

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње **Катарине Живић**, мастер биохемичара, пријављене под насловом „Генетичко и епигенетичко профилисање гена укључених у поправку ДНК у карциному оваријума“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Актуелност теме

Једна од најсмртоноснијих болести женског репродуктивног система је агресивни епителни тумор познат као рак јајника, који је и даље водећи извор највећег броја обољевања и смртности код жена.¹ Србија је на петом месту по старосно стандардизованој учесталости у свету (*Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, WHO*). Иако је последњих година дошло до напретка у хируршким техникама и хемиотерапијском лечењу, и даље се карцином јајника дијагностификује касно, у III и IV фази болести, због чега је успешност ових врста терапије веома ниска.² Највећи фактор ризика је породична историја болести, али утврђено је да само 5-10% свих случајева карцинома јајника има наследну компоненту. Предиспозиција за обољевање повезује се са генским изменама у оквиру *BRCA* гена (*BReast CAncer gene*) и других гена који су повезани са наследним карциномом дојке и јајника, као што су *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, и други.³ Када су у питању спорадични случајеви, само је у одређеном броју узорака (17-25%) пронађена мутација у оквиру *BRCA1* и *BRCA2* гена, што је водило претпоставци да промене у оквиру ових гена могу настати и као последица неких других механизма.⁴ Један од механизма је епигенетичко утишавање гена, односно промена у нивоу метилација у оквиру регулаторних региона гена. Метилација као епигенетички механизам, одиграва се у оквиру *CpG* острваца регулаторних региона, доводећи тако до утишавања гена и репресије транскрипције, резултујући недостатком протеина које тај ген кодира.⁵ Претпоставља се да епигенетичке промене дају исти фенотип који дају и герминативне и соматске мутације на дати скуп гена (*BRCAness*) што имплицира да би пацијенткиње код којих се утврди постојање хиперметилације у регулаторним регионима тих гена, могле имати бенефит од истог типа терапије која се примењује код наследних и спорадичних случајева карцинома са мутацијама.⁶

И поред великог удела герминативних и соматских мутација у оквиру *BRCA* гена и других гена укључених у развој карцинома оваријума, и даље велики број случајева остаје нерешен и са непознатим узроком настанка. Даља истраживања довела су до открића великог броја локуса који имају низак или средњи ризик за настанак карцинома, али су у оквиру регулаторних региона гена који се сматрају високоризичним за настанак канцера.⁷ Студије су показале да како генетичке, тако и епигенетичке промене у оквиру функционалних, али не кодирајућих региона, могу имати утицај на развој карцинома. У оквиру промотора гена налазе се важни регулаторни елементи транскрипције, док се регулаторни елементи транслације налазе углавном у оквиру 3' и 5' нетранслаторних региона (UTR).⁸ До сада је примећено присуство варијанти у оквиру 5'UTR нетранслаторног региона *BRCA1* гена у само две породице, а такође и присуство неправилних шаблона метилације у оквиру промотора гена који се повезују са карциномом јајника.^{8,5}

Како се карцином јајника детекује јако касно у последњим фазама болести, ограничен је дијапазон терапија које се у тим случајевима могу применити. Поред стандардних оперативних и процедура зрачења, од 2016. године, у Србији је одобрена терапија поли (АДП) полимеразним инхибиторима (енг. *Poly ADP polymerase inhibitors-PARPi*), али само код платина сензитивних, *BRCA1/2* позитивних, рекурентних случајева. Резултат тестирања на *BRCA1/2* мутације, и герминативне и соматске, је индикатор који указује на то како ће пацијенти са карциномом јајника клинички реаговати на соли платине и PARP инхибиторе. Детектоване герминативне или соматске мутације у *BRCA* генима представљају позитивне предиктивне биомаркере и указују на добар одговор на PARP инхибиторе и соли платине. Како је већина истраживања показала да су наследне мутације и хиперметилација међусобно искључиве (приближно 1% свих узорака се јавља са оба типа алтерација) и како је процес метилације постепен и зависи од стадијума болести и прогресије тумора, а показује исти фенотип као и мутација у оквиру *BRCA* гена, сматра се да би профилисање нивоа метилација могло представљати нови предиктивни маркер одговора на терапију код одређених пацијенткиња.⁹

Дакле, испитивања алтернативних начина за утишавање гена су од великог значаја код одређених болести, у овом случају карцинома јајника, како би се боље упознали са етиологијом ове болести и како би већи број пацијената имао корист од различитих видова терапија које се већ примењују у лечењу ове болести, конкретно у овом случају, терапије PARP инхибиторима.

3. Предмет истраживања докторске дисертације

Предмет истраживања докторске дисертације јесте испитивање генетичких и епигенетичких параметара гена који се сматрају високоризичним за настанак карцинома оваријума.

Истраживања ове докторске дисертације састојаће се из три дела:

- (1) Генетичко тестирање *BRCA1/2* гена укључених у настанак канцера оваријума,
- (2) Епигенетичко профилисање *BRCA1/2* гена у оквиру регулаторних региона као што је промотор,
- (3) Анализа сетова података из јавно доступних база и компарација са добијеним експерименталним резултатима.

Први део истраживања се састоји из генетичке анализе узорака ткива на присуство мутација у оквиру кодирајућих региона *BRCA1* и *BRCA2* гена, како би се израчунала учесталост мутација у популацији која је тестирана на ИОПС-у. Први део дисертације обухватиће и генетичко тестирање 5'UTR некодирајућих региона у генима који се сматрају високоризичним у настанку канцера оваријума, односно *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *STK11*, *PALB2*, *PTEN* и *TP53*.

Други део истраживања на узорцима једне групе пацијенткиња које су обавиле генетичко тестирање на ИОПС-у обухвата епигенетичко профилисање регулаторних региона гена (*BRCA1*, *BRCA2*), на присуство CpG метилације, и то PCR или техникама нове генерације секвенцирања. Затим, анализа генске експресије *BRCA1/2* гена путем квантитативне RT-PCR у подгрупи ових узорака са довољним квалитетом изоловане РНК.

Трећи део истраживања представља обраду добијених експерименталних података, валидацију добијених експерименталних резултата на великим сетовима јавно доступних база података, асоцијацију генетичких и епигенетичких догађаја, корелацију генске експресије са статусом ДНК метилације и мутацијама.

4. Основне хипотезе

Основне хипотезе истраживања у оквиру ове дисертације су:

- Гени одговорни за настанак карцинома јајника утишани су и као последица хиперметилације у оквиру регулаторних региона.
- Мутације и метилације у оквиру гена укључених у настанак канцера су међусобно искључиве.
- Образац метилације представља потенцијални маркер.

5. Циљеви истраживања

- Утврђивање присуства мутација у оквиру кодирајућих региона *BRCA1/2* гена код спорадичних случајева карцинома јајника.
- Утврђивање присуства мутација у некодирајућим регионима скупа гена укључених у развој оваријалног карцинома.
- Одређивање шаблона метилације у *BRCA* генима методом секвенцирања или PCR техникама.
- Утврђивање нивоа експресије *BRCA1/2* гена у узорцима пацијенткиња које болују од карцинома јајника и корелација са статусом метилације и мутација.
- Анализа јавно доступних база података: валидација добијених експерименталних резултата експресије на великим сетовима, анализа асоцијације генетичких и епигенетичких догађаја.

6. Материјал и методе истраживања

Материјал

У циљу истраживања користиће се узорци пацијенткиња са карциномом јајника добијени из парафинских узорака (енг. *Formalin Fixed Paraffine embedded-FFPE*) који су прикупљени на Институту за онкологију и радиологију Србије у оквиру стандардне дијагностичке процедуре детекције соматских мутација у оквиру *BRCA1/2* гена, за које су пацијенткиње потписале информисани пристанак. За све планиране методе биће задовољени критеријуми довољног квалитета и квантитета узорака за нисходне анализе и на основу тога бити изабрана анализирана кохорта од укупне групе пацијената за сваку од експерименталних анализа у оквиру докторске дисертације. Као други материјал користиће се подаци јавно доступних база Gene expression omnibus (GEO), cBioPortal и The Cancer Genome Atlas (TCGA) које садрже податке секвенцирања генома и/или транскриптома великог броја узорака тумора са клиничко-патолошким карактеристикама и друге податке важне за ову студију.

Методологија

- (1) РНК и ДНК ће се изоловати из исечака парафинских узорака коришћењем сетова за изолацију произвођача *QIAgene (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* и *RNeasy FFPE Kit*), или одговарајућим.
- (2) Концентрација и квалитет изоловане РНК мериће се на *Bio Spec Nano* спектрофотометру (*Shimadzu corporation, Japan*), док ће се концентрација ДНК одредити уз помоћ *Qubit dsDNA BR* есеја.
- (3) Методом реверзне транскрипције и употребом специфичне *SYBR Green* хемије, амплификаће се секвенце изоловане РНК и одредити ниво експресије гена, применом ланчане реакције полимеразе у реалном времену, односно *Real Time quantitative (RT-PCR)*.
- (4) ДНК материјал биће коришћен за генетичко профилисање у оквиру кодирајућих и некодирајућих (регулаторних) региона гена, методом секвенцирања на *MiSeq*

- апарату употребом *Illumina* технологије. Профил мутација у кодирајућим регионима *BRCA* гена одређиваће се по устањеном принципу који се изводи у оквиру дијагностичког тестирања на одељењу Експерименталне онкологије ИОРС-а, користећи *AmplifySeq for Illumina BRCA Panel*, PCR методу припреме библиотеке, *Illumina* технологију синтезе секвенцирањем, коришћењем *MiSeq Reagent Kit*-а за 300 циклуса. Обрада добијених података обавља се уз помоћ софтвера *SophiaDDM*, за чију употребу ИОРС има лиценцу, или мануелно.
- (5) ДНК ће се, такође, користити за одређивање профила метилација техником метилационо специфичне реакције полимеризације (енг. *Methylation specific PCR-MSP*) или методом секвенцирања нове генерације на *MiSeq* апарату.
- (6) Обрада резултата профила метилација након секвенцирања обавиће се уз помоћ неких од бесплатних софтвера, као што је *Galaxy* (или одговарајући) или мануелно.
- (7) Конверзије ДНК бисулфитом обавиће се коришћењем комерцијалних сетова за конверзију (*ZYMO RESEARCH Lightning/Direct kit*).
- (8) За дизајн прајмера и њихову *in silico* анализу, за све експерименте користиће се јавно доступни, бесплатни сајтови:
- за дизајн прајмера за метилационо специфичан PCR користиће се сајтови *MethPrimer* и *MethPrimer2.0*
 - за дизајн прајмера за генетичко профилисање 5'UTR некодирајућих региона користиће сајт *Primer3Plus*
 - за проналажење прајмера за експресионе анализе користиће се сајт са листом верификованих прајмера *PrimerBank*
 - за дизајн прајмера за реакције бисулфитног секвенцирања гена користиће се сајт *BiSearch*, као и програм *SnapGene*, чија се верзија *SnapGene-Viewer* може бесплатно инсталирати и користити
 - за анализу добијених прајмера користиће се неки од следећих јавно доступних web алатки: *BiSearch Primer Design and tool*, *IDT Oligo Analyzer Tool*
- (9) Одговарајући сетови јавно доступних база података ће бити одабрани за биоинформатичку анализу при чему ће бити испитана веза генске експресије са клиничко-патолошким параметрима и временом преживљавања.
- (10) Статистичке анализе радиће се применом одговарајућих статистичких тестова уз помоћ *online* алатки или у одговарајућим програмима (R, GraphPad Prism).
- За однос мутација и профила метилација користиће се тестови асоцијације: *Fisher exact test*, *Chi-squared test*, *Proportion test* или одговарајући
 - За поређење нивоа експресије *BRCA* гена у односу на мутациони статус користиће се одговарајући параметријски или непараметријски тестови: *T-test*, *ANOVA* или одговарајући
 - За одређивање утицаја мутација, односно хиперметилације, на преживљавање (укупно и преживљавање до прогресије болести) користиће се *Kaplan-Meier* и *Cox regression test*

1. Matei, D. & Nephew, K. P. Epigenetic attire in ovarian cancer: The Emperor's new clothes. *Cancer Res.* **80**, 3775–3785 (2020).
2. Vaughan, S. *et al.* Rethinking ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 719–725 (2011).
3. Nguyen, H. N., Averette, H. E. & Janicek, M. Ovarian carcinoma: A review of the significance of familial risk factors and the role of prophylactic oophorectomy in cancer prevention. *Cancer* **74**, 545–555 (1994).
4. Dougherty, B. A. *et al.* Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in highgrade serous ovarian cancers in the maintenance setting. *Oncotarget* **8**, 43653–43661 (2017).
5. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. (2003).
6. Tulin, A. V. & Lodhi, N. PARP1 genomics: chromatin immunoprecipitation approach using anti-PARP1 antibody (ChIP and ChIP-seq). *Methods Mol. Biol.* **780**, 1–17 (2011).
7. dos Santos, E. S. *et al.* Non-coding variants in BRCA1 and BRCA2 genes: Potential impact on breast and ovarian cancer predisposition. *Cancers (Basel)*. **10**, 1–21 (2018).
8. Zhang, F. & Lupski, J. R. Non-coding genetic variants in human disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, R102–R110 (2015).
9. Vos, S., Moelans, C. B. & Diest, P. J. Van. BRCA promoter methylation in sporadic versus BRCA germline mutation-related breast cancers. **2**, 1–13 (2017).