

---

### III. Autoreferat

---

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Niekodujące RNA (ncRNA) w mikrośrodowisku nowotworu mózgu – wnioski z analizy transkryptomu. (*ang.*

B) Prace będące podstawą autoreferatu:

Podstawą osiągnięcia naukowego jest zestaw pięciu prac oryginalnych opublikowanych w latach 2014-2017. W jednym artykule jestem pierwszym autorem, a w pozostałych czterech jestem autorem korespondencyjnym (\*). Sumaryczny IF tych prac wynosi 41,302, co przekłada się na 210 punktów MNiSW.

1. Rooj AK, Ricklefs F, Mineo M, Nakano I, Chiocca EA, **Bronisz A\***, Godlewski J. MicroRNA-Mediated Dynamic Bidirectional Shift between the Subclasses of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* 2017 06 06; 19(10):2026-2032. PMID: 28591575. [PubMed](#); [IF<sub>2017</sub>: 8,032](#); [MniSW/KBN: 40](#)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współkierowaniu projektem, zaplanowaniu i analizie bioinformatycznej danych, interpretacji wyników badań globalnej analizy transkrypcyjnej, współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

2. Godlewski J, Ferrer-Luna R, Rooj AK, Mineo M, Ricklefs F, Takeda YS, Nowicki MO, Salinska E, Nakano I, Lee H, Weissleder R, Beroukhim R, Chiocca EA, **Bronisz A\***. MicroRNA Signatures and Molecular Subtypes of Glioblastoma: The Role of Extracellular Transfer. *Stem Cell Reports.* 2017 06 06; 8(6):1497-1505. PMID: 28528698. [PubMed](#), [IF<sub>2017</sub>: 6,537](#); [MniSW/KBN: 40](#)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem, zaplanowaniu analiz bioinformatycznych, interpretacji wyników in vitro i in vivo, opracowaniu graficznym wyników oraz edytowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

3. Mineo M, Ricklefs F, Rooj AK, Lyons SM, Ivanov P, Ansari KI, Nakano I, Chiocca EA, Godlewski J, **Bronisz A\***. The Long Non-coding RNA HIF1A-AS2 Facilitates the Maintenance of Mesenchymal Glioblastoma Stem-like Cells in Hypoxic Niches. *Cell Rep.* 2016 06 14; 15(11):2500-9. PMID: 27264189; PMCID: PMC4909547. [PubMed](#), [PubMed Central](#), [IF<sub>2016</sub>: 8,282](#); [MniSW/KBN: 40](#)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem, zaplanowaniu analiz bioinformatycznych, interpretacji wyników in vitro i in vivo, opracowaniu graficznym wyników oraz edytowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

4. Ricklefs F, Mineo M, Rooj AK, Nakano I, Charest A, Weissleder R, Breakefield XO, Chiocca EA, Godlewski J, **Bronisz A\***. Extracellular Vesicles from High-Grade Glioma Exchange Diverse Pro-Oncogenic Signals That Maintain Intratumoral Heterogeneity. *Cancer Res.* 2016 05 15; 76(10):2876-81. PMID: 27013191; PMCID: PMC4873326. [PubMed](#), [PubMed Central](#), [IF<sub>2016</sub>: 9,122](#); [MniSW/KBN: 45](#)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem, zaplanowaniu analiz bioinformatycznych, interpretacji wyników in vitro i in vivo, opracowaniu graficznym wyników oraz edytowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5. **Bronisz A**, Wang Y, Nowicki MO, Peruzzi P, Ansari K, Ogawa D, Balaj L, De Rienzo G, Mineo M, Nakano I, Ostrowski MC, Hochberg F, Weissleder R, Lawler SE, Chiocca EA, Godlewski J. Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Res.* 2014 Feb 01; 74(3):738-750. PMID: 24310399; PMCID: PMC3928601.

[PubMed](#), [PubMed Central](#), [IF<sub>2014</sub>: 9,329](#); [MniSW/KBN: 45](#)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu wszystkich eksperymentów in vitro, zaplanowaniu i wykonaniu bioinformatycznych analizy, interpretacji wyników in vitro i in vivo, opracowaniu graficznym wyników oraz współredagowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

C) Omówienie celu naukowego ww. pracach i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

## CELE

Glejak (*ang. glioblastoma: GBM*) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym pierwotnym nowotworem mózgu u osób dorosłych. GBM nie daje specyficznych objawów (ból głowy, nudności, wymioty), nie są znane biomarkery umożliwiające wczesne wykrywanie jak i czynniki ryzyka (choć występuje korelacja z wiekiem). Standardowa terapia obejmuje maksymalnie bezpieczną resekcję i pooperacyjną radio- i chemioterapie. Pomimo tak agresywnej terapii mediana przeżycia wynosi zaledwie nieco ponad 14 miesięcy.

Wysoka heterogenność (zarówno pomiędzy guzami, jak i wewnątrz guza) prowadzi do niskiej skuteczności terapeutycznej (ze względu na pojawiające się oporność na terapię/selekcję klonalną/jak i brak uniwersalnych celów terapeutycznych). Istnieją trzy podtypy GBM które mogą współistnieć w obrębie

indywidualnego guza i ewoluować w miarę postępu choroby. Każda proba tkanki nowotworu jest więc tylko obrazem choroby w danym momencie.

Komórki macierzyste GBM (*ang. GBM Stem Cells: GSC*) które są uważane za komórki pochodzenia glejaka są różnorodne molekularnie i fenotypowo. GSC są w stanie przetrwać w strefach niedotlenienia i martwicy i są szczególnie odporne na konwencjonalne terapie. Ponadto, sub-populacje tych komórek mogą opuścić główną masę guza i dokonać inwazji nawet na przeciwległą półkulę, co uniemożliwia całkowitą resekcję – i prowadzi do nawrotu choroby.

Jest już obecnie dobrze udokumentowane, że sygnatury ekspresji genów kodujących białko klasyfikują GBM do podtypów. Podobnie klasyfikują również GSCs do podtypów GBM. Taka klasyfikacja okazała się jednak bardziej skomplikowana jako że poszczególne nowotwory zawierają wiele podtypów GBM i komórek o cechach hybrydowych. Obecnie uważa się że klasyfikacja tkankowa określa jedynie dominujący typ komórek.

Jako że sekwencje kodujące białka stanowią zaledwie mniej niż 2% ludzkiego genomu, jest coraz bardziej oczywiste, że aberacje w genach nie kodujących białka są odpowiedzialne za powstawanie istotnych fenotypów nowotworowych. RNA jest uważane za cząsteczkę znacznie istotniejszą niż tylko pośredniczącą między DNA i białkiem. Rozróżnia się wiele klas RNA, w tym długie nie-kodujące RNAs (*ang. long non-coding RNAs - lncRNAs*) i mikroRNA. Genomika porównawcza wykazała że u *Metazoa* występuje w dużym stopniu ten sam repertuar genów kodujących białka. Różnice pomiędzy komórkami podczas normalnego rozwoju i patogenezy w wielu przypadkach powstają w wyniku różnic w tym kiedy, gdzie i jak geny są włączane lub wyłączane. Obecnie uważa się że ncRNAs odgrywają istotną rolę w tych procesach poprzez ułatwianie lub hamowanie transkrypcji, translacji, oraz aktywności genów i kodujących przez nie białek.

Guzy GBM zawierają nisze komórkowe charakteryzujące się odrębnymi właściwościami fenotypowymi, w tym istotne są przejściowe uśpienie (*ang. transient quiescence*) i samo-odnawianie (*ang. self-renewal*), adaptacja na niedotlenienie oraz odporność na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem. Prezentowane tu wyniki sugerują, że taka różnorodność fenotypów może być jeszcze bardziej złożona poprzez międzykomórkowy transfer funkcjonalnych cząsteczek RNA. Mechanizmy, za pomocą których komórki nowotworowe reagują na zmienne czynniki, i dostosowują się do nich poprzez modyfikacje mikrośrodowiska mają kluczowe znaczenie w patobiologii guzów litych, takich jak GBM. Na podstawie naszych danych, proponujemy model podkreślający rolę ncRNA w anatomicznym zróżnicowaniu guza w zależności od mikrosrodowiskowego kontekstu, który służyć będzie jako nowa strategia w rozwoju spersonalizowanej terapii GBM.

W ostatnich pięciu latach moje wysiłki badawcze połączyły metody eksperymentalne i obliczeniowe w celu poznania roli ncRNA w komórkowej i poza-komórkowej (zawartej w zewnątrz komórkowych pęcherzykach; (ang. *extracellular vesicle (EVs)*) włączając w to exosomy) regulacji genów w procesie nowotworzenia. Misją badawczą mojego zespołu było i nadal jest odkrywanie nowych funkcji ncRNA, i doprowadzenie do identyfikacji nowych celów w terapii glejaka. Celem krótkoterminowym jest wykorzystanie istniejących modeli badawczych i strategii terapeutycznych dla identyfikacji nowych celów ncRNA w wykrywaniu, diagnozie i rozszyfrowaniu ich funkcji w nowotworze. Podejście to, w dalszej perspektywie, powinno rozwinąć szeroki projekt badawczy nakierowany na ncRNA zarówno w badaniach podstawowych jak i w rozwoju metod klinicznych w terapii nowotworowej.

## WYNIKI

Aby badać różnorodność transkryptomu GSC pozyskaliśmy ponad czterdzieści, pochodzących od pacjentów z GBM pierwotnych linii komórkowych hodowanych w warunkach 3D *in vitro* (ang. *patient-derived cultures - PDC*) (REF 1-4). Za pomocą analizy mikromacierzy wybraliśmy dwa najbardziej wyraziste profile transkryptomu tych komórek. Następnie porównaliśmy nasze dane z atlasem genomu nowotworowego GBM (ang. *The Cancer Genome Atlas: TCGA*). Wykazaliśmy że profile ekspresji genów kodujących białka zaklasyfikowały GSCs do różnych podklas. Podklasy te zostały zgrupowane z dwoma odrębnymi podtypami GBM (mezenchymalny i proneuronalny). Następnie zadaliśmy pytanie: czy odrębne transkryptomy pokrywają się z niszami mikrośrodowiskowymi lub czy mogą kształtować fenotypy komórkowe? Najpierw za pomocą uzyskanych od pacjentów z GBM ksenograftów wewnątrz-czaszkowych (ang. *patient-derived intracranial xenograft - PDIX*), wykazaliśmy, że z mezenchymalnych GSC powstaje guz o wyraźnych granicach podczas gdy proneuronalne GSC zapoczątkowują guzy inwazyjne. Te dane wskazują, że GSCs różniące się transkryptomem charakteryzują się krańcowo odmiennymi fenotypami. Aby model ten miał zastosowanie w badaniach nad patologią GBM, takie fenotypy GSCs wynikające z różnych transkryptomów powinny być rozpowszechnione w różnych rejonach anatomicznych guza. Porównaliśmy więc nasze transkryptomy z danymi zebranymi po sekwencjonowaniu RNA izolowanego z GSC z różnych anatomicznych struktur tkanek nowotworowych pacjentów z GBM stosując metodę laserowej mikrosekcji guza. Taka strategia umożliwiła badanie specyficznej ekspresji w różnych obszarach guza GBM (dane zebrane w Projekcie Atlasu Glejaka Ivy, ang. *Ivy Glioblastoma Atlas Project: IVY GAP datasets*). Okazało się, że profile guzów mezenchymalnych pokrywają się ze strefami perinekrotycznymi, podczas gdy profil proneuronalny pokrywał się z obszarami infiltracji guza. Wyniki te wykazały, że występowanie wewnątrz-nowotworowej architektury wynika ze współistnienia różnych komórek w poszczególnych nowotworach. W celu wiernego modelowania opracowaliśmy nowe modele heterogenne – zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. (REF 4,2) heterogenne, uzyskane od pacjentów z GBM kserografty wewnątrz-czaszkowe (ang. *heterogenous patient-*

*derived cultures* – **HPDC**; *heterogenous, patient-derived intracranial xenograft* - **HPDIX**). W badaniach wykorzystano mieszaniny odmiennie wyznakowanych komórek mezenchymalnych i komórek proneuralnych. Ustalono, że trójwymiarowe sferoidy początkowo stanowiące mozaikę obu typów komórek, po pewnym czasie uorganizowały się w wyraźnie odrębną architekturę z mezenchymalnymi GSCs tworzącymi nieinwazyjny rdzeń sferoidu i proneuronalnymi GSCs w strefie peryferyjnej z pojedynczymi komórkami naciekającymi otaczającą macierz pozakomórkową. Co ważne, taki fenotyp otrzymaliśmy także w modelach *in vivo* (REF 4,2).

Mając do dyspozycji taki model skupiono się na głównym celu badań, jakim jest poznanie profilu ekspresji i roli niekodującego RNA w heterogennym modelu glejaka.

Ponad dekadę temu wykazano, że sygnatury genów kodujących białka pozwalają określić podtyp GBM (Verhaak et al, 2010). Jednakże nie wykazano aby ekspresja małych, niekodujących RNA mogła być podobnie zastosowana. Użyliśmy więc analizy wyników z bazy danych TCGA GBM dotyczących mikroRNA GBM i porównaliśmy je z podtypami GBM zdeterminowanymi przez geny kodujące białko (REF 2). Ekspresja mikroRNA w TCGA GBM ujawniła wysoce heterogeny obraz, bez wyraźnej stratyfikacji. Następnie, aby ocenić potencjalne grupowanie mikroRNA posłużyliśmy się współczynnikiem korelacji grupowania (*ang. cophenetic correlation coefficient analysis*) wykazując, że chociaż profile mikroRNA nie nakładały się wyraźnie na podtypy GBM zdeterminowane przez kodujące białka transkryptom – to profile te utworzyły dwie odrębne klasy. Wśród nich wykazano znaczącą przewagę profili mezenchymalnych lub proneuronalnych.

W celu potwierdzenia tych danych, wybrano jedno mikroRNA (miR-128) do eksperymentalnej analizy funkcjonalnej (REF 1). Wykazano że miR-128 podlega wysokiej ekspresji w prawidłowym mózgu w porównaniu do GBM, i że może być użyty do prognozowania zarówno przeżywalności chorych z GBM jak i do identyfikacji podtypów GSC. Używając naszego modelu HPDIX i transdukowanych GSCs (mezenchymalnych GSC z nadekspresją miR-128 i proneuronalnych GSC z miR-128 knock-down), okazało się, że zmiana ekspresji miR-128 w jednym typie GSC zmienia wpływ tego mikroRNA w drugim typie komórek. Sugerowało to, że miR-128 (lub jego inhibitor) wprowadzone do komórek, mogą być przenoszone wewnątrz nowotworu przez mikropęcherzyki wydzielane przez te komórki (*ang. extracellular vesicles EVs*). Dalsze obserwacje wykazały, że ekspresja miR-128 zmienia nie tylko fenotyp komórek. Po raz pierwszy pokazano *in vitro*, że molekularna rearanżacja spowodowana przez miR-128 zmienia tożsamość komórek z mezenchymalnej na klasyczną – taka hybryda była zidentyfikowana wcześniej u pacjentów (Patel et al, 2014).

Wewnątrz-nowotworowy transfer wielu różnych cząsteczek, w tym mikroRNA, przez EVs nie jest ograniczony do komórek nowotworowych, ale również może wpływać na komórki w mikrośrodowisku guza. W badaniach

nad mechanizmem mikroRNA-1 (miR-1) wykazano, że nadekspresja miR-1 w komórkach glejaka zablokowała wzrost guza, neowaskularyzację i inwazyjność *in vivo* (REF 5). Powstało więc pytanie czy te efekty były związane z rolą miR-1/EV w komunikacji międzykomórkowej w mikrośrodkowisku nowotworu. W badaniach tych wykazano, że zarówno funkcjonalne transfery miR-1 jak i deregulacja białkowego cargo EVs przez miR-1 są ważnymi modyfikatorami komórek - biorców.

W odróżnieniu od mikroRNA, lncRNAs nie są zdefiniowane przez pewien wspólny mechanizm działania i mogą regulować ekspresję genów i syntezę białek na wiele sposobów. Ponadto wykazano, że w przeciwieństwie do mikroRNA, lncRNA może być stosowany do klasyfikacji GBM (REF 3, (Du et al, 2013)). Taka klasyfikacja jest obserwowana w ekspresji lncRNA w wybranych populacjach GSCs. Dla celów naszego projektu, wybraliśmy lncRNA wysoko wyrażane w nowotworze i specyficzne dla mezenchymalnego podtypu GSC: indukowany przez hipoksję czynnik pierwszy alfa antysensowne RNA 2 (ang. **Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha Anti-Sense 2 RNA: HIF1A-AS2**). Nokaut HIF1A-AS2 spowodował osłabioną/opóźnioną odpowiedź na niedotlenienie. W kolejnych badaniach wykazano, że HIF1A-AS2-zależny profil ekspresji pokrywa się z perinekrotycznymi obszarami guza, a także z profilami swoistymi dla niedotlenienia i mezenchymalnej tożsamości GSC. Korelacja molekularnych celów HIF1A-AS2 z gorszą przeżywalnością chorych podkreśliło znaczenie kliniczne tego lncRNA w GBM. Aktywacja ekspresji HIF1A-AS2 przez niedotlenienie w mezenchymalnych ale nie w proneuronalnych GSCs sugeruje, że HIF1A-AS2 działa w sposób zależny od anatomicznych obszarów guza i że może kontrolować adaptację określonego typu komórek na stres niedotlenienia.

Dlaczego więc ekspresja lncRNA, ale nie mikroRNA pokrywa się z podtypami określanymi przez ekspresję genów kodujących białko? Być może odpowiedź jest prosta – mikroRNA, w przeciwieństwie do mRNA i lncRNA są małe. Z tego więc powodu licznie występują w EVs (REF 2). Wymiana mikropęcherzyków zawierających mikroRNA i ich rozprzestrzenianie się na względnie duże odległości od komórki z której pochodzą sugeruje zarówno istnienie hybryd molekularnych jak i propagację różnorodności w obrębie guza. Aby przetestować tę hipotezę przeanalizowano ekspresję mikroRNA w GSC i ich wydzielanie z GSCs przez EVs. Okazało się, że dwie główne podgrupy ekspresji mikroRNA zidentyfikowane w GBM w dużej mierze pokryły się z podgrupami GSCs. Następnie pokazano, że profile mikroRNA w dwóch podklasach GSCs grupują się razem ze sobą, ale nie z ich mikroRNA zawartymi w EVs. Ponadto, używając profili EV mikroRNA uzyskano klasyfikację na takie same dwie podgrupy jak przy klasyfikacji opartej na mikroRNA komórkowych, mimo że inne zbiory mikroRNA zostały zidentyfikowane w komórkach i EVs. Zatem przeprowadzone badania wyjaśniają istnienie wysoce heterogennych profili ekspresji mikroRNA w GBM, które są ponadto propagowane przez wewnątrz nowotworową wymianę mikroRNA za pośrednictwem EVs.

## IMPAKT

Nasze dane podkreślają istotną rolę ncRNA w regulacji komunikacji międzykomórkowej w mikrośrodowisku glejaka. Może to mieć kluczowe znaczenie dla przetrwania i przystosowania się komórek nowotworowych w dynamicznie zmieniającym się krajobrazie mikrośrodowiskowym. Wyniki prezentowanych tu badań wydają się istotne zarówno w kontekście poznania mechanizmów nowotworzenia jak też mogą mieć znaczenie w badaniach przedklinicznych. Wykazaliśmy po raz pierwszy, że profile ekspresji mikroRNA ujawniają różnorodność tkanek w określonych podtypach GBM. Prace te rozszerzyły koncepcję funkcjonowania mikroRNA poza granice komórek nowotworowych poprzez zdefiniowanie złożonej sieci komunikacji w mikrośrodowisku guza, która jest niezbędna do jego wzrostu i progresji. Odkryte tu mechanizmy molekularne wskazały, że GSC EVs/mikroRNA działają poprzez mechanizmy komórkowo - zależne, propagację wewnątrz-nowotworowej różnorodności i w konsekwencji modyfikację molekularnego krajobrazu, w zależności od obszarów guza. Wykazano również, że zarówno mikroRNA, jak i lncRNA mogą być obiecującymi celami terapeutycznymi oraz mogą być cennymi biomarkerami rozwoju glejaków. Opracowaliśmy nowatorski model heterogennego glejaka w oparciu o komórki pozyskane od pacjentów, który pogłębia naszą wiedzę na temat złożonej dynamiki subpopulacji w ekosystemie nowotworowym, a także umożliwia przedkliniczne badania ukierunkowane na rozwój nowych strategii terapeutycznych. Wykorzystanie EVs dla rozwoju nowatorskich, bezpiecznych i skutecznych metod dostarczania cząsteczek terapeutycznych oraz monitorowania terapii będzie miało szerokie zastosowanie w terapii nowotworowej, ale także w innych chorobach. Obiecujące działanie terapii opartej na mikroRNA/EVs w modelach *in vivo* daje nadzieję na odkrycie potencjalnie ważnych modulatorów przyszłych strategii terapeutycznych glejaka. Jest prawdopodobne, że profile EVs mikroRNA specyficzne dla danej choroby będą wykorzystywane do rozwoju czułych i minimalnie inwazyjnych rozwiązań diagnostycznych, które są pilnie potrzebne do badania heterogennych guzów mózgu. Wiedza taka może być również wykorzystywana do lepszego poznania sieci komunikacyjnych pomiędzy komórkami nowotworowymi, mikrośrodowiskiem guza, i odpowiedzi systemu immunologicznego (*ang. host response*). Wykorzystanie EVs jako nowatorskiego systemu dostarczania leków wydaje się mieć przewagę w stosunku do istniejących strategii z powodu ich niewielkich rozmiarów, stabilności i braku toksyczności.

## LITERATURA

Du Z, Fei T, Verhaak RG, Su Z, Zhang Y, Brown M, Chen Y, Liu XS (2013) Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer. *Nature structural & molecular biology* **20**: 908-913



Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, Regev A, Bernstein BE (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**: 1396-1401

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research N (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**: 98-110

