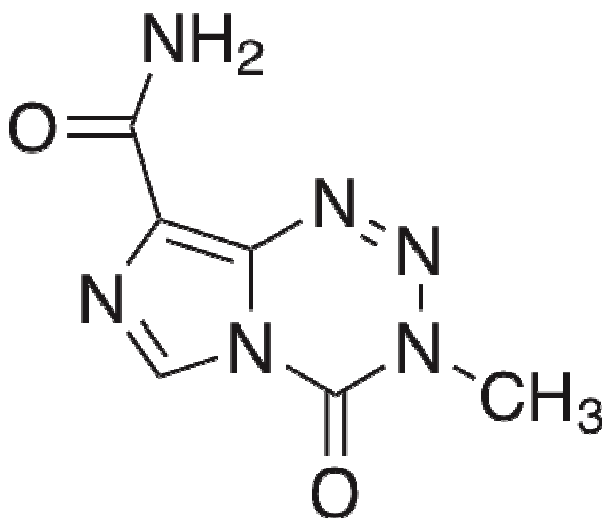
Barciszewska AM, Gurda D, Głodowicz P, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ.

A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells.

PLoS One. 2015 Aug 26;10(8):e0136669.

IF 3.057, punktacja MNiSW (lista A) 40, liczba cytowań: 14

Glejak wielopostaciowy (glioblastoma, GBM) jest najczęściej występującym i najbardziej agresywnym pierwotnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego u ludzi dorosłych. W chwili obecnej standardem postępowania w przypadku GBM jest maksymalnie doszczętna resekcja guza z następczą radioterapią i chemioterapią. Temozolomid (TMZ) jest doustnym alkilującym chemioterapeutykiem, istotnie zwiększającym stopień przeżycia pacjentów z GBM [Stupp et al. 2005] (Ryc. 6).



Rycina 6. Struktura chemiczna temozolomidu.

Jednakże, pomimo wysokiego potencjału terapeutycznego TMZ, ciągle obserwuje się progresję i nawroty choroby. Leki alkilujące niszczą DNA poprzez tworzenie pochodnych metylowych zasad kwasów nukleinowych [Fisher et al. 2007]. TMZ reaguje z DNA dając wśród produktów około 70% N7-metylowanej guaniny (m^7G) i 9% N3-metylowanej adeniny (m^3A). Tak zmodyfikowane składniki DNA mogą ulegać naprawie w mechanizmie wycinania zasad (ang. base-excision repair, BER). Bardzo interesującym faktem jest, że O6-metyloguanozyna (O^6mG), uważana za główny mechanizm działania leku, stanowi jedynie 5% produktów reakcji TMZ z DNA. Ochronne działanie O6-metyloguanozyno-metylotransferazy (MGMT) w komórkach nowotworowych jest bezpośrednią przyczyną oporności na TMZ. MGMT szybko usuwa modyfikację (demetylacja) w pozycji O6 guanozyny i zmniejsza efekt cytotoksyczny leku [Hegi et al. 2005]. Celem moich badań nie było oznaczanie ilościowe O6 guanozyny w DNA po działaniu TMZ, ale analiza wpływu TMZ na komórkę (stres oksydacyjny) poprzez analizę zawartości m^5C , głównego markera epigenetycznego. TMZ indukuje stres komórkowy i nadprodukcję ROS, które reagując z DNA modyfikują jego składniki, w tym m^5C . Poziom uszkodzenia DNA, obrazowany przez zmianę całkowitej metylacji DNA, jest zależny od czasu działania i stężenia podanego leku. Osiągając określony stopień uszkodzenia DNA, wyrażony zmniejszeniem globalnej metylacji w DNA, komórki GBM ulegają apoptozie.

Badania wykonałam na liniach komórkowych (linie ludzkich glejaków: U138MG, U118MG, T98G, linia ludzka raka szyjki macicy: HeLa, linia szczurza glejaka: C6) traktowanych różnymi stężeniami TMZ (100, 250, 500 and 1000 μM) w różnych okresach czasu (3, 12, 24 i 48 h). Przy wzrastających stężeniach TMZ indukował istotne zwiększenie zawartości m^5C w DNA w krótkim czasie ekspozycji (do 24h), ale w dawce najwyższej (1000 μM) we wszystkich przedziałach czasowych obserwowano istotną hipometylację. Hipometylacja była obserwowana w całym zakresie niższych stężeń TMZ w dłuższym okresie czasu (48 h) (Praca H3, Ryc. 4). Zauważyłam również zwiększenie udziału komórek w fazie G2/M (prowadzącej do apoptozy) przy dłuższej ekspozycji i wyższym zakresie stężeń TMZ (Praca H3, Ryc. 5).

Unikalną nowością pokazaną w niniejszej pracy, jest **epigenetyczny mechanizm** działania **TMZ** poprzez wpływ na zmiany poziomu całkowitej metylacji DNA. Przy globalnych zmianach metylacji może nastąpić wzrost jej poziomu, który wskazuje na aktywację DNA metylotransferazy, oraz wyciszenie różnych zmetylowanych genów. Jest wielce prawdopodobne, że obserwowane obniżenie poziomu m^5C powoduje, że geny supresorowe,

dotychczas zmetylowane i nieaktywne, ulegają ekspresji, co powoduje pozytywną odpowiedź na leczenie. Wyniki tych badań sugerują rozważenie modyfikacji dotychczas prowadzonej terapii.

Najważniejsze, pionierskie wnioski wynikające z cyklu prac, które poza moimi pracami nie zostały przedstawione w literaturze światowej, przedstawiają się następująco:

1. Stopień całkowitej metylacji (m^5C) DNA jest odwrotnie proporcjonalny do stopnia złośliwości lub zróżnicowania nowotworów mózgu.
2. Całkowita metylacja DNA w tkance nowotworowej koreluje z metylacją DNA w próbkach krwi obwodowej u tego samego pacjenta.
3. Poziom całkowitej metylacji DNA klasyfikuje stopień zaawansowania danej patologii.
4. Całkowita metylacja DNA jest dobrym **wskaźnikiem jakości** materiału genetycznego do badań molekularnych.
5. Metoda oceny całkowitej metylacji w DNA jest **szybka, prosta, powtarzalna, dostępna**, możliwa do implementacji, ma dużą wartość informacyjną i dobry bilans ekonomiczny.
6. Główne działanie terapeutyczne **temozolomidu** odbywa się na poziomie **epigenetycznym**, poprzez zmianę poziomu m^5C w DNA w zależności od dawki leku i czasu ekspozycji.
7. Wyniki uzyskane w trakcie analizy całkowitej metylacji DNA znajdują potwierdzenie w badaniach specyficznej metylacji wybranych genów (punkt 5.2.2).

Możliwości wykorzystania osiągniętych wyników:

1. Zastosowanie analizy całkowitej metylacji w DNA z krwi obwodowej do **wczesnego i nieinwazyjnego** diagnozowania guzów mózgu oraz monitorowania procesu leczenia.
2. Ocena skuteczności prowadzonej terapii na poziomie **epigenetycznym**.
3. Nowa **klasyfikacja** nowotworów ośrodkowego układu nerwowego uwzględniająca poziom całkowitej metylacji w DNA.
4. Monitorowanie **jakości** próbek DNA dla badań molekularnych.

Podsumowanie i perspektywy

Całkowity poziom m^5C w DNA ma duży potencjał informacyjny i może mieć szerokie zastosowanie kliniczne. Moja metoda pozwala ocenić stopień uszkodzenia DNA w sposób **globalny i całościowy**. Prezentowany projekt jest **nowatorski** w zakresie światowym, odnosząc dane kliniczne do zawartości m^5C i znajdując uzasadnienie na poziomie **epigenetycznym**. Wyniki prowadzonych badań przyczyniają się do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw patogenezy, jak również działania leków. Uzyskane informacje mogą być przydatne przy określaniu możliwości obecnych i kreowaniu nowych metod terapeutycznych.

Moje wyniki, prezentowane w pracach stanowiących osiągnięcie habilitacyjne oraz w innych pracach z mojego dorobku naukowego, tworzą pole do przyszłych badań w neuroonkologii molekularnej i mogą prowadzić do opracowania nowych metod diagnostycznych w praktyce klinicznej.

Bibliografia

- Abascal F, et al. Loose ends: almost one in five human genes still have unresolved coding status. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:7070-7084.
- Armstrong DA, et al. Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy: implications for children's health research. *FASEB J.* 2014;28(5):2088-2097.
- Barciszewska A-M, Barciszewski J. Epigenetyka człowieczeństwa. W: Figlerowicz M (Ed.) *Od syntezy chemicznej do biologii syntetycznej*, Poznański Ośrodek Wydawnictw Naukowych PAN 2009;33-62.
- Barciszewska AM. MicroRNAs as efficient biomarkers in high-grade gliomas. *Folia Neuropathol.* 2016;54:369-374.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6-21.
- Bock C, et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1106-1114.
- Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:804-812.
- Capper D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature.* 2018;555:469-474.
- Catalanotto C, et al. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17:pii:E1712.
- Cihoric N, et al. Current status and perspectives of interventional clinical trials for glioblastoma - analysis of ClinicalTrials.gov. *Radiat Oncol.* 2017;12:1.
- Day K, et al. Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biol.* 2013;14:R102.
- Fisher T, et al. Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme. *Cancer J.* 2007;13:335-344.
- Frith MC, et al. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:894-897.
- Grosjean H, et al. Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates. *Methods Enzymol.* 2007;425:55-101.

- Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat Methods*. 2010;7:133-136.
- Guz J, et al. Globalna hipometylacja DNA - znaczenie w procesie kancerogenezy. *Post. Biochem*. 2010;56:16-21.
- Hegi ME, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.
- Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14:R115.
- Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
- Lee JK, et al. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nat Genet*. 2017;49:594-599.
- Lokk K, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol*. 2014;15:r54.
- Louis DN, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131:803-820.
- Madugundu GS, et al. Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:7450-7460.
- Majchrzak A, et al. Epigenetic markers in diagnostics: Methods of DNA methylation analysis. *J Lab Diagn* 2009;45:167-173.
- Majchrzak-Celińska A, et al. Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet*. 2013;54:335-344.
- Majchrzak-Celińska A, et al. DNA methylation analysis of benign and atypical meningiomas: correlation between RUNX3 methylation and WHO grade. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015a;141:1593-1601.
- Majchrzak-Celińska A, et al. The methylation of a panel of genes differentiates low-grade from high-grade gliomas. *Tumour Biol*. 2015b;36:3831-3841.
- Majchrzak-Celińska A, et al. Wnt pathway antagonists, SFRP1, SFRP2, SOX17, and PPP2R2B, are methylated in gliomas and SFRP1 methylation predicts shorter survival. *J Appl Genet*. 2016;57:189-197.

- Malzkorn B, et al. Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets. *Brain Pathol.* 2011;21:619-632.
- Matschke V, et al. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen Res.* 2019;14:238-241.
- Mazar T, et al. DNA Methylation and Somatic Mutations Converge on the Cell Cycle and Define Similar Evolutionary Histories in Brain Tumors. *Cancer Cell.* 2015;28:307-317.
- Morris TJ, Beck S. Analysis pipelines and packages for Infinium HumanMethylation450 BeadChip (450k) data. *Methods.* 2015;72:3-8.
- Müller S, et al. Single-cell sequencing maps gene expression to mutational phylogenies in PDGF- and EGF-driven gliomas. *Mol Syst Biol.* 2016;12:889.
- Piwecka M, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. *Mol Oncol.* 2015;9:1324-1340.
- Qin Z, et al. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer.* 2016;35:36.
- Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:57-85.
- Shen L, et al. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:585-614.
- Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:576-581.
- Soozangar N, et al. Comparison of genome-wide analysis techniques to DNA methylation analysis in human cancer. *J Cell Physiol.* 2018;233:3968-3981.
- Stupp R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-996.
- Volik S, et al. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res.* 2016;14:898-908.
- Wang Q, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell.* 2017;32:42-56.
- Woehrer A, et al. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Curr Opin Neurol.* 2014;27:666-674.
- Yong WS, et al. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin* 2016;9:26.

- Zukiel R, et al. A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors. Mol Cancer Res. 2004;2:196-202.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Analiza bibliometryczna dorobku naukowego z wyłączeniem cyklu prac stanowiących „osiągnięcie naukowe” sporządzona w dniu 15 kwietnia 2019 roku przez Dyrektora Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu:

- Jestem autorem lub współautorem **25** publikacji pełnotekstowych (w tym 12 z IF), **3** artykułów poglądowych oraz **3** rozdziałów książkowych.
- Jestem pierwszym, drugim lub ostatnim współautorem 12 z 25 prac oryginalnych.
- Sumaryczny **Impact Factor** (IF) powyższych prac: **35.467** (punktacja **MNiSW 319**)
- Dodatkowo **1** publikacja pełnotekstowa w suplemencie czasopisma
- Całkowity **Impact Factor** razem z cyklem prac stanowiących osiągnięcie naukowe według listy Journal Citation Reports (JCR) wynosi **44.657** (punktacja **MNiSW 419**)
- Liczba **cytowań** publikacji według bazy Web of Science (All Collections): **263** (stan na dzień 27.04.2019: **266**, 243 bez autocytowań)
- **Indeks Hirscha** według bazy Web of Science: **10**
- Autor lub współautor 38 opublikowanych doniesień zjazdowych, w tym **20** na konferencjach międzynarodowych i **18** na zjazdach krajowych.

5.2 Tematyka prac badawczych nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Poza cyklem prac dotyczącym całkowitej metylacji DNA w guzach mózgu, będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy przedstawia równoległe badanie globalnej i swoistej metylacji w wybranych genach glejaków dając łącznie pełniejszy obraz epigenetyki mózgu. Ponadto badałam całkowitą metylację DNA w procesie starzenia się, w nadciśnieniu tętniczym i nowotworach pozaczaszkowych, znajdując zależność demetylacji DNA od stopnia nasilenia choroby. Poszukuję dowodów molekularnych wskazujących na mechanizm karcynogenezy. Prace te rozpoczęłam od analizy modyfikowanych nukleozydów (proste pochodne nukleotydowe, addukty) jako potencjalnych markerów nowotworzenia.

5.2.1 Analiza modyfikowanych składników DNA w guzach mózgu u człowieka

5.2.1.1 Analiza wielkocząsteczkowych adduktów DNA

Początkowym nurtem moich badań była analiza czynników modyfikujących DNA. Mogą one pochodzić z wielu źródeł endogennych (utlenianie w mitochondriach) oraz egzogennych (jak żywność czy środowisko). Reakcje tych związków (np. węglowodorów aromatycznych) z DNA prowadzą do adduktów DNA, które zaburzają ekspresję genów. Wykorzystując pierwotne zastosowanie metody znakowania następczego fosforem ^{32}P (postlabelling) posiadane tkanki z guzów mózgu przeanalizowałam na obecność nieznanych modyfikacji w DNA. Największą liczbę nowo powstałych połączeń (addukty DNA) stwierdziłam w przypadku glejaków wielopostaciowych i guzów przerzutowych (guzy wysokozłośliwe), a najmniejszą dla oponiaków (guzy w przeważającym stopniu o niskiej złośliwości). Były to głównie pochodne guaniny z podstawnikami aromatycznymi przy grupie aminokwasowej przy węglu 2. Różnorodność oraz intensywność sygnałów chromatograficznych wyraźnie koresponduje ze złośliwością guzów mózgu. Nie stwierdziłam żadnej zależności od wieku i płci pacjentów. Niewielkie różnice jakie obserwuje się w mapie adduktów DNA dla poszczególnych pacjentów z tym samym rodzajem guza może być uzależniona od osobniczo zmiennej wydolności mechanizmów detoksykacji substancji chemicznych i naprawy DNA w tkankach docelowych. Nie udało się wyselekcjonować jednego swoistego adduktu dla guzów mózgu. Wyniki tych badań zostały opublikowane w następujących pracach:

- **Barciszewska A-M**, Gawronska I, Zukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ.
The application of qualitative analysis of DNA bulky adducts in the diagnosis of brain tumours.
Polish J Chem 2003; 77, 1607-1614
IF 0.528, MNiSW 8, liczba cytowań: 0
- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Barciszewska MZ.
Aromatyczne addukty DNA w guzach mózgu.
Neuroskop 2007; 9, 62-66
MNiSW 2

5.2.1.2 Analiza metylowanej cytozyny w DNA

Guzy nowotworowe mózgowia, ich podłoże molekularne oraz opracowanie nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych są od początku mojej pracy naukowej głównym tematem moich badań. Wysoko złośliwe glejaki (ang. high grade gliomas, HGG) są najczęstszymi pierwotnymi guzami mózgu charakteryzującymi się szczególnie wysoką inwazyjnością. Szybko prowadzą do uszkodzenia mózgu manifestującego się ubytkowymi objawami neurologicznymi. Ich najbardziej złośliwą postać, jaką jest glioblastoma, charakteryzuje średni czas przeżycia chorego do kilkunastu miesięcy, co nie uległo istotnej zmianie w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat pomimo postępu technologicznego w neurochirurgii, radioterapii oraz wprowadzenia nowych chemioterapeutyków. Jest to wynik niezwyklej zdolności do samorzutnego przenikania i rozprzestrzeniania się komórek glejaka w mózgu, co czyni je wyjątkowo odpornymi na dotychczasowe metody lecznicze.

Zasadniczym celem moich wcześniejszych badań była analiza występowania modyfikowanych związków w DNA mogących zostać wykorzystane jako markery molekularne. Prowadziłam badania zawartości m^5C w DNA z ograniczonej ilości materiału biologicznego mogącej mieć zastosowanie diagnostyczne. Przeprowadziłam ewaluację całkowitego (genomowego) poziomu metylacji DNA w tkankach guzów pacjentów operowanych z powodu nowotworu mózgu. Dla niewielkich kohort pacjentów zauważyłam zależność metylacji DNA w guzach mózgu od stopnia złośliwości choroby nowotworowej. Wyniki były zachęcające do dalszych badań i zostały opublikowane w pracach wymienionych poniżej.

- Żukiel R, Nowak S, **Barciszewska A-M**, Gawrońska I, Keith G, Barciszewska MZ.
A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors.
Mol Can Res 2004; 2, 196-202
IF 4.813, MNiSW 16, liczba cytowań: 19
- Nowak S, Żukiel R, **Barciszewska A-M**, Barciszewski J.
The diagnosis and therapy of brain tumors.
Folia Neuropathologica 2005; 43, 193-196
IF 0.346, MNiSW 10, liczba cytowań: 4

- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Analiza całkowitej zawartości 5-metylocytozyny w DNA z tkanek i krwi pacjentów z guzami mózgu.
Neuroskop 2005; 7, 39-43
MNiSW 2
- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Wpływ przechowywania tkanki nowotworowej na zawartość 5-metylocytozyny w DNA guzów mózgu.
Neuroskop 2006; 8, 160-162
MNiSW 2
- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Żukiel R, Gawrońska I, Barciszewska MZ.
Swoista metylacja cytozyny w DNA jako znacznik złośliwości guzów mózgu u człowieka.
Neurol Neurochir Pol 2008; 42, 118-122
- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawronska I, Barciszewska MZ.
Diagnosis of Brain Tumors Through Global Specific DNA Methylation Analysis.
W: Erdmann VA, i inni (Eds.)
„Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors”, Springer 2009; 141-156
MNiSW 7
- **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawrońska I, Barciszewska M.
Molecular Diagnostics of Brain Tumours by Measuring the 5-Methylcytosine Level in Their DNA.
W: Abujamra A. L. (Ed.)
“Brain Tumors - Current and Emerging Therapeutic Strategies”. InTech 2011; 37-52
MNiSW 5

5.2.2 Zmiany specyficznej metylacji DNA wybranych genów w guzach mózgu

Głównym tematem tych badań była ocena procesów patologicznych (w szczególności guzów mózgu) przez pryzmat zmian epigenetycznych w postaci całkowitej metylacji DNA. Jednakże istotne jest również komplementarne spojrzenie na zmiany specyficznej metylacji konkretnych genów, które mogłyby służyć jako proste narzędzia do celowanej diagnostyki i

ewentualnie terapii. W tym zakresie współpracuję z zespołem Katedry Biochemii Farmaceutycznej UMP (Prof. dr hab. med. W. Baer-Dubowska, dr n. med. A. Majchrzak-Celińska). Do analizy DNA tkanek nowotworowych wykorzystywaliśmy metodę metylospecyficznego PCR (MS-PCR) oraz pirosekwencjonowania.

Wykazaliśmy, że zaburzona metylacja promotorów genów *MGMT*, *RASSF1A*, *p15INK4B* i *p14ARF* w wolnym krążącym DNA w osoczu jest porównywalna z tą stwierdzoną w tkankach nowotworowych, co potwierdza moje, opisane wcześniej, obserwacje dotyczące poziomu całkowitej metylacji. Ponadto zaproponowaliśmy zestaw genów, których zmiany profilu metylacji pozwalają na zróżnicowanie glejaków wysokiego i niskiego stopnia złośliwości. Zaobserwowaliśmy istotne zmiany metylacji genów kodujących antagonistów ścieżki sygnałowej Wnt, oraz możliwy wpływ metylacji jednego z nich, *SFRP1*, na krótsze przeżycie pacjentów z glejakami, co może w dalszej perspektywie skutkować zdefiniowaniem nowego markera prognostycznego. Stwierdziliśmy również istotną zależność metylacji genu *RUNX3* i stopnia złośliwości najczęstszych guzów wewnątrzczaszkowych, oponiaków. Wyniki tych badań zostały opublikowane w poniższych pracach:

- Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Kleszcz R, Magiera M, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Baer-Dubowska W.

Detection of *MGMT*, *RASSF1A*, *p15INK4B*, and *p14ARF* promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients.

J Appl Genet. 2013; 54, 335-344

IF 1.902, MNiSW 20, liczba cytowań: 24

- Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Szalata M, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Kleszcz R, Sherba A, Baer-Dubowska W.

The methylation of a panel of genes differentiates low-grade from high-grade gliomas.

Tumor Biol. 2015; 36, 3831-3841

IF 2.926, MNiSW 30, liczba cytowań: 13

- Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Szalata M, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Baer-Dubowska W.

DNA methylation analysis of benign and atypical meningiomas: correlation between *RUNX3* methylation and WHO grade.

J Cancer Res Clin Oncol. 2015; 141, 1593-1601

IF 3.141, MNiSW 25, liczba cytowań: 10

- Majchrzak-Celińska A, Słocińska M, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Baer-Dubowska W. Wnt pathway antagonists, SFRP1, SFRP2, SOX17, and PPP2R2B, are methylated in gliomas and SFRP1 methylation predicts shorter survival.

J Appl Genet. 2016; 57, 189-197

IF 1.655, MNiSW 20, liczba cytowań: 13

5.2.3 Ocena zmian całkowitej metylacji DNA w innych patologiach

5.2.3.1 Całkowita metylacja DNA w nowotworach piersi i jelita grubego

We współpracy z Oddziałem Chirurgii Onkologicznej I Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu (Prof. dr n. med. Dawid Murawa, prof. dr hab. med. Paweł Murawa) zastosowaliśmy metodę oceny całkowitej metylacji DNA do oceny nowotworów piersi i jelita grubego. Poziom metylacji cytozyny w DNA u pacjentów z rakiem piersi dobrze koreluje ze złośliwością nowotworów. Ponadto, po raz pierwszy zaobserwowano zwiększoną metylację DNA pacjentów z rakiem piersi leczonych różnymi chemioterapeutykami, nie będącymi czynnikami metylującymi. Sugeruje to aktywację enzymu metylotransferazy DNA, a w konsekwencji metylację i wyciszenie ekspresji genów naprawy DNA. Obserwacja ta wskazuje na możliwość wykorzystania całkowitej metylacji DNA w diagnostyce klinicznej i monitorowaniu leczenia raka piersi i jelita grubego. Potwierdza też uniwersalność zastosowania tej oceny w onkologii. Praca została opublikowana.

- **Barciszewska A-M**, Murawa D, Gawronska I, Murawa P, Nowak S, Barciszewska MZ. Analysis of 5-methylcytosine in DNA of breast and colon cancer tissues.

IUBMB Life 2007; 59, 1-6

IF 2.316, MNiSW 27, liczba cytowań: 15

5.2.3.2 Zmiany całkowitej metylacji DNA w nadciśnieniu tętniczym

Wychodząc poza obszar badawczy onkologii nawiązaliśmy współpracę z Katedrą Farmakologii Klinicznej UMP (prof. dr hab. med. Anna Jabłecka, dr med. Iwona Smolarek) celem podjęcia badań globalnej metylacji w różnym stopniu zaawansowania nadciśnienia tętniczego. Zauważyliśmy, że wartości całkowitej metylacji DNA (R) były niższe niż u ludzi zdrowych, oraz że korelowały ze stopniem nasilenia nadciśnienia. Średni poziom metylacji (wartości R) wynosiły: 1.80 (grupa kontrolna), 1.29 (stadium I nadciśnienia tętniczego), 0.99 (stadium II nadciśnienia tętniczego). Poziom m^5C w DNA pacjentów z istotnym nadciśnieniem tętniczym był niezależny od czynników klinicznych i biochemicznych. Wyniki badań zostały opublikowane.

- Smolarek I, Wyszko E, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Gawronska I, Jabłecka A, Barciszewska MZ.
Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension.
Med Sci Monit. 2010; 16, CR149-CR155
IF 1.699, MNIŚW 20, liczba cytowań: 73

5.2.3.3 Ocena zmian metylacji DNA w procesie starzenia

We współpracy z wybitnym biogerontologiem, prof. Sureshem I. S. Rattanem, z Department of Molecular Biology and Genetics Uniwersytetu w Aarhus w Danii badałam zmiany zawartości 5-metylocytozyny w DNA w procesie starzenia analizując seryjnie pasażowane ludzkie fibroblasty skóry na różnych etapach ich replikatywnej długości życia. Zaobserwowaliśmy znaczący spadek metylacji DNA podczas starzenia się komórkowego in vitro. Najwyższe poziomy m^5C stwierdziliśmy w komórkach młodych. Potwierdza to hipotezę działania wieku (czasu, ekspozycji na endo- i egzogenne uszkodzenia) na poziom globalnej metylacji w DNA i większą częstość występowania chorób w zależności od wieku pacjenta. Zatem można stwierdzić obniżenie poziomu metylacji z wiekiem oraz, że metylacja DNA jest dobrym czynnikiem monitorującym ten proces. Należy pamiętać że poziom metylacji w komórkach zdrowych jest znacznie wyższy niż w chorych. Nasze wyniki są podobne

opublikowanych wcześniej [Holliday, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2004;59:B568-B572; Holliday, Biochemistry (Mosc). 2005;70:500-504; Lu Q et al., Ageing Res Rev 2006;5:449-467; Finkel et al., Nature. 2007;448:767-774].

- Barciszewska MZ, **Barciszewska A-M**, Rattan SIS.

TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics.

Biogerontology 2007; 8, 673-678

IF 3.547, MNiSW 32, liczba cytowań: 20

5.2.4 Technologie RNA

5.2.4.1 Ekspresja mikroRNA w guzach glejowych

Jak napisałam wcześniej epigenetyczna kontrola ekspresji genów obejmuje metylację DNA, modyfikacje histonów oraz niekodujące kwasy nukleinowe (RNA). Jednym z nich są małe niekodujące RNA. MicroRNA (miRNA) są to najmniejsze funkcjonalne cząsteczki RNA o długości około 22 nukleotydów. Ulegają ekspresji we wszystkich organizmach wielokomórkowych. Ich podstawową funkcją jest udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez blokowanie translacji lub indukowanie specyficznej degradacji docelowych mRNA [Denli et al., Nature. 2004;432:231-235]. Większość miRNA u zwierząt, w tym również u człowieka jest odpowiedzialna za inhibicję translacji. Na podstawie analizy potencjalnych miejsc wiązania miRNA w regionach 3'-UTR szacuje się, że regulacja z udziałem miRNA może dotyczyć ok. 30% ludzkich genów kodujących białka [Cho, Mol Cancer. 2007;6:60]. Ogromny potencjał regulatorowy miRNA wynika z faktu, że każda cząsteczka ma możliwość modulacji ekspresji wielu genów białkowych a jednocześnie mRNA kodujący pojedyncze białko może być celem dla wielu różnych miRNA.

Podobnie jak czynniki transkrypcyjne, których repertuar w różnych typach komórek jest różny, miRNA również wykazują złożone profile ekspresji specyficzne dla konkretnych tkanek, etapu rozwoju lub stadium różnicowania [Lee & Ambros, Science 2001;294:862-864]. miRNA odgrywają szczególną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego.

Procesy patologiczne prowadzące do powstawania i wzrostu nowotworów mają swoje źródło w zmianach genetycznego programu komórek. W ogólnym zarysie proces nowotworzenia polega na regresji zróżnicowanych, nie ulegających szybkiej proliferacji komórek do stanu przypominającego niezróżnicowane komórki macierzyste. Komórki te charakteryzują się wieloma cechami, które pozwalają na ich szybki wzrost i namnażanie. Na poziomie molekularnym tkanka prawidłowa i nowotworowa cechują się diametralnie różnymi profilami ekspresji genów zarówno kodujących białka, jak i ncRNA.

Zmienione nowotworowo komórki charakteryzują się wyraźnymi różnicami ekspresji miRNA zarówno ilościowymi, jak i jakościowymi [Medina & Slack, *Cell Cycle* 2008;7:2485-2492]. Globalny poziom ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych jest niższy niż w zdrowej tkance, jednak poszczególne miRNA mogą wykazywać znacznie podwyższone lub obniżone poziomy [Lu et al., *Nature* 2005;435:834-838]. Identyfikacja poszczególnych miRNA jako potencjalnych czynników regulatorowych związanych z procesem nowotworowym opiera się przede wszystkim na porównaniu ekspresji miRNA w zdrowych i zmienionych nowotworowo komórkach. Unikalne profile miRNA pozwalają na rozróżnienie różnych podtypów nowotworów charakteryzujących się odmiennymi cechami i często wymagających zastosowania odmiennych strategii terapeutycznych.

We współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN badaliśmy globalny profil miRNA tkanek glejaka złośliwego przy użyciu mikromacierzy miRNA, głębokiego sekwencjonowania i metaanalizy. Zidentyfikowaliśmy potencjalne miRNA związane z progresją glejaka III stopnia do glejaka IV. Zaproponowaliśmy zestaw 35 miRNA których ekspresja jest najczęściej zaburzona w GBM, jak również 30 miRNA mogących zostać uznane za nowe biomarkery GBM. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy eksperymentalnej wymienionej poniżej.

Podsumowania dotychczasowych ustaleń w zakresie możliwości wykorzystania miRNA jako biomarkerów w wysokozłośliwych glejakach dokonałam w pracy poglądowej.

- Piwecka M, Rolle K, Belter A, Żywicki M, Michalak M, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J.
Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues.
Mol Oncol. 2015; 9, 1324-1340

IF 5.367, MNiSW 40, liczba cytowań: 22

- **Barciszewska A-M.**

microRNAs as efficient biomarkers in high grade gliomas.

Folia Neuropathol 2016; 54, 369-374

IF 1.093, MNiSW 20, liczba cytowań: 27

5.2.4.2 Zastosowania interferencyjnego RNA w terapii glejaków

Prof. dr hab. Stanisław Nowak, Kierownik Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii UMP spowodował, że Klinika należy do grupy nielicznych ośrodków cechujących się nowoczesnym molekularnym podejściem do leczenia wysoko złośliwych nowotworów mózgu [Rolle et al., *Cancer Biol Ther* 2010;9:396-406]. Zaprojektowano i wdrożono eksperymentalną technologię leczenia glejaków OUN. Polega ona na wprowadzeniu dwuniciowego RNA (dsRNA) komplementarnego do białka macierzy pozakomórkowej tenascyny-C (TN-C) bezpośrednio do łoża pooperacyjnej.

W 2009 roku zostałam włączona w prace zespołu mające na celu możliwości zastosowania technologii RNAi do wyciszania ekspresji mRNA α B-krystaliny (CRYAB). Białko to jest czynnikiem anty-apoptotycznym zidentyfikowanym w komórkach nowotworów złośliwych. Analizy immunohistochemiczne w skrawkach glejaków oraz innych typów guzów mózgu (oponiaki, nerwiaki, struniaki) wskazują na specyficzną aktywację i nadekspresję α B-krystaliny w wysokozłośliwych guzach glejowych. α B-krystalina została również zidentyfikowana jako czynnik ulegający znaczącej nadprodukcji w glejaku wielopostaciowym w odróżnieniu do gwiazdziaków niższego stopnia złośliwości biologicznej (WHO II) w wysokoskalowych analizach proteomicznych badających globalną ekspresję białek. Wstępne wyniki badań zostały opublikowane.

- Piwecka M, Rolle K, Wyszko E, **Barciszewska A-M**, Nowak S, Barciszewski J.

α B-krystalina jako nowy cel terapeutyczny w glejakach złośliwych.

Neuroskop 2011; 13, 55-63

5.2.5 Analiza przypadków klinicznych

W moim dorobku znajdują się również prace analizujące szeroko różne jednostki chorobowe w aspekcie klinicznym – opisy przypadków, analizy epidemiologiczne i oceny możliwych prognostyków terapeutycznych. Tematyka tych prac, poza guzami mózgu, obejmuje również patologie naczyń mózgowych (tętniaki i ich powikłania) oraz urazy czaszkowo-mózgowe. Jakkolwiek nie opublikowane w czasopismach z IF, stanowią one zarówno materiał edukacyjny, jak również podstawę do rozszerzenia i pogłębienia analizy w ramach projektów badawczych.

- **Barciszewska A-M.**

Analiza kliniczna nowotworów mózgu.

Neuroskop 2002; 4, 22-26

- Sokół B, **Barciszewska A-M**, Brzezicki G, Gaca M, Jankowski R.

Czynniki ryzyka rozwoju wodogłównia po operacjach z powodu pękniętego tętniaka mózgu.

Nowiny Lekarskie 2003; 72, 371-376

MNiSW 2

- Żukiel R, Nowak S, Jankowski R, Piestrzeniewicz R, **Barciszewska A-M.**

Uszkodzenie mózgu jako następstwo fali ciśnieniowej po wybuchu.

Neuroskop 2008; 10, 9-22

MNiSW 2

- Majewski T, **Barciszewska A-M**, Nowak S.

Wieloletnie przeżycie po usunięciu przerzutu czerniaka do mózgu. Opis przypadku.

Neuroskop 2008; 10, 115-119

MNiSW 2

- Juszkat R, Nowak S, **Barciszewska A-M**, Stanisławska K.

Całkowite wyłączenie z krążenia tętniaka odcinka A1 tętnicy przedniej mózgu po implantacji samorozprężalnego stentu Leo Plus bez użycia spiral.

Neuroskop 2011; 13, 73-77

- Pawlicka K, **Barciszewska A-M**, Rolle K, Barciszewski J.

Diagnozowanie i leczenie guzów mózgu u ludzi.

Wszechświat. Pismo Przyrodnicze. 2018; 119, 16-23

5.2.6 Bioimpedancja w patologiach wewnątrzczaszkowych

W ramach prac w studenckim kole naukowym przy Katedrze i Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii UMP (opiekun koła: prof. dr hab. med. Roman Jankowski) brałam udział w pracach zespołu badającego możliwość zastosowania oceny bioelektrycznej bioimpedancji mózgu do nieinwazyjnego pomiaru nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. Uzyskane przez nas wyniki potwierdziły skuteczność tej metody do szybkiej diagnostyki patologii wewnątrzczaszkowych.

- Sokół B, **Barciszewska A-M**, Jankowski, R.

Badania bioelektrycznej bioimpedancji mózgu u chorych z ekspansywnymi procesami wewnątrzczaszkowymi.

Neuroskop 2004; 6, 155-160

MNiSW 2

5.2.7 Genetyka kliniczna

W ramach prac w studenckim kole naukowym przy Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej UMP (opiekun koła: dr n. med. Andrzej Kocharński, aktualnie prof. dr hab. n. med., Kierownik Zespołu Nerwowo-Mięśniowego w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN) brałam udział w kilku projektach dotyczących analizy klinicznej i molekularnej różnych chorób uwarunkowanych genetycznie. Oprócz wiedzy klinicznej i doświadczenia laboratoryjnego badania te dały mi pogląd na duże skomplikowanie procesu patogenezy chorób i konieczność precyzyjnego określenia ich etiologii dla szybszej diagnostyki i lepszej terapii.

- Murawa D, Budny B, **Barciszewska A-M**, Zielonka D, Reperowicz K, Badura M, Malec A. Choroba Dejerine-Sottas – opis przypadku.

Nowiny Lekarskie 2000; 69, 277-280

MNiSW 1

- Kocharński A, Lofgren A, Jędrzejowska H, Ryniewicz B, Czarny-Ratajczak M, Barciszewska A-M, Samoćko J, Hausmanowa-Petrusewicz I, De Jonghe P, Timmerman V, Latos-Bieleńska A.

A novel connexin 32 missense mutation (E208G) causing Charcot-Marie-Tooth disease.

Hum Mutat 2001; 17, 157

IF 6.134, MNiSW 19, liczba cytowań: 2

5.2.8 Filozoficzne aspekty biologii i medycyny

Poglądy na to co wyróżnia człowieka spośród innych istot żywych zmieniały się znacząco w ciągu stuleci. Wielce atrakcyjna wydaje się próba zdefiniowania czym jest człowiek na poziomie genów, mocno wspomagana wiedzą antropologiczną oraz nowymi trendami filozoficznymi. Nie sposób uniknąć również odpowiedzi na pytanie jaka jest prawdziwa natura unikalności człowieka. Możemy z łatwością i dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że w istotny sposób różnimy się od rzeczy, roślin i zwierząt. Z podobną łatwością możemy powiedzieć czym lub kim nie jesteśmy. Poważne trudności zaczynają się natomiast wtedy, gdy pragniemy określić kim jesteśmy. Jako filozof, w poniższej pracy próbowałam zdefiniować właściwości, które umożliwiają pojęciowe przekroczenie tej trudno uchwytnej, ulotnej, trudno definiowalnej granicy pomiędzy człowiekiem jako gatunkiem biologicznym (ang. *man*) a istotą osiagającą poziom świadomości zwany człowieczeństwem (ang. *human*).

W aspekcie biologicznym odniosłam się do mojego dotychczasowego doświadczenia w zakresie chemii i epigenetyki. Jak wspominałam wcześniej, genom człowieka w 98% składa się z sekwencji nie kodujących białek. Aby człowiek istniał czasem trzeba gen powtórzyć, naprawić, lub wyciszyć, a inny gen uaktywnić. Te indywidualne różnice stanowią o odrębności i niepowtarzalności każdego człowieka, i o nich na poziomie molekularnym decyduje regulacja epigenetyczna, a na poziomie osobniczym, kultura.

Wartość przeżycia jest wpisana genetycznie w strukturę każdego żywego organizmu. Ale człowiek i prawdopodobnie tylko człowiek nadbudował nad tym system wartości moralnych i etycznych dotyczących nie tylko rzeczy świata fizycznego i stosunków między nimi, ale wielu innych człowieczych rzeczywistości, na przykład społecznej, moralnej, estetycznej i religijnej. Ludzie osiągają swoje człowieczeństwo poprzez socjalizację i w zależności od warunków, w jakich dorastają. I właśnie wpływ otoczenia, a w sensie biologicznym – otaczającego środowiska, jest elementem łączącym oba aspekty człowieczeństwa.

W niniejszej pracy przedstawiłam analizę genetycznych i epigenetycznych uwarunkowań wpływających na rozwój człowieka oraz decydujących o jego istocie. Informacje i fakty biologiczne oraz rys ewolucyjny pokazałam w szerszej przestrzeni filozoficznej.

- **Barciszewska A-M, Barciszewski J.**

Epigenetyka człowieczeństwa.

W: Figlerowicz M (Ed.)

„Od syntezy chemicznej do biologii syntetycznej”, Poznański Ośrodek Wydawnictw Naukowych PAN 2009; 33-62

MNiSW 3

5.2.9 Historia biologii i medycyny

Historia nauki, a w zakresie moich zainteresowań biologii i medycyny w szczególności, pokazuje nie tylko opisy danych odkryć, ale również całość procesu poznawczego prowadzącego do ustalenia konkretnych faktów naukowych. Jest również fascynującym obrazem wpływu zależności ludzkich, ekonomicznych, organizacyjnych, kulturowych i geograficznych na proces badawczy. Moje badania na tym obszarze opublikowałam w temacie prób celowanego leczenia neurochirurgicznego oraz pierwszych obserwacji w zakresie lokalizacji mózgowej, jak również opisałam jak kształtowała się wiedza o ekspresji materiału genetycznego.

- Żukiel R, Nowak S, Jankowski R, Piestrzeniewicz R, **Barciszewska A-M.**

Historyczna kazuistyka neurochirurgiczna. Część III.

Neuroskop 2007; 9, 19-33

MNiSW 2

- **Barciszewska A-M.**

Historia odkrycia DNA i zasad regulacji jego ekspresji.

Arch Hist Filoz Med 2009; 72, 46-56



Poznań, dnia 29 kwietnia 2019