

Gdański Uniwersytet Medyczny
Medical University of Gdansk

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Analiza ekspresji i metylacji regionów promotorowych
wybranych genów naprawy DNA u pacjentów z rakiem
pęcherza moczowego**

PhD THESIS

Analysis of expression and promoter regions methylation of
selected DNA repair genes in bladder cancer patients

mgr inż. Anita Wojtczyk-Miąskowska

Promotor

Supervisor

dr hab. Beata Schlichtholz

Gdańsk 2019

Wydano za zgodą Dziekana Wydziału Lekarskiego
Issued with the consent of Dean of the Medical Faculty

Katedra i Zakład Biochemii
Biochemistry Department

Wydział Lekarski
Medical Faculty

Gdański Uniwersytet Medyczny
Medical University of Gdansk

Badania wykonano w ramach realizacji projektów: Narodowego Centrum Nauki (Polska) – grant nr N N403 130540 “DNA methylation as a potential prognostic marker of bladder cancer”; Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – grant nr ST40 i ST41.

This study was supported by grants from: the National Science Centre (Poland) – grant no. N N403 130540 ‘DNA methylation as a potential prognostic marker of bladder cancer’; Medical University of Gdansk grants no. ST-40 and ST-41.

Dziękuję mojej Promotor – Pani dr hab. Beacie Schlichtholz – za całą przekazaną wiedzę i umiejętności, merytoryczne wsparcie, zrozumienie, pomoc oraz cenne wskazówki.

Ewie, Sylwii i Jackowi dziękuję za niezliczone biochemiczne dyskusje i codzienną życzliwość.

Dziękuję także wszystkim, którzy przyczynili się do powstania publikacji naukowych, wchodzących w skład niniejszej rozprawy, a w szczególności Panu Prof. dr hab. Julianowi Świerczyńskiemu oraz Panu Prof. dr hab. Marcinowi Matuszewskiemu.

Kierownikowi - Panu Prof. dr hab. Ryszardowi Tomaszowi Smoleńskiemu, dziękuję za wskazywanie możliwości i gotowość pomocy na każdym etapie mojej pracy.

Mojemu Mężowi dziękuję za ogromną wiarę we mnie i cierpliwość.

Najdroższym Rodzicom dziękuję za wszystko co dla mnie zrobili, a przede wszystkim za nieustanne wspieranie moich decyzji.

Pracę dedykuję moim Rodzicom i mojemu Mężowi.

1. Spis treści

1. Spis treści	5
2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej / List of papers included in PhD thesis.....	7
3. Wykaz skrótów / Abbreviations.....	8
4. Wstęp	10
4.1 Rak pęcherza moczowego a proces nowotworzenia	10
4.2 Systemy naprawy DNA a proces nowotworzenia	11
4.3 Mechanizmy epigenetyczne	12
4.4 Rola wybranych genów naprawy DNA oraz <i>DNMT1</i> w rozwoju raka pęcherza moczowego.....	13
4.5 Rola genu <i>SCDI</i> , kodującego enzym uczestniczący w metabolizmie lipidów w raku pęcherza moczowego	16
4.6 Uszkodzenia DNA, metabolizm lipidów a proces nowotworzenia.....	17
4.6.1. Lipidy a zmiany genetyczne i epigenetyczne w procesie starzenia się organizmu 17	
4.6.2. Uszkodzenia DNA a proces starzenia	18
5. Cele pracy	21
6. Wyniki.....	22
6.1 Ekspresja mRNA genów naprawy DNA i <i>DNMT1</i>	22
6.2 Analiza metylacji DNA	24
6.2.1. Metylacja regionów 5' genów.....	24
6.2.2. Metylacja ogólna DNA	24
6.3 Związek pomiędzy ekspresją i metylacją promotorów wybranych genów a czasem przeżycia pacjentów	25
7. Wnioski	29
8. Dyskusja	30
9. Streszczenie.....	33
10. Introduction.....	34
10.1 Human bladder cancer and carcinogenesis	34
10.2 DNA repair systems and carcinogenesis.....	34
10.3 Epigenetics mechanisms	36
10.4 The role of selected DNA repair genes and <i>DNMT1</i> in bladder cancer development 37	

10.5	The role of <i>SCD1</i> gene encoding the enzyme that participates in lipid metabolism in bladder cancer	39
10.6	DNA damage, lipid metabolism and carcinogenesis	40
10.6.1.	Lipids, genetic and epigenetic changes in aging	40
10.6.2.	DNA damage and aging	41
11.	Goals	43
12.	Results	44
12.1	DNA repair genes and <i>DNMT1</i> mRNA expression	44
12.2	Methylation analysis	46
12.2.1.	Methylation of 5' regions genes	46
12.2.2.	Global DNA methylation.....	46
12.2.3.	The relationship between expression and promoter methylation of selected genes and the overall survival of patients	47
13.	Conclusions	51
14.	Discussion	52
15.	Abstract	55
16.	Bibliografia / References	56
17.	Załączniki (prace: A, B, C) / Appendices (papers: A, B, C).....	66

2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej / List of papers included in PhD thesis

A. **Wojtczyk-Miaskowska A.**, Presler M., Michajlowski J., Matuszewski, M., Schlichtholz B.

[Gene expression DNA methylation and prognostic significance of DNA repair genes in human bladder cancer](#)

Cellular Physiology and Biochemistry 2017 vol: 42 (6) pp: 2404-2417 DOI: 10.1159/000480182

IF = 5,500

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/ Ministry of Science and Higher Education Score = 30

B. Presler M.#, **Wojtczyk-Miaskowska A.#**, Schlichtholz B., Kaluzny A., Matuszewski M., Mika A., Sledzinski T., Swierczynski J.

authors contributed equally to the study

[Increased expression of the gene encoding stearyl-CoA desaturase 1 in human bladder cancer](#)

Molecular and Cellular Biochemistry 2018 vol: 447 (1-2) pp: 217-224 DOI: 10.1007/s11010-018-3306-z

IF = 2,561

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 20

C. **Wojtczyk-Miaskowska A.**, Schlichtholz B.

[DNA damage and oxidative stress in long-lived aquatic organisms](#)

DNA Repair 2018 vol: 69 pp: 14-23 DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.07.003

IF = 4,461

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 40

Łączny IF / Total IF: 12,522

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 90

3. Wykaz skrótów / Abbreviations

5-mC (*5-methyl cytosine*) – 5-metylocytozyna

5-hmC (*5-hydroxymethyl cytosine*) – 5-hydroksymetylocytozyna

ACLY (*ATP citrate lyase*) – liaza ATP cytrynianowa

ATP5F1B (*ATP synthase F1 subunit beta*) – podjednostka beta segmentu F1 syntazy ATP

BC (*bladder cancer*) – rak pęcherza moczowego

BER (*base excision repair*) – naprawa DNA przez wycinanie zasad

CIS (*carcinoma in situ*) – rak przedinwazyjny (dosł. „rak w miejscu”)

DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*) – metylotransferaza DNA 1

DR (*direct repair*) – naprawa bezpośrednia

DSB (*double-strand break*) – dwuniciowe pęknięcie DNA

FASN (*fatty acid synthase*) – syntaza kwasów tłuszczowych

GPD (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa

G6PD (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa

HMT (*histone methyltransferase*) – metylotransferaza histonowa

HNPPC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością

HR (*homologous recombination*) – rekombinacja homologiczna

IDH1/2 (*isocitrate dehydrogenase*) – dehydrogenaza izocytrynianowa 1/2

IDL (*insertion-deletion loop*) – pętla insercji/delecji

KDM (*lysine demethylase*) – demetylaza lizynowa

MBD4 (MED1) (*methyl-CpG binding domain 4, DNA glycosylase*) – glikozyłaza DNA z domeną 4 wiążącą grupę metylową wysp CpG

MGMT (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) – metylotransferaza O-6-metyloguaninowa

MIBC (*muscle invasive bladder cancer*) – inwazyjny rak pęcherza

MLH1 (hMLH1) (*mutL homolog 1*) – mutL homolog 1

MLH3 (*mutL homolog 3*) – mutL homolog 3

MMR (*mismatch repair*) – naprawa błędnie sparowanych zasad

MUFA (*monounsaturated fatty acids*) – mononienasycone kwasy tłuszczowe

NAD⁺ (*oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide*) – utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NADPH (*reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)*) – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP⁺)

NER (*nucleotide excision repair*) – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów

NHEJ (*non-homologous end joining*) – niehomologiczne łączenie końców DNA

NMIBC (*non-muscle invasive bladder cancer*) – nieinwazyjny rak pęcherza

NSCLC (*non-small cell lung carcinoma*) – niedrobnokomórkowy rak płuca

PC (*phosphatidylcholine*) – fosfatydylocholina

PE (*phosphatidylethanolamine*) – fosfatydyloetanolamina

PGD (*phosphogluconate dehydrogenase*) – dehydrogenaza fosfoglukonianowa

PMS1/2 (*PMS1 homolog 1/2, mismatch repair system component*) – PMS homolog 1/2, białko systemu naprawy błędnie sparowanych zasad

PPIA (*peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)*) – izomeraza peptydyloprolilowa A (cyklofilina A)

PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

ROS (*reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*) – desaturaza stearoilo-CoA 1

SAM (*S-adenosylmethionine*) – S-adenozylometionina

SNP (*single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SREBF (SREBP) (*sterol regulatory element binding transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny wiążący sterolowy element regulatorowy

TAG (*triacylglycerol*) – triacyloglicerol

TDG (*thymine DNA glycosylase*) – glikozyłaza tyminowa DNA

TET (*tet methylcytosine dioxygenase (ten-eleven translocation)*) – dioksygenaza TET

5-metylocytozyny

Nazwy i symbole genów zastosowano na podstawie bazy danych genenames.org.
Gene names and symbols were used according to database genenames.org.

4. Wstęp

4.1 Rak pęcherza moczowego a proces nowotworzenia

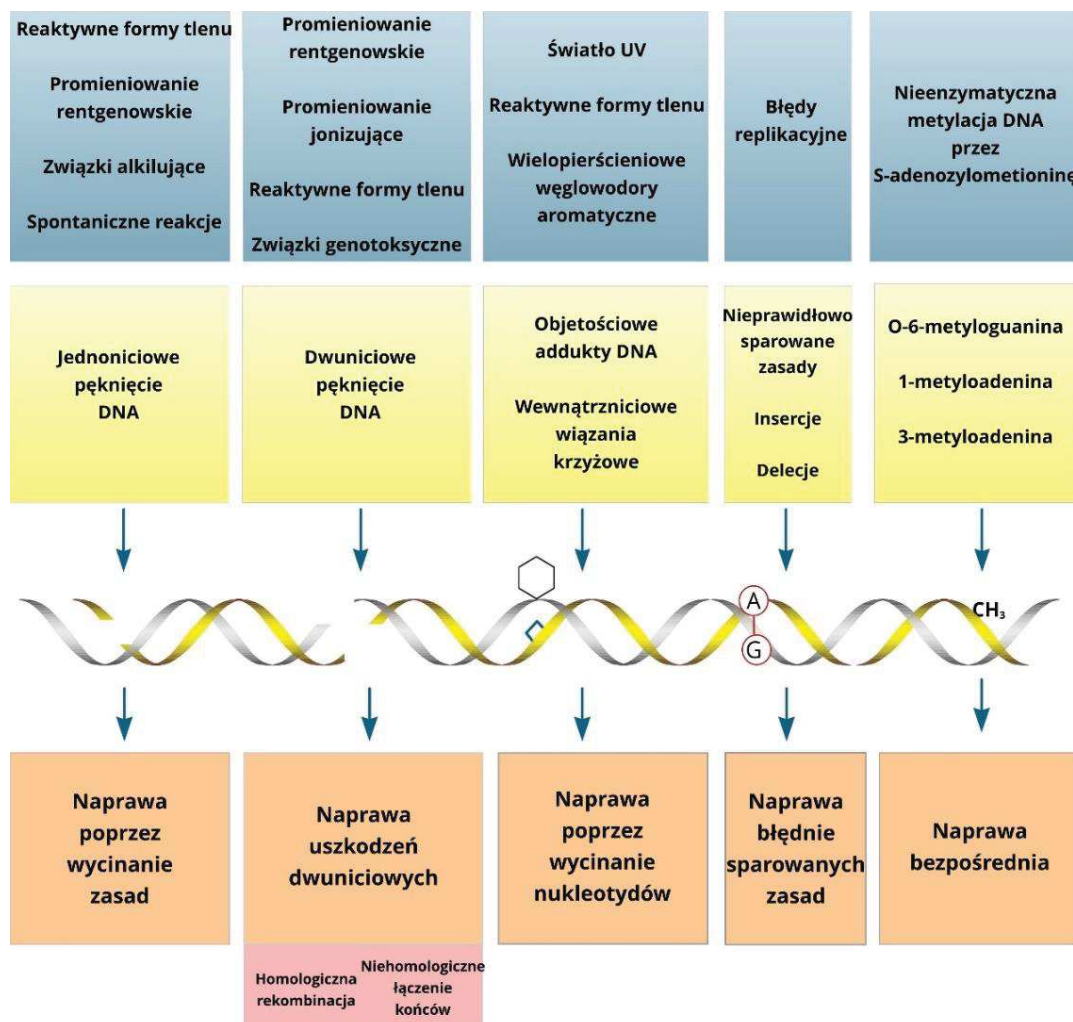
W 2012 roku rak pęcherza moczowego (BC) był przyczyną śmierci około 165 000 osób oraz 429 000 nowych zachorowań, co ustanowiło go dziewiątym najczęściej diagnozowanym nowotworem u obu płci na świecie [1]. Mężczyźni chorują od 3 do 4 razy częściej niż kobiety. Podczas diagnozy, u kobiet stwierdza się bardziej zaawansowany lokalnie nowotwór [2]. Ponad 90% przypadków stanowi rak urotelialny [3]. U około 75% do 85% pacjentów, nieinwazyjny rak pęcherza (NMIBC) ogranicza się do śluzówki (stopień zaawansowania Ta oraz *in situ* – CIS) lub podśluzówki (T1), natomiast u 25% pacjentów występują nowotwory inwazyjne (MIBC), czyli naciekające mięśniówkę pęcherza moczowego (T2-T4) [4]. Progresa do MIBC zachodzi u 15-20% pacjentów z NMIBC, a u około połowy z tych pacjentów, progresja prowadzi do śmierci [5]. W Europie, standaryzowane na wiek, 5-letnie względne przeżycie pacjentów (z NMIBC i MIBC) wynosiło około 70% [6]. Informacja o rokowaniu pacjentów jest bardzo ważna ze względu na charakterystyczną dla tego nowotworu wysoką częstość wznów (zarówno NMIBC, jak i MIBC), szybko następującą progresję i śmierć z powodu przerzutów. U 50-70% pacjentów z NMIBC występuje wznowa w ciągu 5 lat. W tym samym czasie dochodzi do progresji u 10-30% chorych [7,8].

Rak pęcherza moczowego stanowi heterogenną grupę nowotworów o różnym potencjale złośliwości, co ma znaczenie w doborze odpowiedniej terapii. W podziałach na molekularne podtypy raka pęcherza, poszukuje się charakterystycznych dla nich zmian np. w genach *EGFR*, *PPARG* czy *FOXAI* [5]. Mutacje w *FGFR3* i *HRAS* występują w nowotworze nieinwazyjnym, a w nowotworze inwazyjnym obserwuje się mutacje w *TP53* i *RB* [9–11]. Zauważono, że częstość mutacji regulatorowych genów chromatyny (np. *MLL2*, *ARIDIA*, *KDM6A* i *EP300*) jest wyższa w raku pęcherza niż w innych nowotworach [12]. Znane są czynniki rokownicze o charakterze klinicznym m.in. stopień zaawansowania klinicznego i stopień złośliwości histologicznej guza pęcherza moczowego, które są wykorzystywane do oceny przeżycia. Jednakże znalezienie molekularnego wzoru może pomóc nie tylko w bardziej efektywnym leczeniu poprzez wybór intensywniejszej terapii skierowanej do pacjentów z wyższym ryzykiem progresji czy wznów (charakterystycznych dla nieinwazyjnego raka pęcherza), ale także w oszacowaniu indywidualnego ryzyka śmierci. Poszukiwane są zatem markery specyficzne dla choroby, niewymagające wysokich kosztów,

obejmujące łatwe w wykonaniu metody o wystarczającej czułości, aby wykrywać zmiany już na wczesnym etapie procesu kancerogenezy.

4.2 Systemy naprawy DNA a proces nowotworzenia

Komórkowe DNA jest poddane ciągłemu ryzyku uszkodzeń przez różne czynniki środowiskowe i procesy metaboliczne. Zdolność do naprawy DNA jest fundamentalna dla przeżycia komórki. Stabilność genomowa organizmu jest utrzymywana przez m.in.: naprawę przez wycinanie zasad (BER), naprawę przez wycinanie nukleotydów (NER), naprawę błędnie sparowanych zasad (MMR), niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), rekombinację homologiczną (HR), naprawę bezpośrednią (DR) (Ryc. 1; na podstawie pracy C) [13].



Ryc. 1 Uszkodzenia DNA i mechanizmy ich naprawy. Endogenne i egzogenne czynniki uszkadzające DNA, przykłady spowodowanych nimi uszkodzeń DNA oraz odpowiednie mechanizmy naprawcze odpowiedzialne

za usunięcie tych zmian (na podstawie pracy C). (Źródło: załącznik – praca C, na podstawie Ryc. 1 [14].)

Pojedyncze zasady DNA mogą ulec deaminacji, alkilacji oraz oksydacji przez reaktywne formy tlenu (ROS). Mechanizm BER usuwa endogenne uszkodzenia DNA, które mogą powodować mutacje poprzez błędne sparowanie zasad lub prowadzić do pęknięć nici podczas replikacji (Ryc. 1, na podstawie pracy C). Alkilowa grupa ze zmodyfikowanej O-6-guaniny może być usunięta przez bezpośrednią naprawę, która wymaga enzymu metylotransferazy O-6-metyloguaninowej (MGMT). Mechanizm ten zachodzi bezbłędnie i nie wymaga matrycy nukleotydowej. Szlak NER usuwa uszkodzenia spowodowane promieniowaniem UV, a także duże zmiany spowodowane przez mutageny środowiskowe i niektóre chemioterapeutyki [15]. Homolog 1 i 3 białka mutL, odpowiednio (MLH1 (hMLH1)) i (MLH3), należą do systemu MMR, związanego z post-replikacyjną naprawą błędnie sparowanych zasad, wynikających m.in. z tzw. „poślizgu” (ang. *slippage*) polimerazy DNA podczas replikacji repetytywnych sekwencji DNA [16]. System MMR jest także zaangażowany w utrzymanie stabilności genomowej i hamowanie rekombinacji homologicznej [17]. Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB), które powstają na skutek ekspozycji na UV czy promieniowanie jonizujące lub w wyniku ekstremalnego zniszczenia przez substancje alkilujące, są naprawiane przez systemy HR lub NHEJ. Naprawa przez HR (w przeciwieństwie do NHEJ) nie generuje błędów ze względu na wymóg homologii sekwencji pomiędzy uszkodzonymi a wzorcowymi niemi [18]. Wszystkie wymienione systemy naprawy DNA pełnią istotne funkcje ze względu na ich udział w chorobach dziedzicznych i neurodegeneracyjnych, w procesach starzenia oraz nowotworzenia [13,19–21].

4.3 Mechanizmy epigenetyczne

Metylacja promotorów genów odpowiedzialnych za naprawę DNA czy supresorów nowotworowych odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia [22]. Epigenetyczne wyciszenie (lokalna hipermetylacja wysp CpG) jest charakterystyczne dla nowotworów, w tym dla raka pęcherza moczowego i może być jednym z jego markerów diagnostycznych i prognostycznych [23]. W nowotworach obserwuje się także globalną hipometylację genomu, która powoduje zmiany w ekspresji genów, biorących udział w przeżyciu komórki oraz proliferacji. Progresa niektórych nowotworów jest związana z hipometylacją DNA. Sugeruje się zatem wykorzystanie metylacji ogólnej (globalnej) DNA jako markera uzupełniającego w diagnozie nowotworu [24,25].

Bezpośredni lub pośredni wpływ na zmiany epigenetyczne mogą mieć kwasy tłuszczowe [26]. Acetylo-CoA, jako m.in. produkt ich degradacji (β -oksydacja), bierze udział w acetylacji histonów (otwarta chromatyna – aktywna ekspresja genów) [26,27]. Acetylacja histonów jest regulowana przez stan metaboliczny – dostępnością acetylo-CoA i utlenionej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+) w jądrze, nie tylko w czasie normalnego funkcjonowania komórki, ale także w stanach patologicznych [28–30].

Związki, które biorą udział w regulacji struktury chromatyny, uczestniczą także w metabolizmie lipidów (np. acetylo-CoA, S-adenozylometionina (SAM)) [28]. Podobnie, modyfikacje chromatyny wpływają na ekspresję genów zaangażowanych w szlaki metabolizmu lipidów (w tym syntezy, degradacji, ich przechowywania) [26]. Metylotransferazy histonowe (HMT) oraz metylotransferazy DNA wykorzystują SAM nie tylko jako donora grupy metylowej przyłączanej do węgla 5' cytozyny, do reszty lizyny i argininy w histonach, ale także do zamiany fosfatydyloetanolaminy (PE) do fosfatydylocholiny (PC) [31,32]. Istnieje możliwość, że mała dostępność SAM jest spowodowana zwiększoną syntezą fosfolipidów (metylacją PE do PC). Zmniejszenie ilości SAM może mieć znaczenie w wydłużeniu życia. Zmiany w dostępności SAM mogłyby wyjaśniać centralną rolę tego związku w metabolizmie lipidów i metylacji DNA/histonów podczas starzenia [26].

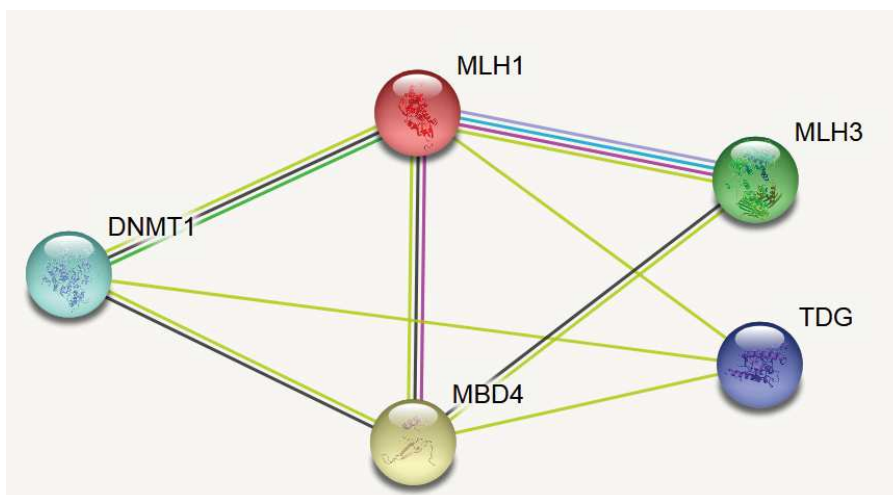
4.4 Rola wybranych genów naprawy DNA oraz *DNMT1* w rozwoju raka pęcherza moczowego

Występowanie raka pęcherza moczowego jest silnie związane z ekspozycją na m.in. związki chemiczne, które powodują uszkodzenia DNA [33]. Do czynników powodujących nowotwór pęcherza należą m. in.: palenie papierosów, picie wody zanieczyszczonej arsenem, chroniczne infekcje spowodowane przywrami z rodzaju *Schistosoma*, ekspozycja zawodowa (np. na aromatyczne aminy i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne), ekspozycja na promieniowanie jonizujące. Szacuje się, że nawet ponad 50% nowotworów pęcherza moczowego ma związek z paleniem papierosów [10,34]. W raku pęcherza zaobserwowano zwiększoną (w porównaniu do innych nowotworów) ilość mutacji w genie *ERCC2* należącym do systemu NER. Wykazano także związek pomiędzy mutacjami występującymi w tym genie a paleniem papierosów [35]. Procesy naprawy DNA są uruchamiane, aby zapobiec zmianom genetycznym i epigenetycznym [36]. Prawidłowe funkcjonowanie systemów naprawy DNA jest istotne m.in. ze względu na to, że ich defekty prowadzą do chemiooporności i radiooporności. Ponadto, niektóre komórki nowotworowe (np. wątroby) mają silną zdolność

naprawy uszkodzeń DNA, co może być przyczyną wznów po radioterapii. W celu zwiększenia efektywności radioterapii (lub chemioterapii) stosuje się specyficzne inhibitory, które hamują działanie białek uczestniczących w naprawie DNA, aby zwiększyć wrażliwość komórek nowotworowych na terapię [37–40].

W raku pęcherza moczowego nie została dotychczas określona ekspresja genów *MBD4* (znany także jako *MED1*), *MLH3* i *TDG*, kodujących odpowiednio glikozylazę DNA, homolog 3 białka mutL i glikozylazę tyminową. TDG pełni funkcję glikozylazy i demetylasy DNA, a także oddziałuje z czynnikami transkrypcyjnymi [41,42]. Tym samym utrata funkcji TDG może przyczyniać się do rozwoju nowotworu [43,44]. TDG wraz z *MBD4* należą do systemu BER i wykazują podobną aktywność [45,46]. *MBD4* oddziałuje z *MLH1* [46]. *MBD4* posiada domenę glikozylazy (tyminy i uracylu), a także domenę wiążącą grupę metylową. Przyłącza się ona do zmetylowanych wysp CpG i hamuje transkrypcję poprzez rekrutację korepresorów modyfikujących strukturę chromatyny [47,48]. Może także powodować demetylację [48]. Mutacje genu *MBD4* znaleziono u 20-43% pacjentów z rakiem trzustki, endometrium i jelita grubego [49,50]. Zmniejszona ekspresja *MBD4* mRNA występowała także u pacjentów z rakiem wątroby i była istotnie statystycznie skorelowana ze słabo zróżnicowanym nowotworem [51]. W przeciwieństwie do raka wątroby, zwiększoną ekspresję zaobserwowano w glejaku wielopostaciowym [52]. W sporadycznym raku jelita grubego zauważono, że metylacja promotora *MBD4* i jego zmniejszona ekspresja występowała na wczesnym etapie choroby z tendencją do niższej ekspresji przy wyższych stopniach zaawansowania nowotworu [43].

MBD4 oddziałuje z metylotransferazą DNA 1 (DNMT1), co czyni DNMT1 niezbędnym elementem kompleksu represji transkrypcyjnej [53]. DNMT1 bierze udział w zachowaniu metylacji, może być także odpowiedzialne za metylację *de novo* wysp CpG [54,55]. Nadekspresja DNMT1, skutkująca lokalną hipermetylacją DNA, może powodować bardziej agresywny rozwój nowotworów [56,57]. DNMT1 jest odpowiedzialne nie tylko za metylację DNA, ale także bierze udział w systemie naprawy MMR (Ryc. 2) [58–61].



Ryc 2. Znane i przewidywane interakcje dla białek systemów naprawczych DNA i DNMT1 (na podstawie bazy danych STRING [62]). Kolor linii wskazuje rodzaj dowodów interakcji: niebieski – bazy danych, różowy – określone eksperymentalnie, ciemnozielony – sąsiedztwo genów, jasnozielony – publikacje, czerwony – fuzje genów, fioletowy – homologia białek, czarny – koekspresja. Poziom ufności (średni): 0,4.

MLH1 i MLH3 należą do systemu MMR. Mutacje w *MLH1* lub innych genach systemu MMR prowadzą do niestabilności mikrosatelitarnej, która jest ściśle związana z dziedzicznym rakiem jelita grubego niezwiązanym z polipowatością (HNPCC), czyli tzw. zespołem Lyncha [63]. Inaktywacja *MLH1* została także zaobserwowana w raku żołądka [64], jajnika [65], niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC) [66], pęcherza [67] i wielu innych typach nowotworów.

MLH1 tworzy heterodimery z: PMS2 (kompleks MutL α), PMS1 (kompleks MutL β) lub MLH3 (kompleks MutL γ). Kompleks MutL γ może być zaobserwowany podczas rekombinacji mejozy [68]. Badania na myszach wykazały, że heterodimer MLH1/MLH3 może uczestniczyć w naprawie błędnie sparowanych zasad i małych pętli insercji/delecji (IDL) [69]. Z powodu interakcji z białkiem MLH1, zaproponowano, że MLH3 może odgrywać rolę w nowotworzeniu. Mutacje w genie kodującym białko MLH3 są rzadkie. Do tej pory nie poznano funkcjonalnej i prognostycznej roli MLH3 [70].

4.5 Rola genu *SCD1*, kodującego enzym uczestniczący w metabolizmie lipidów w raku pęcherza moczowego

Szybko dzieląca się komórka nowotworowa charakteryzuje się zwiększonym zapotrzebowaniem na lipidy, które są składnikiem struktur komórkowych, głównym materiałem energetycznym i zapasowym organizmu oraz biorą udział w sygnalizacji komórkowej. Zatem zmiany w metabolizmie lipidów są jedną z oznak nowotworzenia [71–75]. W wielu nowotworach obserwuje się wzrost lipogenezy (syntezy kwasów tłuszczowych), zwiększony pobór lipidów do komórki, a także ich magazynowanie [76]. W raku pęcherza zaobserwowano zmiany zarówno w β -oksydacji kwasów tłuszczowych, jak i ich biosyntezie [72]. Przeprowadzone wcześniej badania, dotyczące aktywności enzymów syntazy kwasów tłuszczowych (FASN) i liazy ATP-cytrynianowej (ACLY) oraz enzymów szlaku fosfopentozowego dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PD) i dehydrogenazy fosfoglukonianowej (PGD) (dostarczające NADPH do syntezy palmitynianu) wskazują na podwyższony poziom lipogenezy w raku pęcherza. Ponadto, stwierdzono również wyższą aktywność dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej (GPD), dostarczającej substrat (glicerolo-3-fosforan) do syntezy triacylogliceroli [77].

Białka SREBF (SREBP), jako kluczowe czynniki transkrypcyjne (wiążące sterolowy element regulatorowy), regulują syntezę kwasów tłuszczowych (SREBP1c), a także syntezę i pobór cholesterolu (SREBP2), podczas gdy SREBP1a może wpływać zarówno na ekspresję genów biosyntezy kwasów tłuszczowych, jak i cholesterolu [76,78,79]. Nadekspresja FASN – kluczowego enzymu lipogenezy – jest powiązana z agresywnością i opornością na chemioterapię nowotworowych linii komórkowych [80,81]. Poszukuje się skutecznych inhibitorów, które wpływając na ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm lipidów m.in. w lipogenezę, będą hamować rozwój nowotworów [76].

Desaturaza stearoilo-CoA 1 (SCD1) – desaturaza $\Delta 9$ – ulega wysokiej ekspresji w nowotworach [71,82–84], dlatego jednym z celów terapii przeciwnowotworowej jest poszukiwanie skutecznych inhibitorów aktywności SCD1 [76]. Funkcją tego białka jest konwersja nasyconych acylo-CoA (głównie 16:0 palmitoilo-CoA i 18:0 stearoilo-CoA) do mononienasyconych acylo-CoA (odpowiednio 16:1 $\Delta 7$ palmitooleilo-CoA i 18:1 $\Delta 9$ oleilo-CoA) [85]. Mononienasycone produkty aktywności SCD1 są kluczowymi substratami do budowy fosfolipidów błon lipidowych, estrów cholesterolowych oraz triacylogliceroli [76]. Podwyższony poziom ekspresji genu *SCD1* może być związany ze wzrostem mononienasyconych kwasów tłuszczowych zarówno we krwi, jak i w tkankach

nowotworowych pacjentek z rakiem piersi [71]. Aktywność SCD1 jest regulowana głównie na poziomie transkrypcji genu [86]. Transkrypcję *SCD1* i innych genów lipogennych w wątrobie, tkance tłuszczowej i komórkach nowotworowych reguluje głównie SREBP1c [87–90]. Nadekspresję SREBP1 obserwuje się m.in. w raku prostaty, błony śluzowej trzonu macicy, żołądka czy trzustki [91–94]. Niewiele wiadomo jednak, na temat ekspresji *SREBP1*, *SCD1* i *FASN* w raku pęcherza moczowego u ludzi.

4.6 Uszkodzenia DNA, metabolizm lipidów a proces nowotworzenia

Dysfunkcje komórkowe oraz stres oksydacyjny odgrywają rolę w procesie starzenia komórki oraz powstawaniu nowotworów. Jest to spowodowane m. in. zwiększoną metaboliczną aktywnością komórki, genetycznymi/epigenetycznymi modyfikacjami oraz inhibicją procesów utrzymujących komórkę przy życiu [31]. Modyfikacje DNA i histonów, a następnie transkrypcja, powodują zmiany poziomu m.in. takich metabolitów jak acetylo-CoA czy SAM. Poszukuje się dowodów na to, że zarówno zmiany w systemach naprawy DNA, jak i zaburzenia metabolizmu lipidów przyczyniają się do powstawania nowotworów i starzenia.

4.6.1. Lipidy a zmiany genetyczne i epigenetyczne w procesie starzenia się organizmu

Zmiany w metabolizmie lipidów mogą wpływać na procesy fizjologiczne poprzez zmiany struktury chromatyny. Modyfikacje na poziomie histonów i DNA są ważnymi mechanizmami regulującymi ekspresję genów zaangażowanych w przeżycie komórki i jej długowieczność. Post-translacyjne modyfikacje histonów takie jak acetylacja i metylacja reszt lizyloowych zależą od enzymów, których dostępność, aktywność i funkcje zmieniają się w ciągu życia człowieka [26]. W starzejących się komórkach z uszkodzonym DNA, synteza histonów jest zredukowana, co ma wpływ na homeostazę komórki [95].

Istnieją organizmy (*Caenorhabditis elegans*), u których modyfikatory chromatyny wpływają na długość życia poprzez regulację desaturacji kwasów tłuszczowych. Znane są regulatory transkrypcyjne, które zwiększają ekspresję *fat-7* (ortologu *SCD1*) i prowadzą do zwiększenia ilości MUFA (m.in. kwasu palmitooleinowego), tym samym przyczyniając się do wydłużenia życia tych organizmów [96,97]. Ciekawe jest w jaki sposób MUFA mogłyby wpływać na długość życia i czy taki efekt występuje u człowieka. Interesujące wydaje się także zbadanie roli SCD1 w aspekcie długowieczności u kręgowców.

Dioksygenazy TET i demetylazy lizynowe (KDM), które są odpowiedzialne za demetylację DNA i histonów, wymagają do swojej aktywności obecności α -ketoglutaranu [98]. W przypadku mutacji w genach *IDH1* i *IDH2*, kodujących dehydrogenazę

izocytrynianową 1 i 2, powstaje duża ilość 2-hydroksyglutaranu (zamiast α -ketoglutaranu) [28]. W konsekwencji, dioksygenazy TET i KDM nie spełniają swojej funkcji, przyczyniając się do nagromadzenia metylacji, co może spowodować wyciszenie genów supresorów nowotworowych.

Komórka dzięki możliwości modyfikacji chromatyny i ekspresji genów, jest w stanie przywrócić równowagę gospodarce lipidowej. Nie są jednak poznane dokładne mechanizmy wpływu lipidów na długowieczność i ich regulacji podczas starzenia. Wydaje się, że wybrane lipidy przez lokalną interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi lub (oraz) globalny wpływ na strukturę chromatyny, aktywują profile transkrypcyjne, które w istotny sposób przyczyniają się do wydłużenia życia [26].

4.6.2. Uszkodzenia DNA a proces starzenia

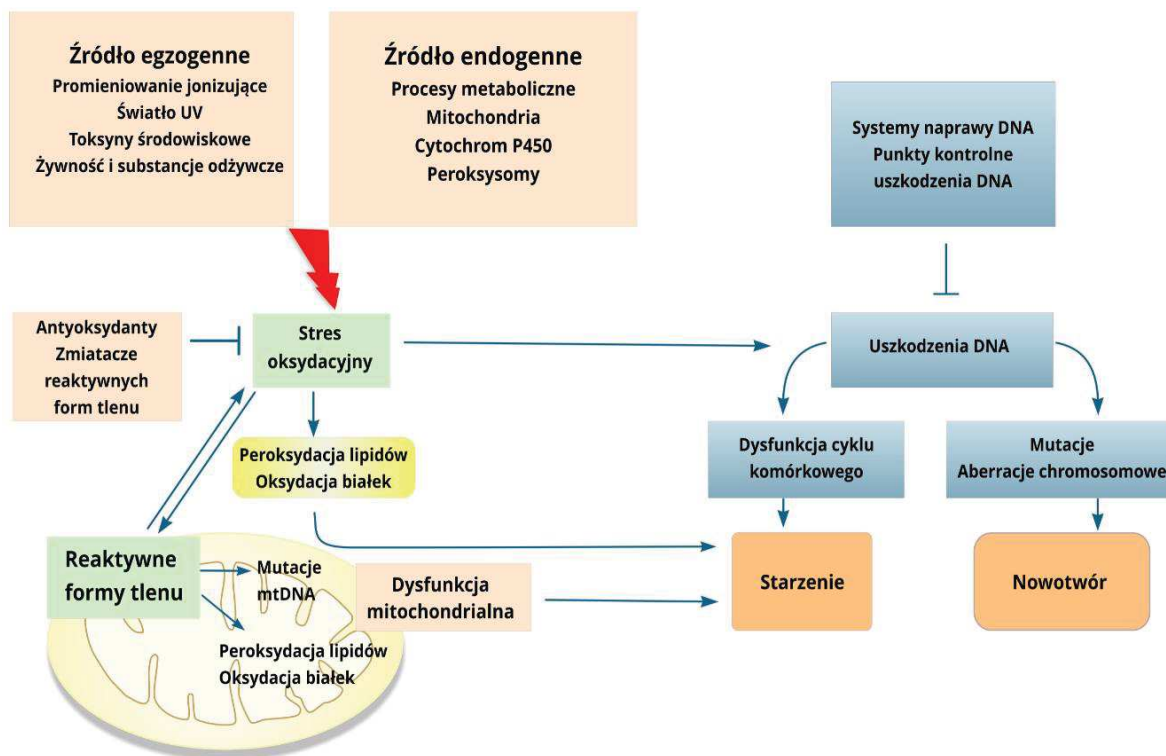
Różnica w długości życia i heterogenności fenotypu starzenia w tych samych gatunkach wynika z udziału zarówno czynników genetycznych, jak i środowiskowych. Zmiany epigenetyczne, wraz z niestabilnością genomową, skracaniem telomerów, rozregulowaniem szlaków zależnych od stanu odżywienia (szlak sygnalizacji insulina/IGF-1, mTOR, sirtuina 1 i AMPK – na podstawie Ryc. 2 pracy C), starzeniem komórkowym, dysfunkcją mitochondriów, tzw. „wyczerpaniem” (ang. *exhaustion*) komórek macierzystych, zróżnicowaniem międzykomórkowej komunikacji oraz utratą proteostazy, należą do 9 charakterystycznych cech starzenia. Starzenie jest bardzo kompleksowym i wieloczynnikowym fenomenem biologicznym [99]. Wśród teorii, które proponują mechanizm łączący metabolizm ze starzeniem, są: uszkodzenia DNA, regulacji genu, tempa życia, neuroendokrynną czy wolnorodnikowa teoria starzenia się [100,101].

Najszerzej zaakceptowanym wyjaśnieniem od czego zależy długość życia jest wolnorodnikowa teoria starzenia się, która rozwinęła się w teorię stresu oksydacyjnego i jej rozszerzenie tzw. teorię metronomu błonowego (ang. *membrane pacemaker theory of metabolism*). Teoria metronomu błonowego podkreśla wpływ składu kwasów tłuszczowych w błonie na peroksydację lipidów i w konsekwencji na tempo starzenia. Teoria stresu oksydacyjnego postuluje, że ROS powstające głównie w mitochondriach, spontanicznie utleniają i uszkadzają makromolekuły (lipidy, białka i kwasy nukleinowe), powodując utratę funkcji życiowych komórki [102]. Poza rolę sygnalizacyjną w starzeniu komórkowym i apoptozie, reaktywne formy tlenu, występujące w dużym stężeniu, przyczyniają się do mutagenyzy i niestabilności genomowej (jednej z charakterystycznych oznak starzenia) [103–

106]. Integralność i stabilność, zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA, są utrzymywane przez kompleksowe mechanizmy naprawy DNA [107,108].

Zależność pomiędzy uszkodzeniem DNA a maksymalną długością życia sugeruje, że czynniki i procesy, które zwiększają stopień uszkodzenia DNA i zmniejszają możliwość jego naprawy, mogą przyspieszyć starzenie [109]. Ponadto, uszkodzenia DNA mogą być zmniejszone poprzez spowolnienie przemian metabolicznych, zmniejszenie kalorii w diecie lub zwiększenie dokładności naprawy DNA [110]. W związku z tym, możliwym wydaje się być opóźnienie starzenia poprzez stymulację lub poprawę wydajności mechanizmów naprawy DNA.

Długo żyjące organizmy pełnią główną rolę w zrozumieniu mechanizmów starzenia i nowotworzenia. Proces starzenia u ludzi różni się od innych długo żyjących organizmów (np. wal grenlandzki – *Balaena mysticetus*; opisany w pracy C), jednakże mogą one posłużyć do analizy relacji pomiędzy mechanizmami naprawy DNA, metabolizmem energetycznym i starzeniem. Zdrowe, długo żyjące osobniki mogą pomóc w zidentyfikowaniu genów i procesów, które chronią przed chorobami. Wiedza na temat mechanizmów supresji nowotworów u długo żyjących organizmów mogłaby być zastosowana protekcyjnie u ludzi (na podstawie pracy C).



Ryc. 3 Wyjaśnienie efektu stresu oksydacyjnego na starzenie i nowotwory poprzez wybrane szlaki u ludzi. Wiele egzogennych i endogennych czynników może prowadzić do stresu oksydacyjnego, wpływającego na uszkodzenie DNA i funkcji mitochondriów, które skutkują starzeniem i powstawaniem nowotworów. Strzałki oznaczają aktywację, a ich brak (linia prosta) – inhibicję. (Źródło: załącznik – praca C, na podstawie Ryc. 2 [14].)

5. Cele pracy

Celem niniejszej pracy było znalezienie markerów molekularnych jednego z nowotworów układu moczowego u ludzi oraz ocena ich potencjału diagnostycznego i prognostycznego, a w szczególności:

- 1) Identyfikacja markerów raka pęcherza moczowego u ludzi na podstawie analizy:
 - a) ekspresji mRNA wybranych genów naprawy DNA i metabolizmu lipidów oraz metylotransferazy DNA 1; b) metylacji regionów 5' wybranych genów naprawy DNA; c) profilu metylacji ogólnej DNA.
- 2) Znalezienie zależności pomiędzy molekularnymi a klinicznymi parametrami pacjentów.
- 3) Określenie wartości diagnostycznej i prognostycznej otrzymanych wyników ekspresji badanych genów i metylacji lokalnej oraz globalnej.

6. Wyniki

6.1 Ekspresja mRNA genów naprawy DNA i *DNMT1*

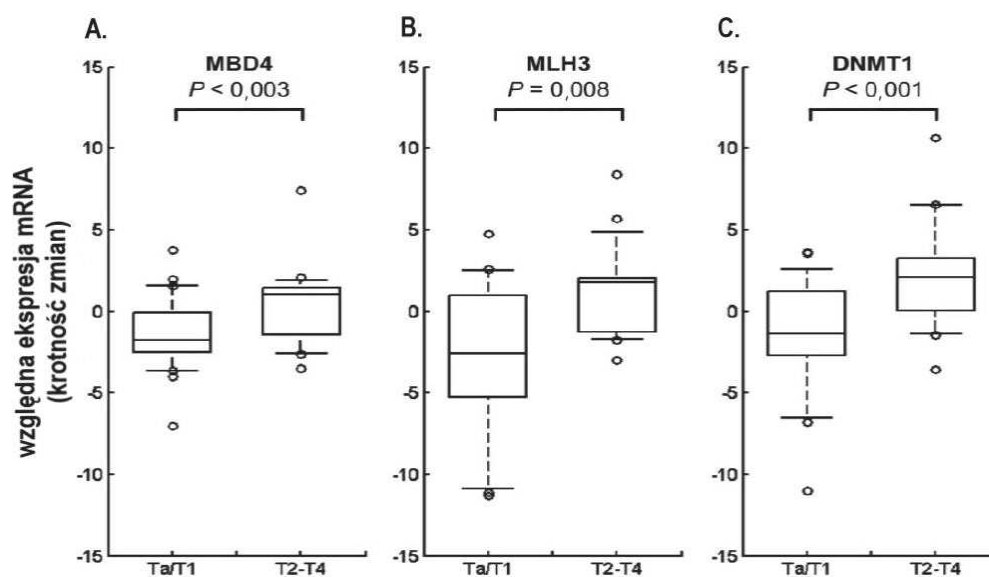
W doświadczalnej części pracy A, zbadano względny poziom ekspresji genu *MBD4*, który był zmniejszony u 28% (15/50) pacjentów. Obniżony poziom ekspresji genu *MLH3* wykryto u 34% (17/50) pacjentów, a genu *MLH1* u 36% (18/50) pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Pozostałe analizy wykazały wyższą ekspresję (*DNMT1*) lub brak jej zmian (*TDG*) w badanych genach.

Statystycznie istotną różnicę ($P < 0,003$; test U Manna-Whitneya) uzyskano pomiędzy grupami Ta/T1 (NMIBC) oraz T2-T4 (MIBC) dla ekspresji genu *MBD4*. W pierwszej z nich zmniejszenie ekspresji zaobserwowano u 46% pacjentów, a w drugiej tylko u 11%, jednakże były to niewielkie różnice krotności zmian (Ryc. 4 A).

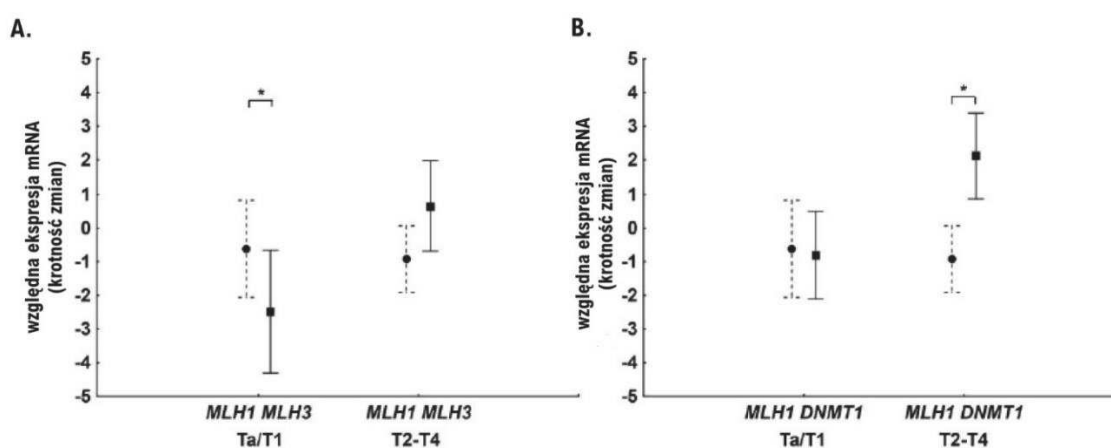
U 59% pacjentów z nowotworami nieinwazyjnymi występowało zmniejszenie ekspresji genu *MLH3*, co w porównaniu do 12% pacjentów z inwazyjnym nowotworem stanowiło istotną statycznie różnicę wynoszącą $P = 0,008$ (test U Manna-Whitneya) (Ryc. 4 B).

Zaobserwowano również zmniejszenie ilości mRNA kodującego *MLH1* u 16% pacjentów Ta/T1 i 32% T2-T4, jednak bez istotnej statystycznie różnicy. Wartość średniej krotności zmian ekspresji genu *MLH3* jest istotnie statystycznie niższa niż *MLH1* u pacjentów z NMIBC ($P = 0,03$; test t-Studenta) (Ryc. 5 A). Istotną statystycznie różnicę ($P = 0,02$; test t-Studenta) można zaobserwować u pacjentów T2-T4, u których występowało również zmniejszenie ekspresji *MLH1* przy jednoczesnym podwyższeniu ekspresji *DNMT1* (Ryc. 5 B).

Zwiększona ekspresja *DNMT1* występowała u 34% (17/50) pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Ponad połowę pacjentów (52%) z podwyższoną ekspresją *DNMT1* stanowiła grupa T2-T4. Pacjenci Ta/T1 z podwyższoną ekspresją mRNA dla tego genu stanowili 16%. Zakres krotności zmian ekspresji mRNA dla tych chorych wynosił od -10 do 3,6, natomiast dla pacjentów z inwazyjnym rakiem pęcherza od -3,5 do 10,6. Różnica pomiędzy tymi grupami była istotna statystycznie ($P < 0,001$) (Ryc. 4 C).



Ryc. 4 Względna ekspresja mRNA dla A. *MBD4*, B. *MLH3* i C. *DNMT1* w raku pęcherza moczowego w zależności od stopnia zaawansowania. Ekspresja została znormalizowana (średnia geometryczna cyklofiliny (PPIA) oraz podjednostka beta segmentu F1 syntazy ATP (ATP5F1B)). Wykresy ramka-wąsy pokazują krotność zmian ekspresji genu. Na wykresach przedstawione są mediany, interkwartyle (25% i 75%) – ramka, interdecylowe przedziały ufności (10% i 90%) – wąsy oraz punkty odstające. (Źródło: załącznik – praca A, na podstawie Ryc. 1 [21].)



Ryc. 5 Względne średnie poziomy ekspresji mRNA dla A. *MLH1* i *MLH3* oraz B. *MLH1* i *DNMT1* w raku pęcherza moczowego w zależności od stopnia zaawansowania. Wskazano średnie różnice

pomiędzy ekspresją dla poszczególnych genów. Gwiazdka (*) oznacza istotnie statystyczną różnicę pomiędzy średnimi (*: $P < 0,05$).

(Źródło: załącznik - praca A, na podstawie Ryc. 2 [21].)

6.2 Analiza metylacji DNA

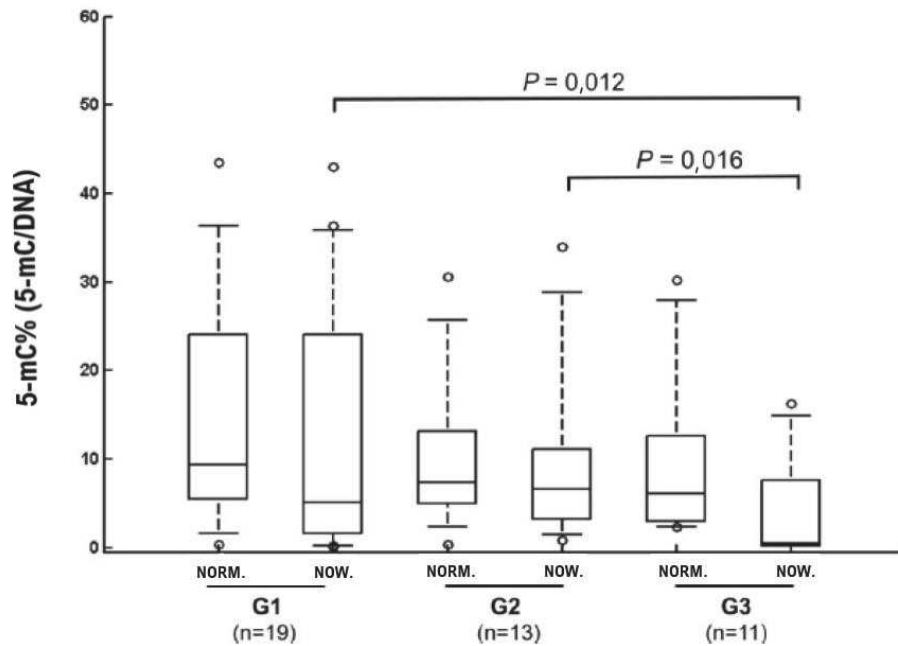
6.2.1. Metylacja regionów 5' genów

Analiza hipermetylacji regionów CpG wykazała, że metylacja regionu 5' genu *MLH1* występowała u 25% badanych pacjentów, w tym u 32% z wysokim stopniem zaawansowania. Metylację zaobserwowano jedynie u 36% pacjentów ze zmniejszoną ekspresją tego genu.

Region 5' genu *MBD4* był zmetylowany u 18% osób z rakiem pęcherza moczowego. U 66% pacjentów ze zmniejszoną ekspresją tego genu występowała metylacja. Test korelacji liniowej Pearsona wskazuje na istnienie umiarkowanej korelacji pomiędzy ilością mRNA *MBD4* i poziomem metylacji promotora *MBD4* ($r = -0,53$; $P < 0,05$). Nie znaleziono jednak zależności pomiędzy ekspresją genu *MBD4* a parametrami klinicznymi [21].

6.2.2. Metylacja ogólna DNA

W analizie metylacji ogólnej DNA, tkanka normalna wykazała podobny poziom metylacji dla próbek pacjentów (pogrupowanych według stopnia złośliwości histologicznej) w porównaniu do tkanki nowotworowej (Ryc. 6). Mediana metylacji ogólnej DNA (5-mC%) była niewiele niższa w tkance nowotworowej (6%) dla wartości w zakresie od 0,2% do 43%, niż w odpowiadającej jej tkance normalnej (9%) dla danych w zakresie od 2% do 43,5%. Co ciekawe, zawartość procentowa 5-mC była istotnie statystycznie związana z wyższym stopniem złośliwości, czyli mniejszym zróżnicowaniem (G) ($P = 0,04$; test ANOVA Kruskala-Wallisa) (Ryc. 6), czego nie zaobserwowano dla stopnia zaawansowania w tkankach pobranych od pacjentów. Nie było także korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *DNMT1* a procentem zmetylowanej cytozyny w tkance nowotworowej [21].

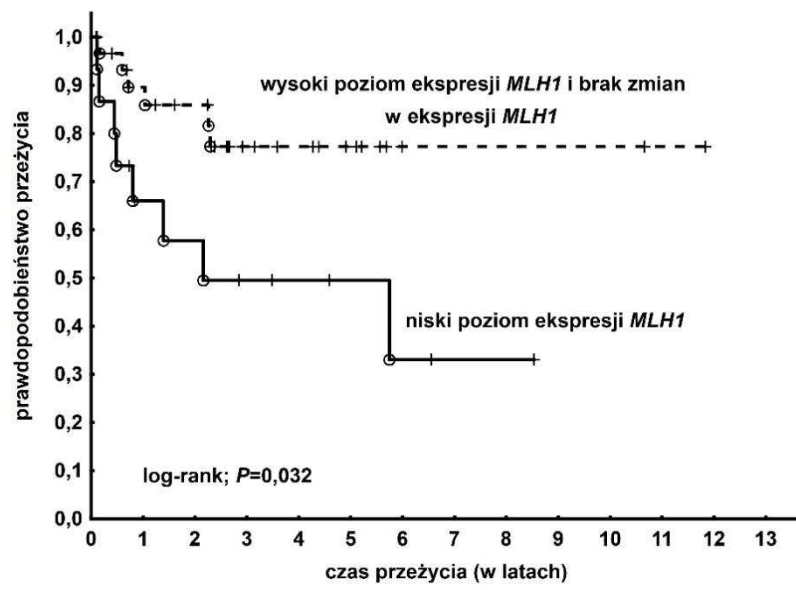


Ryc. 6 Zawartość procentowa 5-metylocytozyny porównywana w tkance nowotworowej oraz normalnej w raku pęcherza moczowego z podziałem na stopnie zróżnicowania nowotworu (G) u pacjentów. n – liczba pacjentów; now. – tkanka nowotworowa; norm. – tkanka normalna. (Źródło: załącznik – praca A, na podstawie Ryc. 2 [21].)

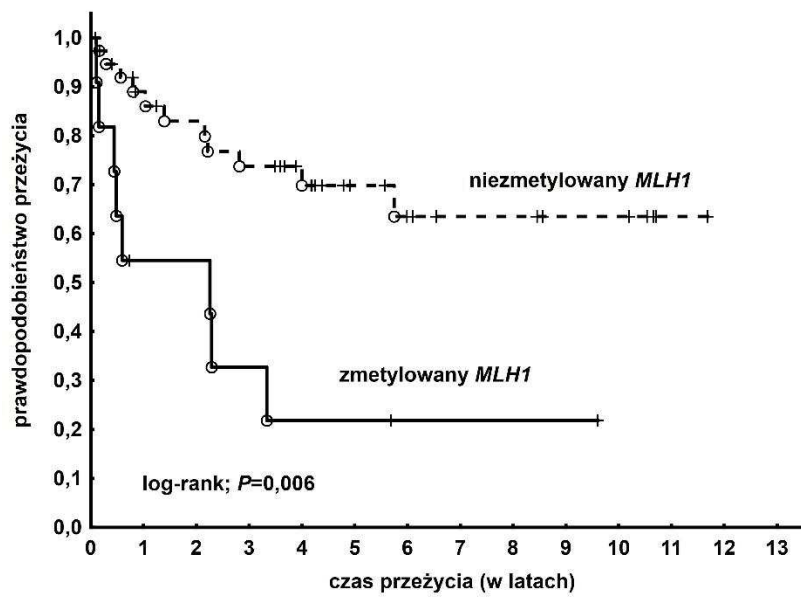
6.3 Związek pomiędzy ekspresją i metylacją promotorów wybranych genów a czasem przeżycia pacjentów

Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano nie tylko pomiędzy krótszym czasem przeżycia a zmniejszoną ekspresją *MLH1*, występującą u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego ($P = 0,032$) (Ryc. 7 A), ale także pomiędzy występującą w regionie 5' metylacją tego genu ($P = 0,006$) (Ryc. 7 B). Krótszy czas przeżycia, który również jest istotny statystycznie, występuje także u pacjentów z podwyższoną ekspresją *DNMT1* ($P = 0,002$) (Ryc. 7 C). Wydaje się interesujące, że całkowite prawdopodobieństwo przeżycia było większe u pacjentów z mniejszą ekspresją mRNA *MBD4*, mimo to wynik nie był istotny statystycznie ($P = 0,1$) (Ryc. 7 D). Zauważono także zależność pomiędzy wyższymi stopniami zaawansowania a krótszym czasem przeżycia ($P < 0,05$; test log-rank) [21].

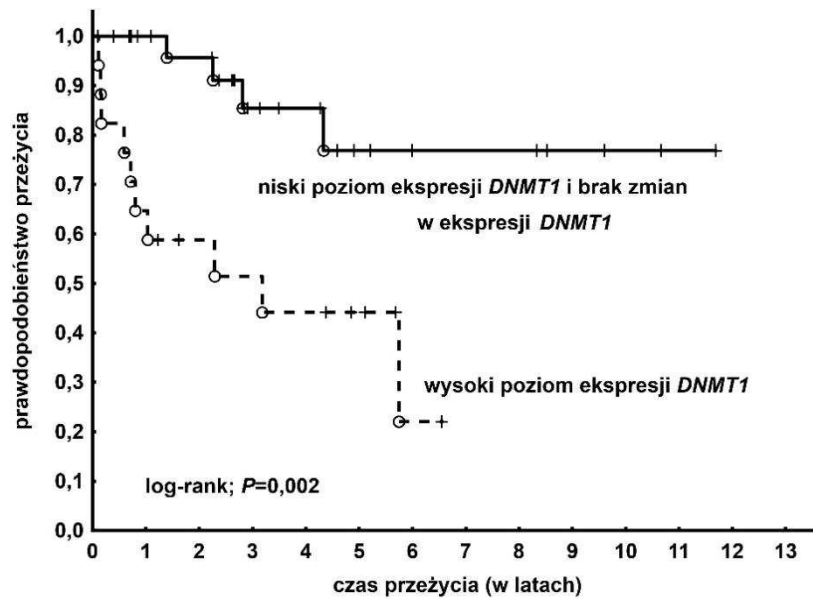
A.



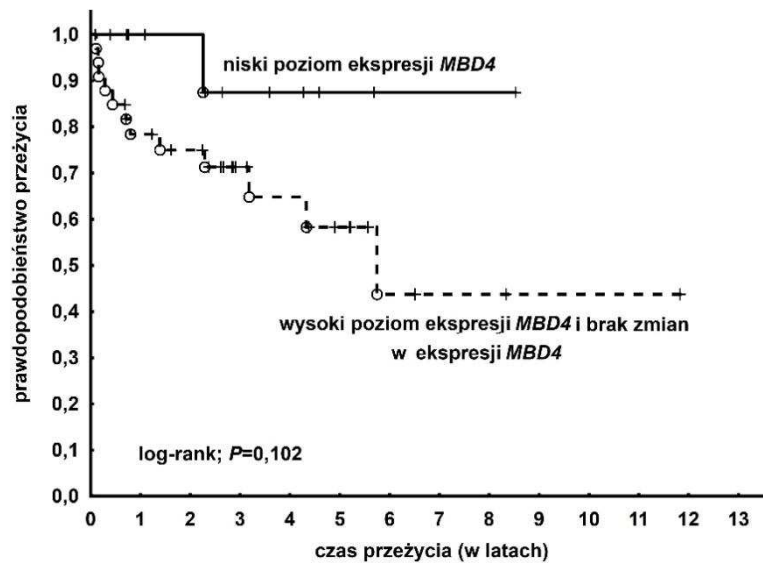
B.



C.



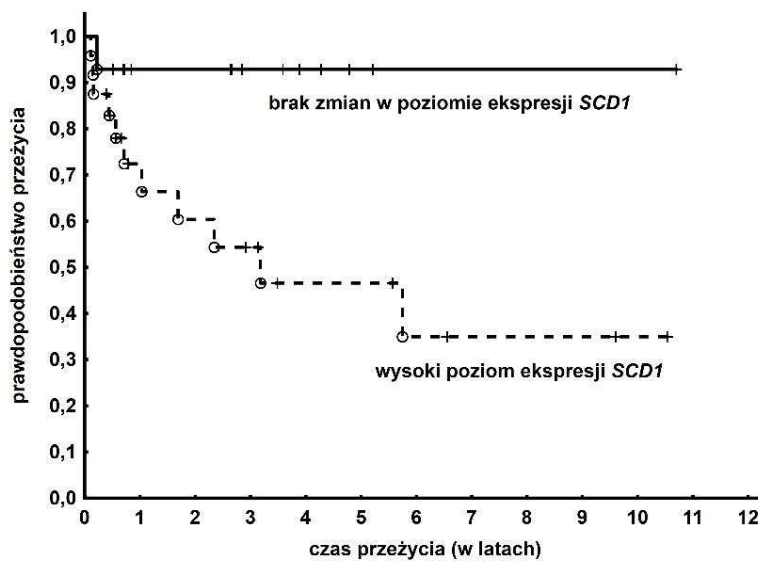
D.



Ryc. 7 Analiza Kaplana-Meiera – prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów z rakiem pęcherza moczowego A. poziom ekspresji genu *MLH1* B. status metylacji promotora genu *MLH1* C. poziom ekspresji genu *DNMT1* D. poziom ekspresji genu *MBD4*. (Źródło: załącznik – praca A, na podstawie Ryc. 2 [21].)

W doświadczalnej części pracy B, opisano m.in. zmiany ekspresji genu *SCD1* (źródło: załącznik – praca B, na podstawie Ryc. 1 a i b). Różnica pomiędzy medianami względnej ekspresji mRNA *SCD1* dla dwóch grup pacjentów (T_a/T₁ oraz T₂-T₄) była istotna

statystycznie ($P < 0,001$). Mediany wynosiły odpowiednio 1,3 i 4,7. W grupie pacjentów Ta/T1 względna ekspresja mRNA *SCD1* nie przekraczała 5, podczas gdy w drugiej grupie chorych (T2-T4) zaobserwowano wzrost tej wartości nawet do 29. Na podstawie wyników ekspresji mRNA *SCD1* wykonano analizę Kaplana-Meiera. Prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów, u których występował brak zmian w ekspresji *SCD1*, wynosiło ponad 90% (Ryc. 8). Jednakże, u osób z podwyższonym poziomem ekspresji mRNA *SCD1*, prawdopodobieństwo przeżycia istotnie statystycznie malało do 30% w ciągu 6 lat ($P = 0,021$) [111]. Zaobserwowano również, że u pacjentów z obecnym przerzutem do węzłów chłonnych, średnia wartość ekspresji *SCD1* była 2,5-krotnie wyższa, niż u chorych bez przerzutu ($P = 0,022$).



Ryc. 8 Analiza Kaplana-Meiera – prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów z rakiem pęcherza moczowego dla ekspresji genu *SCD1*. $P = 0,021$; test log-rank. (Źródło: załącznik – praca B, na podstawie Ryc. 4 A [111].)

7. Wnioski

- 1) Po raz pierwszy w raku pęcherza moczowego zbadano ekspresję mRNA genu *MLH3*. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *MLH3* a parametrami klinicznymi. Pomimo obniżonej ekspresji mRNA genu *MLH3*, podwyższona ekspresja mRNA *MLH1* może kompensować niski poziom mRNA *MLH3* u pacjentów ze stopniem zaawansowania nowotworu Ta/T1.
- 2) Nieznacznie obniżony poziom ekspresji mRNA genu *MBD4* został zaobserwowany u prawie połowy pacjentów z wysokim prawdopodobieństwem wieloletniego przeżycia (Ta/T1). *MBD4*, podobnie do *MLH3*, nie odgrywa kluczowej roli w nowotworzeniu pęcherza moczowego.
- 3) Wykazano, że podwyższona ekspresja mRNA genu *SCD1* jest związana ze stopniem zaawansowania, przerzutami do węzłów chłonnych oraz krótszym czasem przeżycia pacjentów z rakiem pęcherza moczowego.
- 4) Podwyższony poziom ekspresji mRNA *DNMT1* i obniżona względna ekspresja mRNA *MLH1*, a także metylacja promotora *MLH1* zostały zaproponowane jako markery prognostyczne krótszego czasu przeżycia pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Wytypowane negatywne czynniki prognostyczne mogą mieć aplikacyjne znaczenie w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

8. Dyskusja

Efektywne mechanizmy naprawy DNA i obrona komórkowa wraz z wysoką opornością na indukujące stres warunki środowiskowe, mogą być odpowiedzialne za brak starzenia się i długowieczność organizmów, dlatego dokładne ich poznanie mogłoby spowolnić proces starzenia i rozwój związanych z wiekiem patologii, w tym nowotworów.

Istnieją modele prognostyczne dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, jednakże wytypowanie nowego zestawu markerów molekularnych, które mogłyby grupować chorych zależnie od czasu przeżycia, pozwoliłoby wybrać tych, którzy mają zmniejszone ryzyko śmierci na wczesnym etapie choroby [112].

W przypadku *MBD4*, można przypuszczać, że metylacja promotora tego genu przyczynia się do jego wyciszenia, lecz nie jest ona jedynym mechanizmem. Niska częstość występowania metylacji *MBD4* wskazuje niewielkie znaczenie tych zmian w rozwoju raka pęcherza moczowego. Jest to spójne z badaniami nad rakiem jelita grubego, gdzie była ona zaobserwowana u 24% procent pacjentów [43]. Wydaje się, że zmniejszona ekspresja *MBD4* jest związana z NMIBC. Ze względu na podobną rolę *MBD4* i *TDG*, można przypuszczać, że *TDG* przejęło funkcję *MBD4*, o czym może świadczyć brak istotnych statystycznie różnic dla ekspresji *TDG* wśród chorych. W pierwotnym raku piersi, niską ekspresję białka *MBD4* znaleziono w dobrze zróżnicowanym nowotworze, podczas gdy wysoką w słabo zróżnicowanym. Ponadto wykazano, że reprogramowana metylacja DNA zależna od *MBD4* jest indukowana przez szlak sygnalizacyjny *RON/MSP* i jest wymagana do przerzutowania raka piersi [41]. Nieznacznie obniżony poziom ekspresji *MBD4* u pacjentów nie wskazuje na jego istotną rolę w raku pęcherza moczowego.

Na podstawie niższej średniej dla krotności zmian ekspresji *MLH1* i *MLH3* w grupie pacjentów z NMIBC, można przypuszczać że *MLH1* może funkcjonalnie oddziaływać z innym homologiem MutL, który pozwala na kompensację niedoboru *MLH3* w przypadku raka pęcherza o niskim stopniu zaawansowania. Bazując na tym wyniku, a także na innych badaniach opisanych w pracy A (załącznik), można stwierdzić, że *MLH3* nie odgrywa istotnej roli w raku pęcherza moczowego.

Jedną z możliwości inaktywacji systemu MMR jest metylacja promotora *MLH1*, występująca u znacznej liczby pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita grubego [113]. Częstość metylacji regionu 5' *MLH1* potwierdzono u 42% pacjentek z rakiem szyjki macicy, a także u 13% pacjentów z nieinwazyjnym rakiem pęcherza moczowego [65,114]. Zbadana metylacja genu *MLH1* wyniosła 25% (z częstością 32% w inwazyjnym raku pęcherza). Jest

ona znacznie wyższa niż podana przez Catto i in., t.j. 1% pacjentów z rakiem pęcherza [115], ale podobna do 29,6% obserwowanych u pacjentów z nieinwazyjnym nowotworem [116]. Metylacja promotora jest najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wyciszenia ekspresji tego genu, jednakże nie jedynym. Metylacja występowała tylko w 36% prób, w których zaobserwowano zmniejszenie ekspresji *MLH1*. Wynik ten nie jest zaskakujący, ponieważ wykazano, że obniżenie ekspresji genów, kodujących białka należące do systemu MMR takie jak *MLH1*, *MSH2* i *MSH6*, może być spowodowane przez mikroRNA [117]. Niska częstość występowania metylacji regionu promotorowego *MLH1*, sugeruje że nie jest ona cechą wiodącą i wspólną dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, natomiast jeśli jest obecna, to wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentów.

Stwierdzono obecność wysokiego poziomu ekspresji *DNMT1* w inwazyjnym raku pęcherza moczowego. Wykonana analiza wskazuje na komplementarność i podobieństwo do wyników opublikowanych przez Wu i in., które potwierdzają występowanie podwyższonego poziomu *DNMT1* w tkankach nowotworowych pacjentów z rakiem pęcherza [59]. Zaobserwowano również podwyższony poziom ekspresji mRNA *DNMT1* przy jednoczesnym obniżonym poziomie ekspresji mRNA *MLH1* w grupie pacjentów z bardziej zaawansowanym nowotworem. Może to sugerować zależność pomiędzy aktywnością *DNMT1* a wyciszeniem ekspresji genu *MLH1*. W badaniu z użyciem linii komórkowej raka jelita grubego (SW48), gdzie podano inhibitor *DNMT1* (5-aza-2'-deoksytydynę), aktywowano ekspresję *MLH1* [118]. Dodatkowo, wysoka istotność statystyczna dla zależności podwyższonej ekspresji *DNMT1* oraz krótszego czasu przeżycia pacjentów powoduje, że analiza poziomu mRNA dla *DNMT1* może stać się atrakcyjnym biomarkerem prognostycznym.

Obecność ogólnej hipometylacji DNA zarówno w tkance nowotworowej jak i normalnej, przylegającej do nowotworu, może być uzasadniona tym, że pewne mechanizmy epigenetyczne w otaczającym urotelium są takie same jak w tkance nowotworowej. Podobieństwo epigenetyczne, czasami genetyczne, może być konsekwencją procesu nowotworzenia w obrębie danego obszaru lub konsekwencją starzenia. Obecność hipometylacji DNA w raku pęcherza w morfologicznie normalnej tkance potwierdzono także w cytologii złuszczeniowej moczu [119]. Nasze dane potwierdzają także hipotezę wczesnej globalnej demetylacji w raku pęcherza zaproponowanej przez Seifert'a i in. [119]. Pomimo istnienia korelacji pomiędzy ogólną hipometylacją DNA a wyższym stopniem złośliwości raka pęcherza, obecność hipometylacji w tkance normalnej powoduje, że analiza metylacji ogólnej DNA nie znajduje uzasadnienia w aplikacji klinicznej dla pacjentów.

Po raz pierwszy wykazano zależność pomiędzy mRNA *SCD1* a klinicznymi parametrami raka pęcherza moczowego. Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania analizy genu *SCD1* w prognozowaniu czasu przeżycia. Wysoki poziom ekspresji mRNA genu *SCD1*, a także obniżony poziom ekspresji mRNA genu *MLH1*, metylacja sekwencji 5' *MLH1* i podwyższony poziom mRNA *DNMT1* są związane z krótszym czasem przeżycia pacjentów, tym samym mogą być uznane jako potencjalne markery prognostyczne raka pęcherza moczowego. Jako niekorzystne czynniki rokowania chorych miałyby one znaczenie w codziennej praktyce lekarskiej, zwłaszcza podczas interpretacji wyników pacjentów przed lub po zdiagnozowaniu choroby, a także przy wyborze odpowiedniej strategii terapeutycznej, zwiększając szanse szybszego wyleczenia i dłuższego przeżycia.

9. Streszczenie

Rak pęcherza moczowego jest zróżnicowanym nowotworem pod względem występowania podtypów molekularnych. Diagnozowanie chorych na raka pęcherza moczowego na podstawie charakterystyki molekularnej nowotworu pozwoliłoby na wczesne i skuteczne prognozowanie czasu przeżycia pacjenta, a tym samym na zastosowanie odpowiedniej terapii.

Systemy naprawy DNA odgrywają istotną rolę podczas uszkodzeń DNA spowodowanych np. stresem oksydacyjnym. Zakłócenia homeostazy komórki, wynikające z nieprawidłowego funkcjonowania systemów naprawy DNA, mechanizmów epigenetycznych i zaburzeń metabolicznych przyczyniają się do rozwoju nowotworu.

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie ekspresji wybranych genów związanych z naprawą DNA (w tym *MLH1*, *MLH3*, *MBD4*, *TDG*), *SCD1* – związanego z metabolizmem lipidów i *DNMT1*, którego produkt bierze udział w metylacji DNA, a także określenie statusu metylacji lokalnej i ogólnej w tkankach pobranych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyselekcjonowanie potencjalnych markerów prognostycznych.

Po zbadaniu statusu metylacji regionów 5' i ekspresji mRNA wybranych genów, wykonano analizę ich zależności z parametrami klinicznymi pacjentów. Wyniki wykazały podwyższony poziom ekspresji genu *DNMT1*, obniżoną ilość mRNA *MLH1* oraz metylację promotora tego genu, a także wysoki poziom ekspresji mRNA *SCD1* szczególnie w nowotworze inwazyjnym. Wymienione cechy charakteryzują pacjentów z krótszym czasem przeżycia. Dodatkowo, po raz pierwszy zbadano związek pomiędzy parametrami klinicznymi pacjentów z rakiem pęcherza moczowego a ekspresją mRNA genów *MBD4*, *MLH3* i *SCD1*. Wyodrębniono także te geny (*MBD4*, *TDG*), które prawdopodobnie nie pełnią wyraźnie istotnych funkcji w tym nowotworze.

Wyniki z publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, mogą stanowić interesujące uzupełnienie istniejących już testów prognostycznych, wnosząc dodatkowe informacje z zakresu biologii molekularnej o zwiększonej wartości potencjału aplikacyjnego.

10. Introduction

10.1 Human bladder cancer and carcinogenesis

Bladder cancer (BC) was the cause of death of about 165,000 people and 429,000 new cases. BC was the ninth most frequently diagnosed cancer in both sexes in the world in 2012 [1]. Men suffer from 3 to 4 times more often than women. During the diagnosis, women have a locally more advanced cancer [2]. Over 90% of cases are urothelial [3]. Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) is limited to the mucosa (stage Ta and *in situ* – CIS) or submucosa (T1) in approximately 75% to 85% of patients. Muscle invasive bladder cancer (MIBC) infiltrating the muscle of the bladder (T2-T4) occurs in 25% of patients [4]. Progression to MIBC is found in 15-20% of patients with NMIBC. Half of these patients die because of progression [5]. The age-standardized 5-year relative survival of patients (with NMIBC and MIBC) was estimated at 70% in Europe [6]. Information about prognosis is very important, especially due to the characteristic for this cancer (both NMIBC and MIBC) high rate of recurrences and rapid progression with deaths caused by metastases. From 50% to 70% of patients with NMIBC experience a recurrence within 5 years. 10-30% of patients develop progression within 5 years [7,8].

Bladder cancer constitutes a heterogeneous group of tumors with various malignant potential, which is important in the selection of appropriate therapy. Characteristic changes in genes like *EGFR*, *PPARG* or *FOXAI* are investigated in the molecular subtypes of BC [5]. Distinctive for NMIBC are mutations in *FGFR3* and *HRAS*, while for MIBC are mutations in *TP53* and *RB* [9–11]. It was noticed that the frequency of mutations in regulatory chromatin genes (like *MLL2*, *ARID1A*, *KDM6A*, and *EP300*) is higher in BC than in other cancers [12]. Clinical prognosis factors are known, including clinical stage (T) and histological grade (G) of BC that can be used to assess overall survival. However, finding a molecular pattern can help not only in a decision about more intensive therapy for patients at higher risk of progression or recurrence (characteristic of NMIBC), but also in estimating the individual risk of death. Therefore, there is a research need for disease-specific markers that do not require high costs, including easy-to-perform methods with sufficient sensitivity in order to detect changes at an early stage of carcinogenesis.

10.2 DNA repair systems and carcinogenesis

The cellular DNA is under continuous damage risk by environmental factors and metabolic processes. The ability to DNA repair is fundamental to cell survival. The genomic

stability of the organism is maintained by base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), mismatch repair (MMR), non-homologous end joining (NHEJ), homologous recombination (HR), direct repair (DR), among others (Fig. 1, based on paper C) [13].

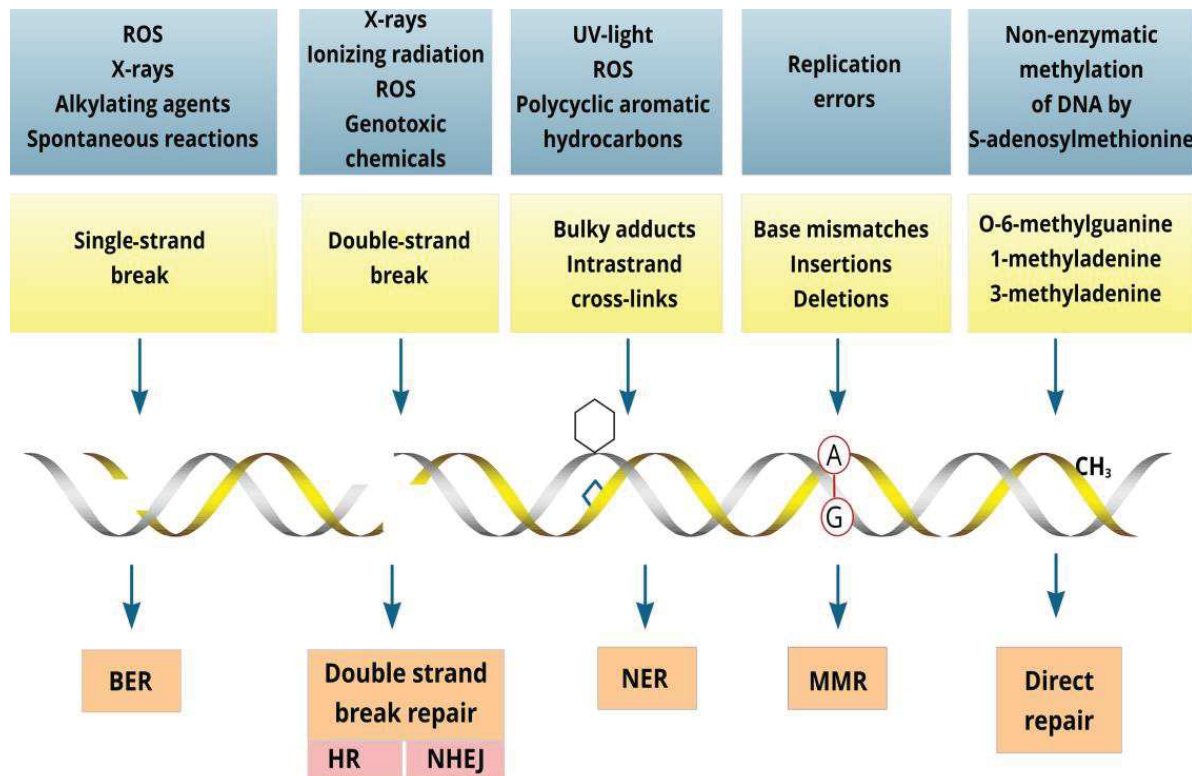


Fig. 1 DNA damage and its repair mechanisms. Endogenous and exogenous DNA damage factors, examples of DNA damage and appropriate repair mechanisms. (Source: attachment – paper C, based on Fig. 1 [14]).

Single bases of DNA can be deaminated, alkylated and oxidized by reactive oxygen species (ROS). BER mechanism removes endogenous DNA damage that can cause mutations by mismatched base pairing or lead to double-strand breaks during replication (Fig. 1, based on paper C). Alkyl group from modified O-6-guanine can be removed by direct repair which requires O-6-methylguanine methyltransferase enzyme (MGMT). This mechanism is accurate and does not require a nucleotide matrix. NER pathway removes damage caused by UV radiation as well as large changes caused by environmental mutagens and some chemotherapeutics [15]. MutL homolog 1 (MLH1 (hMLH1)) and mutL homolog 3 (MLH3) belong to the MMR system, related to the post-replication mismatched bases resulting from amongst others DNA polymerase slippage during replication of repetitive DNA sequences

[16]. The MMR system is also involved in genomic stability maintenance and homologous recombination inhibition [17]. Double-strand DNA breaks (DSB) that arise from UV exposure, ionizing radiation or extreme destruction by alkylating substances are repaired by HR or NHEJ systems. Contrasting to NHEJ, HR does not generate errors due to the requirement of sequence homology between damaged and template strands [18]. All these DNA repair systems perform important functions because of their participation in hereditary diseases, neurodegeneration, aging, and cancer [13,19–21].

10.3 Epigenetics mechanisms

Promoters methylation of DNA repair genes or tumor suppressors plays an important role in the process of carcinogenesis [22]. Epigenetic silencing (local hypermethylation of CpG islands) is characteristic for tumors, including bladder cancer and may be one of its diagnostic and prognostic markers [23]. Global genome hypomethylation that causes changes in the expression of genes involved in cell survival and proliferation is observed in cancers. The progression of some tumors is associated with DNA hypomethylation. Therefore, it is suggested to use global DNA methylation as a complementary marker in the diagnosis of cancer [24,25].

Fatty acids can directly or indirectly affect epigenetic changes [26]. Acetyl-CoA, as a product of fatty acids degradation (β -oxidation), is involved in histone acetylation (open chromatin – active gene expression) [26,27]. Histone acetylation is regulated by the metabolic state – the availability of acetyl-CoA and the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) in the nucleus, not only during normal cell function but also in pathological conditions [28–30].

Compounds that play a role in the regulation of chromatin status, participate also in lipid metabolism (e.g., acetyl-CoA, S-adenosylmethionine (SAM)) [28]. Similarly, chromatin modifications influence the expression of genes involved in lipid metabolism pathways (including synthesis, degradation, storage) [26]. Histone methyltransferases (HMTs) and DNA methyltransferases use SAM not only as a methyl donor to 5' carbon of cytosine or to lysine and arginine residues in histones, but also to convert phosphatidylethanolamine (PE) to phosphatidylcholine (PC) [31,32]. It is possible that lower availability of SAM, necessary for DNA methylation, is caused by increased synthesis of phospholipids (PE methylation to PC). Decreased SAM level may be important in prolonging life. Changes in SAM availability could explain its central role in lipid metabolism and DNA/histone methylation during aging [26].

10.4 The role of selected DNA repair genes and *DNMT1* in bladder cancer development

BC is strongly associated with exposure to chemical reagents that cause DNA damage. Smoking cigarettes, drinking arsenic-contaminated water, chronic infections caused by *Schistosoma*, occupational exposure (e.g., to aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons), exposure to ionizing radiation can cause BC. More than 50% of BC is associated with cigarette smoking [10,33,34]. The increased mutation number in *ERCC2* gene (NER system) compared to other tumors has been observed in BC. Mutations in this gene were associated with cigarette smoking [35]. To prevent genetic and epigenetic changes, DNA repair processes are triggered [36]. The proper functioning of DNA repair systems is important because among others their defects lead to chemoresistance and radiotherapy resistance. Moreover, some cancer cells (e.g. liver) have a strong ability to repair DNA damage, which may be the reason for a recurrence after radiotherapy. In order to increase the effectiveness of radiotherapy (or chemotherapy), specific inhibitors are used that inhibit the action of proteins involved in DNA repair to increase the sensitivity of cancer cells to therapy [37–40].

Expression of genes *MBD4* (also known as *MED1*), *MLH3* and *TDG* (coding for DNA glycosylase, mutL homolog 3 and thymine glycosylase, respectively) has not yet been determined in human BC. Moreover, TDG plays roles of the DNA glycosylase and demethylase as well as interacts with transcription factors [41,42]. Loss of TDG function may contribute to carcinogenesis [43,44]. TDG and MBD4 belong to the BER system and express similar activity [45,46]. MBD4 interacts with MLH1 [46]. MBD4 has a thymine and uracil glycosylase domain as well as a methyl group binding domain. It binds to the methylated CpG islands and inhibits transcription by recruiting corepressors modifying chromatin structure [47,48]. It can also cause demethylation [48]. *MBD4* gene mutations were found in 20-43% of patients with pancreatic, endometrium and colon cancer [49,50]. The reduced expression of *MBD4* mRNA was also present in patients with liver cancer and was significantly statistically correlated with poorly differentiated cancer [51]. In contrast to liver cancer, increased expression was observed in glioblastoma [52]. In sporadic colon cancer, *MBD4* promoter methylation and its decreased expression were present at an early stage of the disease with a tendency to lower expression at higher tumor stages [43].

MBD4 interacts with DNA methyltransferase 1 (DNMT1), which is the essential element of transcriptional repression complex [53]. DNMT1 is involved in methylation maintenance and can be responsible for the *de novo* methylation of CpG islands [54,55].

DNMT1 overexpression resulting in local hypermethylation of DNA may cause more aggressive tumor growth [56,57]. DNMT1 is not only responsible for methylation of DNA but also participates in the MMR system (Fig. 2) [58–61].

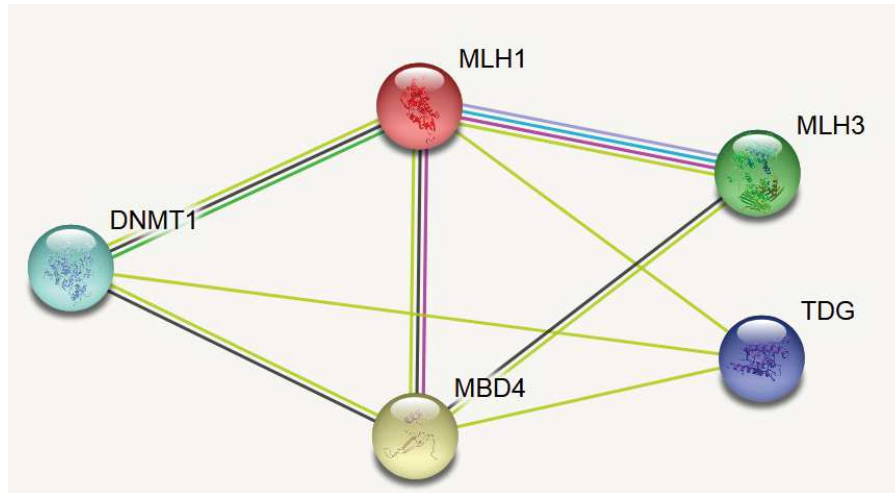


Fig. 2 Known and predicted interactions for DNMT1 and DNA repair proteins (based on STRING database [62]). Line color indicates the type of interaction evidence: blue – curated databases, pink – experimentally determined, dark green – gene neighborhood, light green – text mining, red – gene fusions, violet – protein homology, black – co-expression. Confidence (medium): 0.4.

MLH1 and MLH3 belong to the MMR system. Mutations in *MLH1* or other genes of the MMR system lead to microsatellite instability which is closely related to hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) – Lynch syndrome [63]. *MLH1* inactivation has also been observed in cancers like gastric [64], ovarian [65], non-small cell lung (NSCLC) [66], bladder [67] and many others. MLH1 forms heterodimers with: PMS2 (MutL α complex), PMS1 (MutL β complex) or MLH3 (MutL γ complex). The MutL γ complex can be observed during meiotic recombination [68]. Studies have shown that MLH1/MLH3 heterodimer can participate in the repair of mismatched bases and small insertion/deletion loops (IDLs) in mice [69]. Due to the interaction with the MLH1 protein, it has been proposed that MLH3 may play a role in tumorigenesis. Mutations in the gene encoding MLH3 protein are rare. The functional and prognostic role of MLH3 is not yet known [70].

10.5 The role of *SCD1* gene encoding the enzyme that participates in lipid metabolism in bladder cancer

A rapidly dividing cancer cell is characterized by an increased need for lipids which are a component of cellular structures, the main energetic and storage material of the organism and are involved in cell signaling. Thus, changes in lipid metabolism are one of the hallmarks of cancer [71–75]. Increased lipogenesis (synthesis of fatty acids), lipid uptake and storage are observed in many types of cancer [76]. Changes in fatty acid oxidation and their biosynthesis were observed in BC [72]. Previous studies on the activity of enzymes such as fatty acid synthase (FASN) and ATP-citrate lyase (ACLY), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and phosphogluconate dehydrogenase (PGD) (providing NADPH for palmitate synthesis) indicate an increased level of lipogenesis in BC. In addition, a higher activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD) which provides a substrate (glycerol-3-phosphate) for the synthesis of triacylglycerols was also observed [77].

SREBF (SREBP) proteins, key transcriptional factors that bind sterol regulatory element, regulate the synthesis of fatty acids (SREBP1c), as well as synthesis and uptake of cholesterol (SREBP2), while SREBP1a can affect genes expression of biosynthesis of fatty acids and cholesterol [76,78]. FASN (the key enzyme of lipogenesis) overexpression is associated with aggressiveness and resistance to cancer chemotherapy [80,81]. Effective inhibitors that affect genes expression involved in lipid metabolism (including lipogenesis) are needed for inhibition of tumors development [76].

Stearoyl-CoA 1 desaturase (SCD1) – $\Delta 9$ desaturase – is highly expressed in tumors [71,82–84]. Therefore one of the goals of antitumor therapy is the search for effective inhibitors of SCD1 activity [76]. This protein's function is the conversion of saturated acyl-CoA (mainly 16:0 palmitoyl-CoA and 18:0 stearoyl-CoA) to monounsaturated acyl-CoA (16:1 $\Delta 7$ palmitoleoyl-CoA and 18:1 $\Delta 9$ oleoyl-CoA, respectively) [85]. Monounsaturated products of SCD1 activity are key substrates for the formation of lipid membranes phospholipids, cholesterol esters and triacylglycerols [68]. An increased level of *SCD1* gene expression has been proposed, which is associated with the upregulated level of monounsaturated fatty acids in blood and cancer tissues in breast cancer patients [71]. SCD1 activity is regulated mainly at the level of transcription [86]. Transcription of *SCD1* and other lipogenic genes in the liver, adipose tissue, and cancer cells is regulated mainly by SREBP1c [87–90]. SREBP1 overexpression is observed in the prostate, endometrium, gastric or

pancreatic cancer [91–94]. However, little is known about the expression of *SREBP1*, *SCD1*, and *FASN* in human BC.

10.6 DNA damage, lipid metabolism and carcinogenesis

Cellular dysfunctions and oxidation stress accelerate aging and cancer due to for example increased metabolic activity of cell, genetic/epigenetic modifications and inhibition of cell survival processes [31]. Modifications of DNA and histones, followed by transcription, cause changes in the level of such metabolites as, e.g. acetyl-CoA or SAM. There is a need for continuous research to prove that both changes in DNA repair systems and lipid metabolism disorders cause carcinogenesis and aging.

10.6.1. Lipids, genetic and epigenetic changes in aging

Changes in lipid metabolism may affect physiological processes through changes in chromatin status. Modifications at the level of histones and DNA are important mechanisms regulating the expression of genes involved in cell survival and its longevity. Post-translational histone modifications (such as acetylation and methylation of lysyl residues) depend on enzymes availability, activity and functions that change during aging [26]. Histone synthesis is reduced in aging cells with damaged DNA, which affects cellular homeostasis [95].

There are organisms (*Caenorhabditis elegans*) in which chromatin modifiers affect longevity through regulation of fatty acids desaturation. There are known transcriptional regulators that increase the expression of *fat-7* (*SCD1* ortholog) and lead to an increase in the amount of MUFA (including palmitoleic acid), thus contributing to the life extension of these organisms [96,97]. It is interesting how MUFA could affect the length of life and whether this effect occurs in human. It is also interesting to examine the role of *SCD1* in the aspect of longevity in vertebrates.

TET dioxygenases and lysine demethylases (KDMs) which are responsible for demethylation of DNA and histones require the presence of α -ketoglutarate for their activity [98]. In the case of mutations in *IDH1* and *IDH2* genes (encoding isocitrate dehydrogenase 1 and 2), a large amount of 2-hydroxyglutarate (instead of α -ketoglutarate) is formed [28]. As a consequence, TET dioxygenases and KDM cannot function, contributing to the accumulation of methylation, which may cause the silencing of tumor suppressors genes [104].

Due to the possibility of modifications of chromatin and gene expression, a cell is able to restore the balance of lipid metabolism. However, mechanisms of the influence of lipids on longevity and their regulation during aging are not yet known. It seems that selected lipids

activate transcription profiles that significantly contribute to the prolongation of life by local interaction with transcription factors or (and) global influence on the chromatin structure [26].

10.6.2. DNA damage and aging

The difference in lifespan and heterogeneity of the aging phenotype in the same species results from genetic and environmental factors. Epigenetic changes, along with genomic instability, telomere shortening, deregulated nutrient-sensing pathways (insulin/IGF-1, mTOR, sirtuin 1 and AMPK – based on Fig. 2 of paper C), cellular aging, mitochondrial dysfunction, stem cell exhaustion, diversification of intercellular communication and the loss of proteostasis are 9 characteristics of aging process. Aging is a very complex and multifactorial biological phenomenon [99]. Among theories that propose a mechanism linking metabolism with aging are DNA damage, gene regulation, rate of living, neuroendocrine, and free radical theory of aging [100,101].

The most widely accepted explanation of what determines the longevity of life is the free radical theory of aging, which has developed into the oxidative stress theory and its extension – theory of the membrane pacemaker. The latter highlights the effect of fatty acid composition in the membrane on lipid peroxidation and, consequently, on the rate of aging. Oxidative stress theory postulates that ROS, arising mainly in the mitochondria, spontaneously oxidize and damage macromolecules such as lipids, proteins and nucleic acids causing loss of vital cell functions [102]. In addition to the role of signaling in cellular aging and apoptosis, high concentrations of ROS contribute to mutagenesis and genomic instability (one of the characteristic signs of aging) [103–106]. The integrity and stability of nuclear and mitochondrial DNA are maintained by comprehensive DNA repair mechanisms [107,108].

The relationship between DNA damage and maximum life expectancy suggests that factors and processes that increase DNA damage and reduce the possibility of its repair may accelerate aging [109]. Moreover, DNA damage can be reduced by slowing down of metabolic rate, reducing calories in diet or increasing fidelity of DNA repair [110]. Therefore, it seems possible to delay aging by stimulating or improving the efficiency of DNA repair mechanisms.

Long-living organisms play a major role in understanding the mechanisms of aging and cancer. The aging process in humans is different than in other long-lived organisms (like Bowhead whale – *Balaena mysticetus*, described in paper C), but they can help in the analysis of the relationship between DNA repair mechanisms, energy metabolism, and aging. Healthy, long-living organisms can help in the identification of genes and processes that protect against

diseases. Knowledge about the mechanisms of tumor suppression in long-living organisms could be used in the protection of humans (based on paper C).

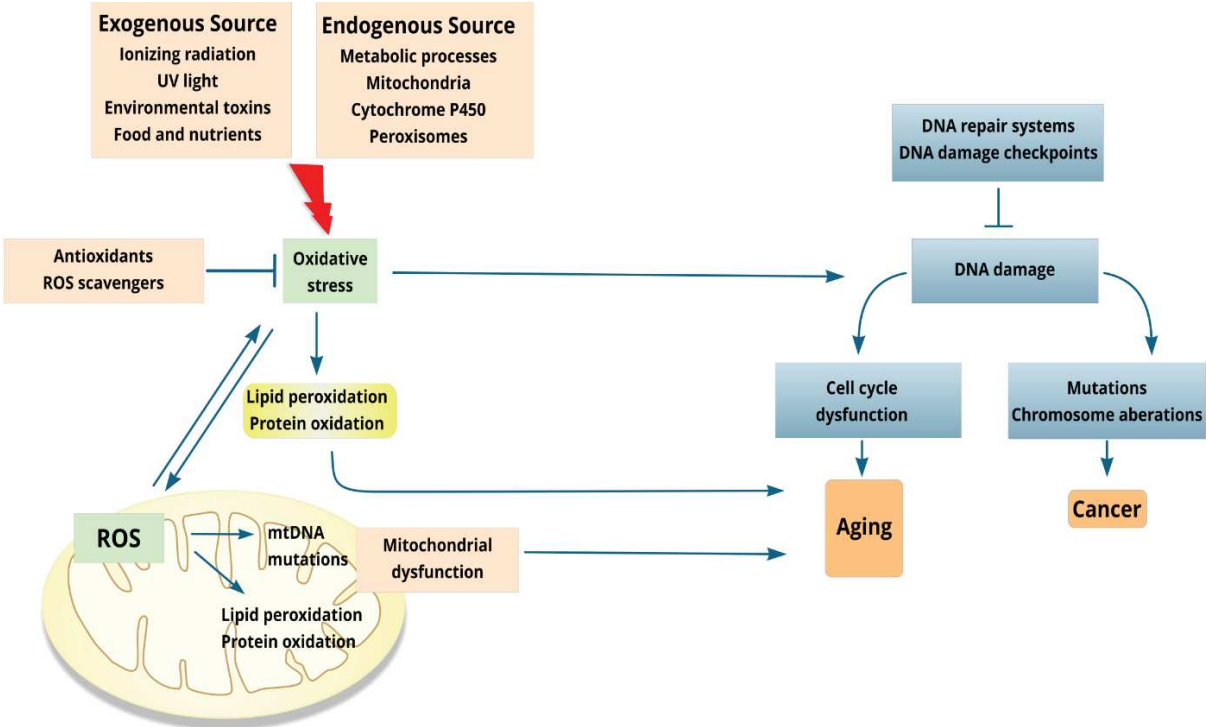


Fig. 3 Explanation of the oxidative stress effect on aging and cancers through selected pathways in humans. Many exogenous and endogenous factors can lead to oxidative stress which has a major impact on DNA damage and mitochondrial functions that result in aging and cancer. Arrows indicate activation and straight line shows inhibition. (Source: attachment – paper C, based on Fig. 2. [14])

11. Goals

The aim of this study was to find molecular markers of one of the human urinary tract cancers and to assess their diagnostic and prognostic potential, in particular:

- 1) Identification of markers of human bladder cancer based on: a) mRNA expression analysis of selected DNA repair and lipid metabolism genes, and DNA methyltransferase; b) methylation analysis of 5' regions of selected DNA repair genes; c) global DNA methylation profile.
- 2) Finding the association between molecular and clinical parameters of patients.
- 3) Prognostic and diagnostic value determination of the results obtained for the expression of the examined genes and local and global methylation.

12. Results

12.1 DNA repair genes and *DNMT1* mRNA expression

In the experimental part of paper A, the relative level of expression of *MBD4* was reduced in 28% (15/50) of patients. The decreased level of *MLH3* and *MLH1* genes expression was confirmed in 34% (17/50) and 36% (18/50) of patients with BC, subsequently. The remaining analyses showed higher expression (*DNMT1*) or no changes (*TDG*) in examined genes.

A statistically significant difference ($P < 0.003$, Mann-Whitney U test) was obtained for Ta/T1 (NMIBC) and T2-T4 (MIBC) groups for *MBD4* expression. The reduced expression was observed in 46% NMIBC patients, and only in 11% MIBC patients. However, there were small differences in the fold change (Fig. 4 A).

In 59% NMIBC patients, decrease in *MLH3* gene expression was observed, which compared to 12% MIBC patients was statistically significant $P = 0.008$ (Mann-Whitney U test) (Fig. 4 B).

No statistical significance was observed for *MLH1* mRNA decrease in 16% Ta/T1 and in 32% T2-T4 patients. Average fold change of *MLH3* was lower than *MLH1* gene expression in NMIBC patients and was statistically significant ($P = 0.03$, Student's t-test) (Fig. 5 A). Results for T2-T4 patients with *MLH1* decreased expression and simultaneous increased *DNMT1* expression were statistically significant ($P = 0.02$, Student's t-test) (Fig. 5 B).

Increased *DNMT1* expression occurred among 34% (17/50) patients with BC. Over half of T2-T4 patients (52%) had increased expression of *DNMT1*, but Ta/T1 patients constituted 16%. The range of fold changes in mRNA expression for NMIBC patients ranged from -10 to 3.6, while for MIBC patients from -3.5 to 10.6. These results were statistically significant ($P < 0.001$) (Fig. 4 C).

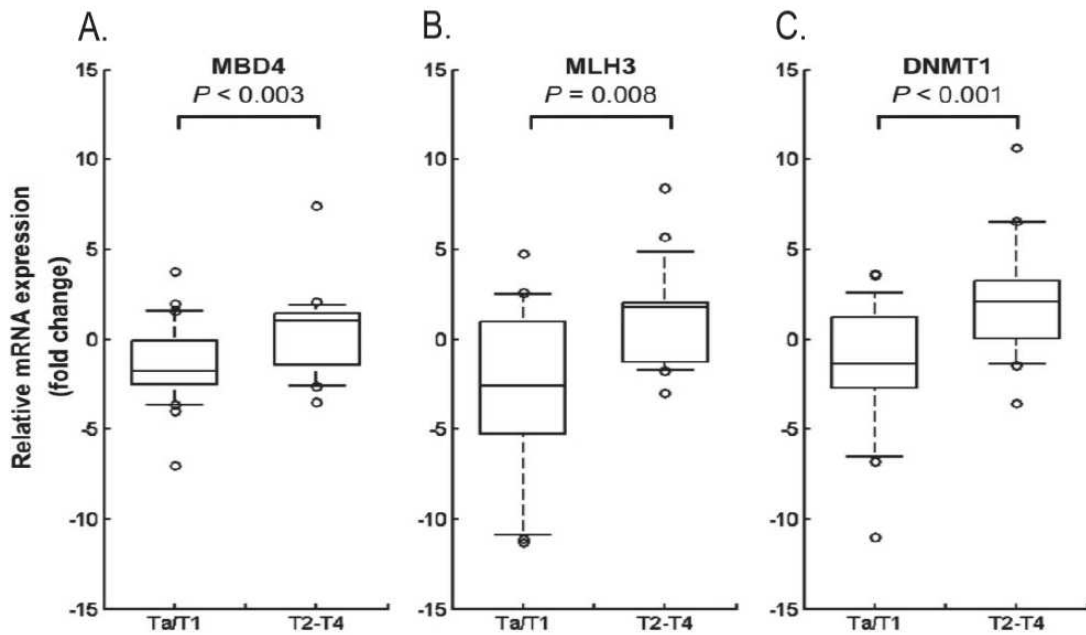


Fig. 4 Relative mRNA expression for **A. *MBD4***, **B. *MLH3*** and **C. *DNMT1*** in Ta/T1 and T2-T4 BC. Expression was normalized (geometric mean of cyclophilin (PPIA) and ATP synthase F1 subunit beta (ATP5F1B)). Box plots show fold change of relative mRNA expression using median, interquartile (25% and 75%) – box; interdecile confidence intervals (10% and 90%) – whiskers; and outliers. (Source: attachment – paper A, based on Fig. 1 [21].)

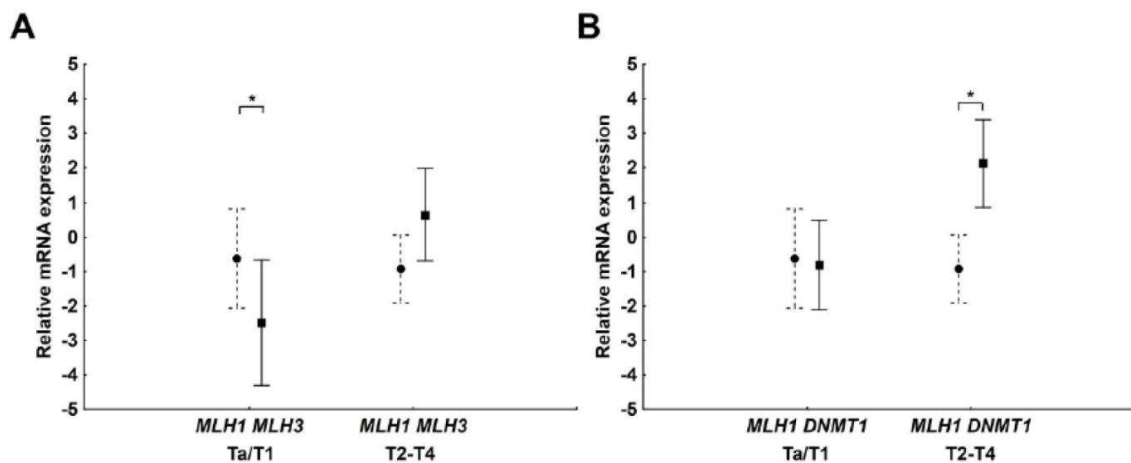


Fig. 5 Mean of relative mRNA expression (fold change) **A. *MLH1* and *MLH3*** **B. *MLH1* and *DNMT1*** in Ta/T1 and T2-T4 BC. The mean differences between the expression for individual genes are indicated. An asterisk (*) shows a statistically significant difference between the means (*: $P < 0.05$). (Source: attachment – paper A, based on Fig. 2 [21].)

12.2 Methylation analysis

12.2.1. Methylation of 5' regions genes

Analysis of CpG regions hypermethylation showed that methylation of the 5' region of the *MLH1* gene occurred in 25% of all patients examined, including 32% with MIBC. Methylation was observed only in 36% of patients with decreased expression of this gene.

The 5' region of the *MBD4* gene was methylated in 18% of people with BC. In 66% of patients with reduced expression of this gene, methylation occurred. A moderate inverse correlation was observed between the amount of *MBD4* mRNA and the presence of *MBD4* promoter methylation. Pearson's linear correlation test indicates a moderate correlation between the amount of *MBD4* mRNA and the methylation level of the *MBD4* promoter ($r = -0.53$; $P < 0.05$). However, no relationship was found between *MBD4* gene expression and clinical parameters [21].

12.2.2. Global DNA methylation

In global DNA methylation analysis, normal tissue showed similar methylation levels for patients samples (grouped by histological grade) compared to tumor tissue (Fig. 6). Median of global DNA methylation (5-mC%) was slightly lower in tumor sample (6%) for values ranging from 0.2% to 43% than in the corresponding normal tissue (9%) for data ranging from 2% to 43.5%. Interestingly, 5-mC% was statistically significantly associated with a higher grade (G) ($P = 0.04$, Kruskal-Wallis ANOVA) (Fig. 6), which was not observed for the stage of patients tissues. There was also no correlation between the expression level of *DNMT1* mRNA and 5-mC% in tumor tissue [21].

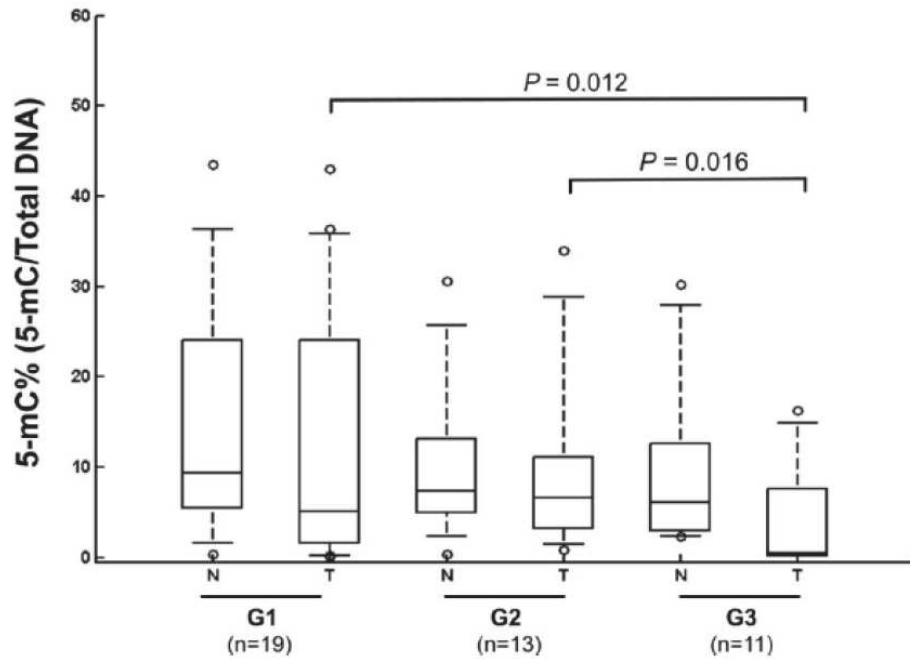
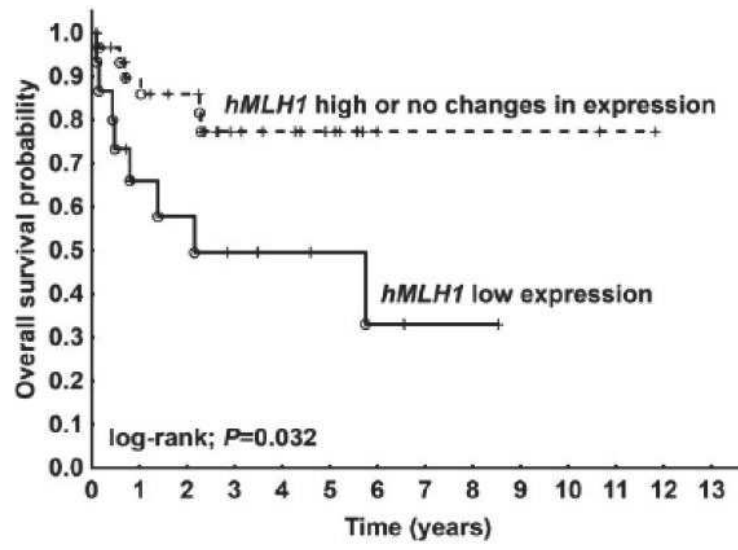


Fig. 6 Percentage of 5-methylcytosine in tumor compared to normal tissue in BC according to histological grade of tumor in patients. n – number of patients; T – tumor; N – normal tissue. (Source: attachment – paper A, based on Fig. 3 [21].)

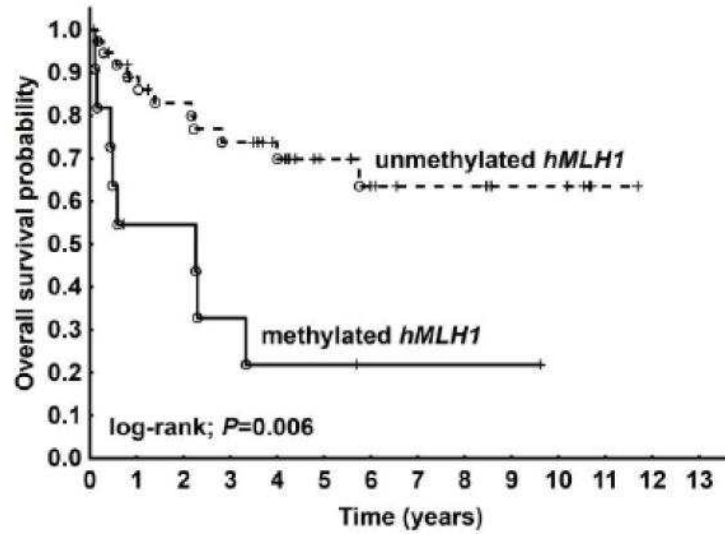
12.2.3. The relationship between expression and promoter methylation of selected genes and the overall survival of patients

A statistically significant difference was observed not only between the shorter overall survival and the decreased *MLH1* expression in BC patients ($P = 0.032$) (Fig. 7 A), but also between the methylation of 5' region of this gene ($P = 0.006$) (Fig. 7 B). The shorter survival time, which is also statistically significant, also occurs in patients with elevated *DNMT1* expression ($P = 0.002$) (Fig. 7 C). Although the result was not statistically significant, it seems interesting that overall survival probability was greater in patients with lower *MBD4* expression ($P = 0.1$) (Fig. 7 D). A relation was also observed between higher stages and shorter survival time ($P < 0.05$, log-rank test) [21].

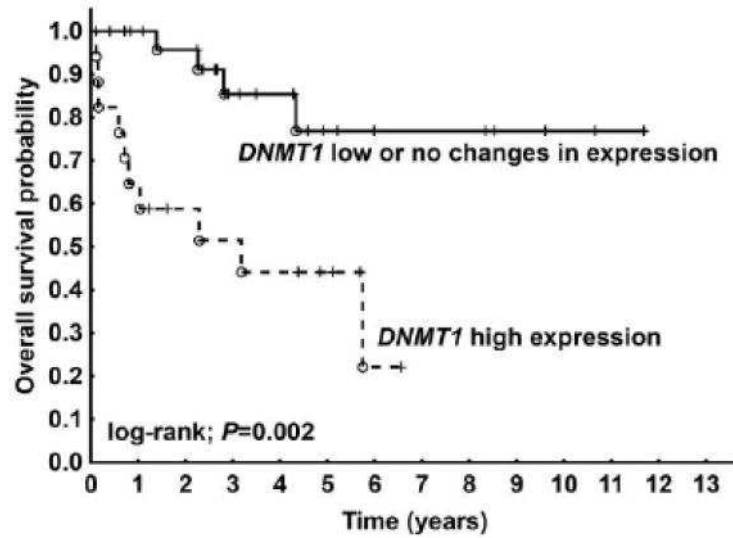
A.



B.



C.



D.

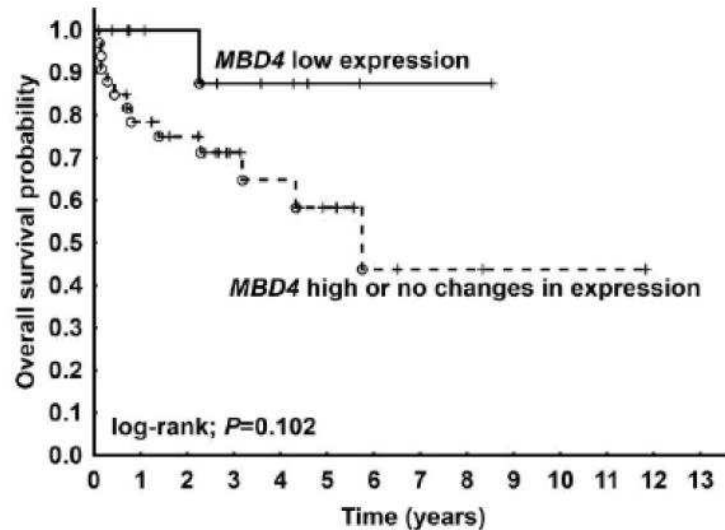


Fig. 7 Kaplan-Meier analysis – overall survival probability of patients with BC. A. *MLH1* gene expression level B. promoter *MLH1* gene methylation status C. *DNMT1* gene expression level D. *MBD4* gene expression level. (Source: attachment – paper A, based on Fig. 4 [21].)

In the experimental part of the B paper, changes in *SCDI* gene expression were described (source: paper B, based on Fig. 1 a and b). The difference between the medians of the relative expression of *SCDI* mRNA for two groups of patients (Ta/T1 and T2-T4) was statistically significant ($P < 0.001$) (medians values: 1.3 and 4.7, respectively). In the Ta/T1 patients group, the relative expression of *SCDI* mRNA did not exceed 5, while in T2-T4

group of patients an increase was observed up to 29. Kaplan-Meier analysis was performed based on the results of *SCD1* mRNA expression. The probability of survival of patients that did not reveal a change in *SCD1* expression was over 90% (Fig. 8). However, the statistical probability of survival decreased statistically significant to 30% within 6 years for people with elevated levels of *SCD1* mRNA expression ($P = 0.021$) [111]. It was also observed that in patients with lymph node metastasis, the mean value of *SCD1* expression was 2.5-fold higher than in non-metastatic patients ($P = 0.022$).

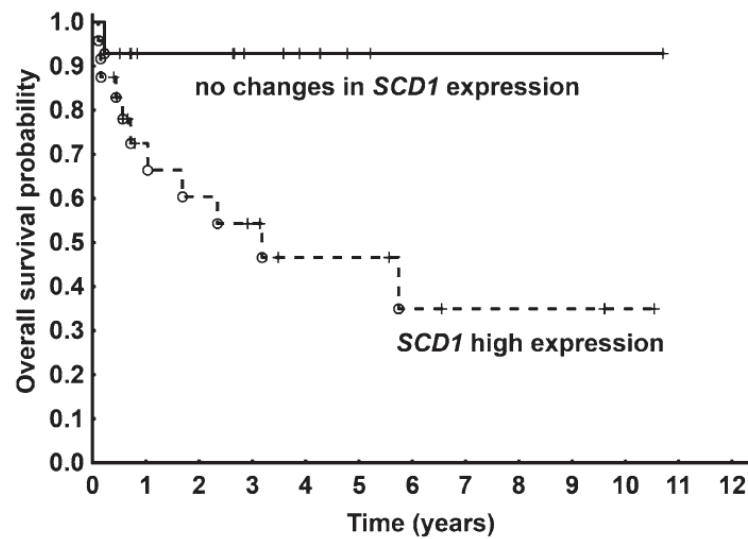


Fig. 8 Kaplan-Meier analysis – overall survival probability of patients with BC for *SCD1* gene expression. $P = 0.021$; log-rank test. (Source: attachment – paper B, based on Fig. 4 A [111].)

13. Conclusions

- 1) For the first time, *MLH3* gene mRNA expression was examined in bladder cancer. There were no statistically significant associations between the level of *MLH3* mRNA expression and clinical parameters. Despite the decreased expression of the *MLH3* gene mRNA, elevated *MLH1* mRNA expression may compensate for the low level of *MLH3* mRNA in patients with Ta/T1 tumors.
- 2) A slightly lowered level of mRNA expression of *MBD4* gene has been observed in almost half of the patients with a high probability of long-term survival (Ta/T1). *MBD4*, similar to *MLH3*, does not play a key role in bladder carcinogenesis.
- 3) It was shown that high expression of *SCD1* is associated with stage, lymph nodes metastasis and shorter overall survival of patients with bladder cancer in humans.
- 4) Increased mRNA level of *DNMT1* expression, decreased relative *MLH1* mRNA expression, and *MLH1* promoter methylation have been proposed as prognostic markers of shorter survival of patients with bladder cancer. The selected negative prognostic factors may be of application importance in therapeutic decisions.

14. Discussion

Effective mechanisms of DNA repair and cell defense along with high resistance to stress-inducing environmental conditions may be responsible for the lack of aging and longevity of organisms. Therefore, the detailed knowledge about such processes could slow down the aging process and the development of age-related pathologies, including cancer.

There are prognostic models for patients with bladder cancer, however, the new set of molecular markers that could group patients depending on survival time would allow those who have a reduced risk of death to be selected at an early stage of the disease [112].

In the case of *MBD4*, it can be assumed that methylation of this gene contributes to its silencing, but it is not the only one mechanism. The low frequency of *MBD4* methylation in our studies shows the small significance of these changes in the development of bladder cancer. This is consistent with research on colorectal cancer, where it was observed in 24% of patients [43]. It appears that reduced expression of *MBD4* is associated with NMIBC. Due to the similar role of *MBD4* and *TDG*, it can be presumed that *TDG* took over the function of *MBD4*, which can be evidenced by the lack of statistically significant differences in the expression of *TDG* among patients. In primary breast cancer, low expression of *MBD4* protein was found in a well-differentiated tumor, while high in poorly-differentiated cancer. In addition, it has been demonstrated that reprogrammed *MBD4*-dependent DNA methylation was induced by the RON/MSP signaling pathway and was required for metastasis of breast cancer [41]. Slightly decreased level of *MBD4* expression in patients did not indicate its significant role in bladder cancer.

Based on the lower average fold changes of *MLH1* and *MLH3* expression in the NMIBC group, it can be assumed that *MLH1* may functionally interact with another MutL homolog that allows for the compensation of *MLH3* deficiency in low stage bladder cancer. Based on this result, as well as other studies described in paper A (attachment), it can be concluded that *MLH3* plays no significant role in bladder cancer.

One of the possibilities of inactivating MMR system is the methylation of the *MLH1* promoter, occurring in a significant number of patients with sporadic colon cancer [113]. The methylation rate of the 5' region was confirmed in 42% of patients with cervical cancer as well as in 13% of patients with NMIBC [65,114]. *MLH1* gene methylation analysis revealed 25% frequency (with 32% in MIBC). It is much higher than given by Catto et al., i.e. 1% of patients with BC [115], but similar to 29.6% observed in patients with NIMBC [116]. Promoter methylation is the most likely mechanism to silence the expression of this gene, but

not the only one. Methylation occurred only in 36% samples in which the decrease in *MLH1* expression was observed. This result is not surprising because it has been shown that the reduction of genes expression encoding proteins belonging to the MMR system such as *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* may be caused by microRNA [117]. The low frequency of methylation of the *MLH1* promoter region suggests that it is not a leading and common feature of patients with BC, whereas if present, it is strongly associated with shorter overall survival of patients.

A high level of *DNMT1* expression has been found in MIBC. The performed analysis indicates complementarity and similarity to the results published by Wu et al., which confirm the occurrence of an increased level of DNMT1 in tumor tissues of patients with BC [59]. An increased level of *DNMT1* mRNA expression was also observed with a decreased level of *MLH1* mRNA expression in the group of patients with more advanced tumor. This may suggest an association between the activity of DNMT1 and the silencing of *MLH1* gene expression. In a study using a colorectal cancer cell line (SW48), where a DNMT1 inhibitor (5-aza-2'-deoxycytidine) was added, *MLH1* expression was activated [118]. In addition, high statistical significance for the association of increased expression of DNMT1 and shorter survival time of patients causes that the analysis of the mRNA level for *DNMT1* may become an attractive prognostic biomarker.

The presence of global DNA hypomethylation in both cancerous and normal tissue (adjacent to the tumor) may be justified by the fact that certain epigenetic mechanisms in the surrounding urothelium are the same as in tumor tissue. Epigenetic similarity, sometimes genetic, may be a consequence of carcinogenesis within a given area or the consequence of aging. The presence of DNA hypomethylation in BC in morphologically normal tissue was also confirmed in exfoliative urine cytology [119]. Our data also confirms the hypothesis of early global demethylation in BC proposed by Seifert et al. [119]. Despite the correlation of global DNA hypomethylation with a higher histological grade of BC, the presence of hypomethylation in normal tissue causes that global DNA methylation analysis is not justified in the clinical application for patients.

For the first time, an association was found between *SCDI* mRNA and clinical parameters in BC. This indicates the possibility of *SCDI* gene analysis in survival time prognosis. High level of *SCDI* mRNA, reduced level of *MLH1* mRNA, *MLH1* gene promoter methylation, and elevated *DNMT1* mRNA level are associated with shorter overall survival of patients, thus they are potential prognostic markers of BC. As unfavorable factors of patients prognosis, they would be important in everyday medical practice, especially when interpreting

patients' results before or after disease diagnosis, as well as selecting the right therapeutic strategy, increasing the chances of faster cure and longer survival.

15. Abstract

Bladder cancer is diverse cancer in terms of the occurrence of molecular subtypes. Diagnosing patients with bladder cancer based on their molecular characteristics would allow an early and effective prognosis of the patient's survival time, and thus the use of appropriate therapy.

DNA repair systems play an important role in DNA damage caused by, for example, oxidative stress. Disturbances of cell homeostasis, resulting from the improper functioning of DNA repair systems, epigenetic mechanisms, and metabolic disorders, contribute to the development of cancer.

The aim of this dissertation was to examine the expression of selected genes related to DNA repair (including *MLH1*, *MLH3*, *MBD4*, *TDG*), *SCD1* which is associated with lipid metabolism, and *DNMT1* – its product methylates DNA, and to determine the status of local and global DNA methylation in tissues taken from patients with bladder cancer. Performed analyses allowed for the selection of potential prognostic markers.

After examining the mRNA expression and the methylation status of the 5' regions of selected genes, an analysis of their association with the clinical parameters of patients was performed. Results showed an elevated level of expression of the gene encoding DNMT1, decreased *MLH1* mRNA expression, promoter methylation of this gene, as well as a high level of *SCD1* mRNA expression, especially in MIBC. These parameters characterize patients with shorter survival. Additionally, for the first time, the association between clinical parameters of patients with BC and *MBD4*, *MLH3*, and *SCD1* genes expression mRNA was examined. *MBD4* and *TDG* were selected as genes that probably do not play clearly important functions in this tumor.

The results from papers included in the doctoral dissertation may be an interesting supplement to already existing prognostic tests providing additional information in the field of molecular biology with increased value of the application potential.

16. Bibliografia / References

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86. doi:10.1002/ijc.29210.
- [2] Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol* 2016;69:300–10. doi:10.1016/j.eururo.2015.08.037.
- [3] Munoz JJ, Ellison LM. Upper tract urothelial neoplasms: incidence and survival during the last 2 decades. *J Urol* 2000;164:1523–5.
- [4] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* 2008;54:303–14. doi:10.1016/j.eururo.2008.04.051.
- [5] Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Höglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol* 2017;72:354–65. doi:10.1016/j.eururo.2017.03.010.
- [6] Marcos-Gragera R, Mallone S, Kiemeny LA, Vilardell L, Malats N, Allory Y, et al. Urinary tract cancer survival in Europe 1999–2007: Results of the population-based study EURO CARE-5. *Eur J Cancer* 2015;51:2217–30. doi:10.1016/j.ejca.2015.07.028.
- [7] Kamat AM, Hahn NM, Efsthathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016;388:2796–810. doi:10.1016/S0140-6736(16)30512-8.
- [8] Dyrskjot L, Zieger K, Kruhøffer M, Thykjaer T, Jensen JL, Primdahl H, et al. A Molecular Signature in Superficial Bladder Carcinoma Predicts Clinical Outcome. *Clin Cancer Res* 2005;11:4029–36. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2095.
- [9] Mitra AP. Molecular substratification of bladder cancer: moving towards individualized patient management. *Ther Adv Urol* 2016;8:215–33. doi:10.1177/1756287216638981.
- [10] Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015;15:25–41. doi:10.1038/nrc3817.
- [11] Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3:17022. doi:10.1038/nrdp.2017.22.
- [12] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315–22. doi:10.1038/nature12965.

- [13] Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–74. doi:10.1038/35077232.
- [14] Wojtczyk-Miaskowska A, Schlichtholz B. DNA damage and oxidative stress in long-lived aquatic organisms. *DNA Repair (Amst)* 2018;69. doi:10.1016/j.dnarep.2018.07.003.
- [15] Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* 2010;2010:1–32. doi:10.4061/2010/592980.
- [16] Hickman MJ, Samson LD. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10764–9.
- [17] Tham K-C, Hermans N, Winterwerp HHK, Cox MM, Wyman C, Kanaar R, et al. Mismatch Repair Inhibits Homeologous Recombination via Coordinated Directional Unwinding of Trapped DNA Structures. *Mol Cell* 2013;51:326–37. doi:10.1016/j.molcel.2013.07.008.
- [18] Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 2017;58:235–63. doi:10.1002/em.22087.
- [19] Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001;488:77–85.
- [20] WILSON III D, BOHR V. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* 2007;6:544–59. doi:10.1016/j.dnarep.2006.10.017.
- [21] Wojtczyk-Miaskowska A, Presler M, Michajlowski J, Matuszewski M, Schlichtholz B. Gene Expression, DNA Methylation and Prognostic Significance of DNA Repair Genes in Human Bladder Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2404–17. doi:10.1159/000480182.
- [22] Harb-de la Rosa A, Acker M, Kumar RA, Manoharan M. Epigenetics application in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Can J Urol* 2015;22:7947–51.
- [23] Pietrusiński M, Kępczyński Łukasz, Jędrzejczyk A, Borkowska E, Traczyk-Borszyńska M, Constantinou M, et al. Detection of bladder cancer in urine sediments by a hypermethylation panel of selected tumor suppressor genes. *Cancer Biomarkers* 2017;18:47–59. doi:10.3233/CBM-160673.
- [24] Piyathilake CJ, Frost AR, Bell WC, Oelschlager D, Weiss H, Johanning GL, et al. Altered global methylation of DNA: An epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression. *Hum Pathol* 2001;32:856–62.

doi:10.1053/hupa.2001.26471.

- [25] Galusca B, Dumollard JM, Lassandre S, Niveleau A, Prades JM, Estour B, et al. Global DNA methylation evaluation: potential complementary marker in differential diagnosis of thyroid neoplasia. *Virchows Arch* 2005;447:18–23. doi:10.1007/s00428-005-1268-5.
- [26] Papsdorf K, Brunet A. Linking Lipid Metabolism to Chromatin Regulation in Aging. *Trends Cell Biol* 2019;29:97–116. doi:10.1016/j.tcb.2018.09.004.
- [27] Kaochar S, Tu BP. Gatekeepers of chromatin: Small metabolites elicit big changes in gene expression. *Trends Biochem Sci* 2012;37:477–83. doi:10.1016/j.tibs.2012.07.008.
- [28] Berger SL, Sassone-Corsi P. Metabolic Signaling to Chromatin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8:a019463. doi:10.1101/cshperspect.a019463.
- [29] Katada S, Imhof A, Sassone-Corsi P. Connecting Threads: Epigenetics and Metabolism. *Cell* 2012;148:24–8. doi:10.1016/j.cell.2012.01.001.
- [30] Li X, Egervari G, Wang Y, Berger SL, Lu Z. Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:563–78. doi:10.1038/s41580-018-0029-7.
- [31] Tidwell TR, Søreide K, Hagland HR. Aging, Metabolism, and Cancer Development: from Peto’s Paradox to the Warburg Effect. *Aging Dis* 2017;8:662. doi:10.14336/AD.2017.0713.
- [32] Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone Methyl Transferases and Demethylases; Can They Link Metabolism and Transcription? *Cell Metab* 2010;12:321–7. doi:10.1016/j.cmet.2010.09.004.
- [33] Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol* 2013;63:234–41. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033.
- [34] Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, Esperto F, Figueroa JD, Kamat AM, et al. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol* 2018;74:784–95. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.001.
- [35] Kim J, Mouw KW, Polak P, Braunstein LZ, Kamburov A, Tiao G, et al. Somatic ERCC2 mutations are associated with a distinct genomic signature in urothelial tumors. *Nat Genet* 2016;48:600–6. doi:10.1038/ng.3557.
- [36] Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;5:51–75. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102113.

- [37] Hu S, Fu S, Xu X, Chen L, Xu J, Li B, et al. The Mechanism of Radiosensitization by YM155, a Novel Small Molecule Inhibitor of Survivin Expression, is Associated with DNA Damage Repair. *Cell Physiol Biochem* 2015;37:1219–30. doi:10.1159/000430245.
- [38] Yang C, Wang Q, Liu X, Cheng X, Jiang X, Zhang Y, et al. NU7441 Enhances the Radiosensitivity of Liver Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016;38:1897–905. doi:10.1159/000445551.
- [39] Wang Y, Feng J, Zang W, Du Y, Chen X, Sun Q, et al. MiR-499 Enhances the Cisplatin Sensitivity of Esophageal Carcinoma Cell Lines by Targeting DNA Polymerase β . *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1587–96. doi:10.1159/000430321.
- [40] Wang Y, Wu J, Guo W, Sun Q, Chen X, Zang W, et al. α -Solanine Modulates the Radiosensitivity of Esophageal Cancer Cells by Inducing MicroRNA 138 Expression. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:996–1010. doi:10.1159/000447807.
- [41] Cunha S, Lin Y-C, Goossen EA, DeVette CI, Albertella MR, Thomson S, et al. The RON Receptor Tyrosine Kinase Promotes Metastasis by Triggering MBD4-Dependent DNA Methylation Reprogramming. *Cell Rep* 2014;6:141–54. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.010.
- [42] Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, et al. Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair. *Cell* 2011;146:67–79. doi:10.1016/j.cell.2011.06.020.
- [43] Howard JH, Frolov A, Tzeng C-WD, Stewart A, Midzak A, Majmundar A, et al. Epigenetic downregulation of the DNA repair gene MED1/MBD4 in colorectal and ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2009;8:94–100.
- [44] Peng B, Hurt EM, Hodge DR, Thomas SB, Farrar WL. DNA hypermethylation and partial gene silencing of human thymine- DNA glycosylase in multiple myeloma cell lines. *Epigenetics* n.d.;1:138–45.
- [45] Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, et al. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:15071–6. doi:10.1073/pnas.2334585100.
- [46] Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, et al. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3969–74.
- [47] Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin.

- Cell 1999;99:451–4.
- [48] Hashimoto H, Zhang X, Cheng X. Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:8276–84. doi:10.1093/nar/gks628.
- [49] Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet* 1999;23:266–8. doi:10.1038/15443.
- [50] Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, et al. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene* 1999;18:8044–7. doi:10.1038/sj.onc.1203229.
- [51] Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2001;33:561–8. doi:10.1053/jhep.2001.22507.
- [52] Schlegel J, Güneysu S, Mennel H-D. Expression of the genes of methyl-binding domain proteins in human gliomas. *Oncol Rep n.d.*;9:393–5.
- [53] Laget S, Miotto B, Chin HG, Estève P-O, Roberts RJ, Pradhan S, et al. MBD4 cooperates with DNMT1 to mediate methyl-DNA repression and protects mammalian cells from oxidative stress. *Epigenetics* 2014;9:546–56. doi:10.4161/epi.27695.
- [54] Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* 1996;16:4555–65.
- [55] Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair K-W, Yen R-WC, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002;416:552–6. doi:10.1038/416552a.
- [56] Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int* 2008;58:544–58. doi:10.1111/j.1440-1827.2008.02270.x.
- [57] Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, et al. Increased DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein Expression Correlates Significantly with Poorer Tumor Differentiation and Frequent DNA Hypermethylation of Multiple CpG Islands in Gastric Cancers. *Am J Pathol* 2004;164:689–99. doi:10.1016/S0002-9440(10)63156-2.
- [58] Jin B, Robertson KD. DNA Methyltransferases, DNA Damage Repair, and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 754, 2013, p. 3–29. doi:10.1007/978-1-4419-9967-2_1.

- [59] Wu C-T, Wu C-F, Lu C-H, Lin C-C, Chen W-C, Lin P-Y, et al. Expression and function role of DNA methyltransferase 1 in human bladder cancer. *Cancer* 2011;117:5221–33. doi:10.1002/cncr.26150.
- [60] Wang K-Y, James Shen C-K. DNA methyltransferase Dnmt1 and mismatch repair. *Oncogene* 2004;23:7898–902. doi:10.1038/sj.onc.1208111.
- [61] Laisné M, Gupta N, Kirsh O, Pradhan S, Defossez P-A. Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals. *Genes (Basel)* 2018;9:617. doi:10.3390/genes9120617.
- [62] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D362–8. doi:10.1093/nar/gkw937.
- [63] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258–61. doi:10.1038/368258a0.
- [64] Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:1090–5.
- [65] Gras E, Catusus L, Argüelles R, Moreno-Bueno G, Palacios J, Gamallo C, et al. Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. *Cancer* 2001;92:2829–36.
- [66] Wang Y-C, Lu Y-P, Tseng R-C, Lin R-K, Chang J-W, Chen J-T, et al. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest* 2003;111:887–95. doi:10.1172/JCI15475.
- [67] Furihata M, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Terao N, Kuwahara M, Shuin T. Genetic analysis of hMLH1 in transitional cell carcinoma of the urinary tract: promoter methylation or mutation. *J Urol* 2001;165:1760–4.
- [68] Roesner L, Mielke C, Faehnrich S, Merkhoffer Y, Dittmar K, Drexler H, et al. Localization of MLH3 at the Centrosomes. *Int J Mol Sci* 2014;15:13932–7. doi:10.3390/ijms150813932.
- [69] Cannavo E, Marra G, Sabates-Bellver J, Menigatti M, Lipkin SM, Fischer F, et al. Expression of the MutL Homologue hMLH3 in Human Cells and its Role in DNA

- Mismatch Repair. *Cancer Res* 2005;65:10759–66. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2528.
- [70] Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, Anderson GR, Kirsch I, Hadley D, et al. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene *MLH3*: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers. *Hum Mutat* 2001;17:389–96. doi:10.1002/humu.1114.
- [71] Igal RA. Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2016;1861:1865–80. doi:10.1016/j.bbalip.2016.09.009.
- [72] Massari F, Ciccarese C, Santoni M, Iacovelli R, Mazzucchelli R, Piva F, et al. Metabolic phenotype of bladder cancer. *Cancer Treat Rev* 2016;45:46–57. doi:10.1016/j.ctrv.2016.03.005.
- [73] Beloribi-Djefafilia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 2016;5:e189–e189. doi:10.1038/oncsis.2015.49.
- [74] Yan G, Li L, Zhu B, Li Y. Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:33429–39. doi:10.18632/oncotarget.7960.
- [75] Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:732–49. doi:10.1038/nrc.2016.89.
- [76] Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun* 2018;38:27. doi:10.1186/s40880-018-0301-4.
- [77] Turyn J, Schlichtholz B, Dettlaff-Pokora A, Presler M, Goyke E, Matuszewski M, et al. Increased Activity of Glycerol 3-phosphate Dehydrogenase and Other Lipogenic Enzymes in Human Bladder Cancer. *Horm Metab Res* 2003;35:565–9. doi:10.1055/s-2003-43500.
- [78] Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996;98:1575–84. doi:10.1172/JCI118951.
- [79] Wen Y-A, Xiong X, Zaytseva YY, Napier DL, Vallee E, Li AT, et al. Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer. *Cell Death Dis* 2018;9:265. doi:10.1038/s41419-018-0330-6.
- [80] Bauerschlag DO, Maass N, Leonhardt P, Verburg FA, Pecks U, Zeppernick F, et al. Fatty acid synthase overexpression: target for therapy and reversal of chemoresistance in ovarian cancer. *J Transl Med* 2015;13:146. doi:10.1186/s12967-015-0511-3.

- [81] Meena AS, Sharma A, Kumari R, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK. Inherent and Acquired Resistance to Paclitaxel in Hepatocellular Carcinoma: Molecular Events Involved. *PLoS One* 2013;8:e61524. doi:10.1371/journal.pone.0061524.
- [82] Igal RA. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:1509–15. doi:10.1093/carcin/bgq131.
- [83] Roongta U V., Pabalan JG, Wang X, Ryseck R-P, Fagnoli J, Henley BJ, et al. Cancer Cell Dependence on Unsaturated Fatty Acids Implicates Stearoyl-CoA Desaturase as a Target for Cancer Therapy. *Mol Cancer Res* 2011;9:1551–61. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0126.
- [84] Huang J, Fan X-X, He J, Pan H, Li R-Z, Huang L, et al. SCD1 is associated with tumor promotion, late stage and poor survival in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016;7:39970–9. doi:10.18632/oncotarget.9461.
- [85] Dobrzyn P, Bednarski T, Dobrzyn A. Metabolic reprogramming of the heart through stearyl-CoA desaturase. *Prog Lipid Res* 2015;57:1–12. doi:10.1016/j.plipres.2014.11.003.
- [86] Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 2004;43:91–104.
- [87] Stelmanska E, Sucajtys-Szulc E, Korczynska J, Adrych K, Swierczynski J. Diversity of SREBP-1 gene expression in rat adipose tissue depots in response to refeeding after food restriction. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2005;1733:130–6. doi:10.1016/j.bbalip.2004.12.004.
- [88] Nogalska A, Sucajtys-Szulc E, Swierczynski J. Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism* 2005;54:1041–7. doi:10.1016/j.metabol.2005.03.007.
- [89] Du X, Wang Q-R, Chan E, Merchant M, Liu J, French D, et al. FGFR3 Stimulates Stearyl CoA Desaturase 1 Activity to Promote Bladder Tumor Growth. *Cancer Res* 2012;72:5843–55. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1329.
- [90] Swinnen J V, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000;19:5173–81. doi:10.1038/sj.onc.1203889.
- [91] Huang W-C, Li X, Liu J, Lin J, Chung LWK. Activation of Androgen Receptor, Lipogenesis, and Oxidative Stress Converged by SREBP-1 Is Responsible for

- Regulating Growth and Progression of Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2012;10:133–42. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0206.
- [92] Li W, Tai Y, Zhou J, Gu W, Bai Z, Zhou T, et al. Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. *Cell Cycle* 2012;11:2348–58. doi:10.4161/cc.20811.
- [93] MIYACHI K, SAWADA Y, SHIDA Y, SUGAWARA A, HISATOMI H. Lipogenic gene expression profile in patients with gastric cancer. *Mol Clin Oncol* 2013;1:825–7. doi:10.3892/mco.2013.148.
- [94] Sun Y, He W, Luo M, Zhou Y, Chang G, Ren W, et al. SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumor Biol* 2015;36:4133–41. doi:10.1007/s13277-015-3047-5.
- [95] O’Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1218–25. doi:10.1038/nsmb.1897.
- [96] Greer EL, Maures TJ, Hauswirth AG, Green EM, Leeman DS, Maro GS, et al. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 2010;466:383–7. doi:10.1038/nature09195.
- [97] Han S, Schroeder EA, Silva-García CG, Hebestreit K, Mair WB, Brunet A. Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. *Nature* 2017;544:185–90. doi:10.1038/nature21686.
- [98] Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development* 2012;139:1895–902. doi:10.1242/dev.070771.
- [99] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013;153:1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
- [100] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.
- [101] Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone–insulin–IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;87:201–23. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.01.005.
- [102] Hulbert AJ. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 2005;234:277–88. doi:10.1016/j.jtbi.2004.11.024.
- [103] Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G. Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett* 1998;102–103:47–52.
- [104] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol*

- Cell Mol Physiol 2000;279:L1005–28. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005.
- [105] Colavitti R, Finkel T. Reactive Oxygen Species as Mediators of Cellular Senescence. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)* 2005;57:277–81. doi:10.1080/15216540500091890.
- [106] Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. *Biochem Mol Med* 1996;59:93–7.
- [107] Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:659–71. doi:10.1038/nrm3439.
- [108] Kang D, Hamasaki N. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet* 2002;41:311–22. doi:10.1007/s00294-002-0312-0.
- [109] Weirich-Schwaiger H, Weirich HG, Gruber B, Schweiger M, Hirsch-Kauffmann M. Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mutat Res* 1994;316:37–48.
- [110] Higami Y, Shimokawa I, Okimoto T, Ikeda T. An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats. *Mutat Res* 1994;316:59–67.
- [111] Presler M, Wojtczyk-Miaskowska A, Schlichholz B, Kaluzny A, Matuszewski M, Mika A, et al. Increased expression of the gene encoding stearoyl-CoA desaturase 1 in human bladder cancer. *Mol Cell Biochem* 2018;447:217–24. doi:10.1007/s11010-018-3306-z.
- [112] Dyrskjøt L, Thykjaer T, Kruhøffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, et al. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet* 2003;33:90–6. doi:10.1038/ng1061.
- [113] Thykjaer T, Christensen M, Clark AB, Hansen LRT, Kunkel TA, Ørntoft TF. Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer. *Br J Cancer* 2001;85:568–75. doi:10.1054/bjoc.2001.1949.
- [114] Lazaris AC, Zarogiannos A, Kavantzias N, Zervas A, Giannopoulos A, Nakopoulou L. MLH1 mismatch repair gene product is associated with apoptotic potential of urothelial bladder carcinomas. *Anticancer Res* n.d.;26:1535–42.
- [115] Catto JWF, Azzouzi A-R, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, et al. Promoter Hypermethylation Is Associated With Tumor Location, Stage, and Subsequent Progression in Transitional Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2903–10. doi:10.1200/JCO.2005.03.163.

- [116] Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, et al. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2005;41:2769–78. doi:10.1016/j.ejca.2005.07.019.
- [117] Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:6982–7. doi:10.1073/pnas.1002472107.
- [118] Robert M-F, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003;33:61–5. doi:10.1038/ng1068.
- [119] Seifert H-H, Schmiemann V, Mueller M, Kazimirek M, Onofre F, Neuhausen A, et al. In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer. *Exp Mol Pathol* 2007;82:292–7. doi:10.1016/j.yexmp.2006.08.002.

17.Załączniki (prace: A, B, C) / Appendices (papers: A, B, C)