

Analiza transkryptomów raków jajnika, z uwzględnieniem długich niekodujących RNA (lncRNA) – w poszukiwaniu nowych markerów molekularnych

Słowa kluczowe: rak jajnika, guz graniczny jajnika, transkryptom, lncRNA, NGS, RNA-seq, ontologia genów, warianty genetyczne, przeżycie pacjentek (OS, DFS, RFS), odpowiedź na leczenie

Wstęp

Rak jajnika jest główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów żeńskich narządów płciowych. Graniczne nowotwory jajnika stanowią rzadką jednostkę chorobową o pośredniej złośliwości, z tendencją do transformacji złośliwej. Guzy jajnika (zarówno graniczne, jak i raki) zwykle początkowo rozwijają się bezobjawowo, są trudne do zdiagnozowania i cechuje je pierwotna lub wtórna oporność na konwencjonalną chemioterapię. Istnieje więc pilna potrzeba znalezienia nowych biomarkerów do badań przesiewowych, diagnostyki, predykcji, monitorowania oraz nowych celów terapeutycznych.

Charakterystyka molekularna granicznych i złośliwych guzów jajnika wydaje się kluczowa dla pełniejszego poznania biologii tych nowotworów i ma istotny potencjał aplikacyjny.

Geny kodujące białka stanowią zaledwie 1-2% procent ludzkiego genomu. Większość sekwencji DNA ulega transkrypcji na cząsteczki RNA o funkcjach regulacyjnych. Do tych cząsteczek należą odkryte ponad 20 lat temu długie niekodujące RNA (lncRNA), definiowane jako regulacyjne RNA, o długości przekraczającej 200 nt, które nie zawierają otwartej ramki odczytu kodującej peptyd dłuższy niż 100 aminokwasów. Pozostają one nadal stosunkowo słabo poznane.

Cel pracy

Celem pracy była kompleksowa charakterystyka transkryptomów, w tym lncRNA, raków jajnika i guzów granicznych oraz ocena potencjalnej przydatności charakterystyki transkryptów w diagnostyce i leczeniu chorych na raka jajnika.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Identyfikację transkryptów, w tym lncRNA, których zmieniona ekspresja wpływa na parametry kliniczno-patologiczne oraz próbę znalezienia nowych molekularnych markerów w raku jajnika.
2. Funkcjonalną klasyfikację genów o ekspresji zróżnicowanej w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych.
3. Analizę ontologiczną dla genów o ekspresji zróżnicowanej w zależności od obecności mikroinwazji/wszczepów inwazyjnych w guzach granicznych.
4. Określenie różnic i podobieństw transkryptomów raków jajnika i guzów granicznych jajnika (*borderline*).
5. Wykrycie wariantów genetycznych w rakach jak i guzach granicznych jajnika.

Materiały i metody

Badania opisane w niniejszej pracy objęły dużą grupę dokładnie scharakteryzowanych próbek raków jajnika (N=148, 78% raki nisko zróżnicowane, 82% surowicze) oraz guzów granicznych jajnika (N=17), od pacjentek poddanych wieloletniej obserwacji. Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS RNA-seq), nowoczesnej precyzyjnej metody wysoko przepustowej, pozwoliło na precyzyjne zbadanie tak dużej liczby przypadków.

Próbki materiału pooperacyjnego pobrane zostały od uprzednio nieleczonych pacjentek z guzami granicznymi i rakami jajnika oraz zgromadzone w postaci głęboko

zamrożonej. Pacjentki z rakiem jajnika otrzymywały następnie chemioterapię w schemacie taksany/platyna (76%) lub platyna/cyklofosfamid (24%). Uzyskano bardzo dobrej jakości RNA oraz biblioteki cDNA. NGS RNA-seq zostało przeprowadzone na sekwenatorze NovaSeq 6000 (Illumina, USA), znajdującym się w Centrum Nowych Technologii (CeNT) UW, we współpracy z Zakładem Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Następnie na podstawie analiz bioinformatycznych, wyłoniono geny (w tym geny kodujące lncRNA) o najbardziej zróżnicowanej ekspresji, zidentyfikowano terminy ontologiczne wzbogacone w te geny i przeprowadzono ocenę znaczenia prognostycznego i predykcyjnego zmian ekspresji wytypowanych genów w rakach jajnika, a także określono warianty genetyczne i ich wpływ na strukturę i funkcje białek. Metodą RT-qPCR zweryfikowano wyniki ekspresji uzyskane za pomocą NGS.

Wyniki i omówienie

Porównując profile ekspresji genów między poszczególnymi rakami jajnika ujawniono, że – pomimo dużego podobieństwa pod względem typu histopatologicznego i stopnia zróżnicowania histologicznego – występują duże różnice w ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi guzami.

Analizując 20 genów o najsilniej zróżnicowanej ekspresji w całej grupie raków oraz w podgrupach uwzględniających typ terapii i występowanie mutacji typu *missense* w genie *TP53*, we wszystkich typach analiz zauważono silnie zróżnicowaną ekspresję wielu genów, o nieznanej dotąd funkcji. Ponadto stwierdzono istotny wpływ mutacji *TP53* na stopień zróżnicowania ekspresji zidentyfikowanych genów.

Profile ekspresji genów w kontekście całkowitej remisji (CR) oraz całkowitego przeżycia (OS) ujawniły zróżnicowanie ekspresji w rakach jajnika genów kodujących białka, genów o nieznanej funkcji a także kodujących lncRNA. Wyodrębniono geny, których ekspresja była skorelowana z prawdopodobieństwem CR lub ryzykiem zgonu pacjentek z rakiem jajnika. W guzach granicznych zidentyfikowano szereg genów, których ekspresja była również znamienne zmieniona w rakach jajnika.

Analiza ontologii genów ujawniła szereg terminów ontologicznych, wśród których znalazły się terminy wspólne dla analiz w kontekście CR, OS, czasu przeżycia wolnego od choroby (DFS), wrażliwości na leczenie (PS). Obejmowały one najczęściej procesy biologiczne związane z układem nerwowym, transkrypcją i translacją białek, wiązaniem RNA, DNA i białek oraz adhezją komórek. Ponadto status mutacji typu *missense* w genie *TP53*, którego znaczenie analizowano u chorych leczonych TP, w kontekście CR, OS, PS oraz DFS, miał istotny wpływ na ujawnione terminy ontologiczne w rakach jajnika. Najsilniej wzbogacone terminy ontologiczne w guzach granicznych, były również wzbogacone w rakach jajnika.

Analizy przeżycia z wykorzystaniem wieloczynnikowego modelu regresji Coxa, uwzględniająca zmienne niezależne, takie jak: poziom ekspresji danego genu, typ histologiczny, FIGO, stopień zróżnicowania histologicznego, chorobę resztkową oraz zmienne grupujące tj. status *TP53* i typ chemioterapii wyłoniły 10 następujących genów, których poziom ekspresji miał wartość niezależnych czynników prognostycznych lub predykcyjnych: *GRM8*, *LINC00937*, *L1CAM*, *SCN7A*, *GABRG3*, *PTPRM*, *CGREF1*, *PPP4R4*, *CD200*, *FZD4*.

Porównując wyniki uzyskane metodami NGS RNA-Seq oraz RT-qPCR wykazano liniową korelację poziomów ekspresji ww. genów, co potwierdziło wiarygodność przeprowadzonych analiz.

W rakach jajnika i w guzach granicznych ujawniono ponadto odpowiednio: 14786 i 6597 genów, w których wykryto warianty genetyczne, w tym odpowiednio: 18634 i 3156 wariantów wcześniej nieopisywanych, o silnym lub pośrednim wpływie na strukturę i funkcje

kodowanych białek. Ekspresja genów w rakach jajnika korelowała z występowaniem zmian genetycznych.

W niniejszej pracy przedstawiono wiele oryginalnych wyników, poszerzających aktualny stan wiedzy na temat ekspresji genów i występowania wariantów genetycznych w rakach jajnika w kontekście odpowiedzi na leczenie, przeżycia oraz innych parametrów kliniczno-patologicznych. Walorem pracy jest również włączenie do badań guzów granicznych jajnika, których własności molekularne jak dotychczas były prawie nieznane. Szczególnie ważna jest identyfikacja genów, których ekspresja w rakach jajnika może w sposób niezależny wpływać na rokowanie lub mieć znaczenie predykcyjne. Interesującym aspektem pracy jest również identyfikacja nowych, dotąd niezbadanych genów zarówno kodujących białka jak i lncRNA, których funkcja nie jest znana. Znaczenie kliniczne lncRNA w rakach jajnika pozostawało jak dotąd bardzo słabo poznane, a w guzach granicznych nic nie było wiadomo na temat lncRNA. Ponadto badania potwierdziły heterogenność molekularną raków jajnika, która korelowała z występowaniem mutacji *missense* w genie *TP53*. Praca dostarcza także nowych, interesujących informacji na temat wariantów genetycznych, które istotnie wpływają na strukturę i funkcje białek.

Wnioski

1. Raki jajnika wykazują dużą heterogenność pod względem profilu ekspresji genów. Zróżnicowanie ekspresji genów, w tym genów kodujących lncRNA pomiędzy poszczególnymi przypadkami jest większe w przypadku występowania mutacji *missense* w genie *TP53*.

2. Ekspresja *GRM8*, *LINC00937*, *L1CAM*, *SCN7A*, *GABRG3*, *PTPRM*, *CGREF1*, *PPP4R4*, *CD200*, *FZD4* ma znaczenie prognostyczne i/lub predykcyjne w rakach jajnika.

3. Wśród genów istotnie zróżnicowanych w kontekście przeżycia oraz uzyskania całkowitej remisji choroby, poza genami kodującymi znane białka, wyłoniono szereg genów, których produkty białkowe są nieznane, wskazuje to, że prawdopodobnie istnieje wiele nieznanych dotąd białek, które mogą mieć istotne znaczenie w rakach jajnika, co stwarza przesłanki do dalszych badań.

4. *LINC01876* oraz *LINC02301* to nowe, wcześniej niebadane lncRNA, które są związane z rakiem jajnika.

5. W rakach jajnika zaburzone są setki szlaków molekularnych. Obok znanych szlaków molekularnych typowych dla raków jajnika, często pojawiają się terminy ontologiczne związane z układem nerwowym, wiązaniem jonów wapnia, aktywnością kanałów bramkowanych napięciem, niezależnie od uwzględnianych parametrów przeżycia i wrażliwości na leczenie, co podkreśla możliwe znaczenie tych ścieżek w rakach jajnika.

6. Guzy graniczne i agresywne raki jajnika, poza znalezionymi różnicami molekularnymi, ujawniają szereg takich samych genów, o znamienne zróżnicowanej ekspresji, co znalazło odzwierciedlenie we wspólnych terminach ontologicznych, istotnie wzbogaconych w obu grupach guzów. Sugeruje to, że niektóre mechanizmy rozwoju i progresji w tych dwóch odległych biologicznie nowotworach mogą być podobne.

7. W rakach jajnika w większej liczbie genów występują warianty genetyczne niż w guzach granicznych, w tym warianty nowe, wcześniej nieznane o silnym lub pośrednim wpływie na strukturę i funkcje białek.