



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Tomasz Marek Wrzesiński

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Analiza różnic na poziomie transkryptomu pomiędzy trzema podtypami molekularnymi raka jasnokomórkowego nerki u pacjentów z województwa wielkopolskiego, ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji genów kodujących białka transmembranowe

Rak nerki (ang. renal cell carcinoma, RCC) stanowi ok. 2% wszystkich nowotworów diagnozowanych u dorosłych i jest odpowiedzialny za ok. 100 000 zgonów na świecie w ciągu roku. W województwie wielkopolskim w 2010 r. na tego raka zachorowało 450 osób (3,3% wszystkich nowotworów w skali kraju, 9,8% wszystkich nowotworów diagnozowanych w województwie wielkopolskim). W skali województwa odnotowano 222 zgony w wyniku tego nowotworu (9,8% zgonów w skali kraju, 2,7% wszystkich zgonów z powodu wszystkich nowotworów w skali województwa). 80% przypadków raka nerki jest diagnozowanych jako rak jasnokomórkowy nerki (ang. clear cell renal cell carcinoma, ccRCC). Jego wystąpienie jest skorelowane z dziedziczną chorobą, zwiększającą predyspozycje do nowotworów nerek, siatkówki, centralnego układu nerwowego, trzustki oraz nadnerczy, zwaną zespołem von Hippel-Lindau. Choroba ta spowodowana jest mutacją w genie supresorowym *VHL*. W ostatnich latach dowiedziono, iż inaktywacja tego genu, związana z mutacjami w obrębie sekwencji kodującej, hipermetylacją promotora oraz utratą heterozygotyczności, występuje także w przypadku sporadycznego (niezwiązanego z zespołem von Hippel-Lindau) raka jasnokomórkowego nerki z częstością 70-90%. Zauważono również, iż w przypadku 10-30% guzów ccRCC ekspresja genu *VHL* nie jest zaburzona, co sugeruje, że rozwój tego rodzaju nowotworu może zachodzić niezależnie od inaktywacji tego genu.

Dane opublikowane w 2010r. umożliwiły zaobserwowanie różnych profili ekspresji genów w trzech podtypach raka jasnokomórkowego nerki: podtyp *VHL+* ccRCC (z niezaburzoną ekspresją genu *VHL*), podtyp *VHL*-/*H2* ccRCC (z inaktywacją genu *VHL* oraz inaktywacją genu *HIF1A*) oraz podtyp *VHL*-/*H1H2* (z inaktywacją genu *VHL* oraz inaktywacją

genów *HIF1A* oraz *EPAS1*). Na dzień dzisiejszy niewiele wiadomo na temat transkryptomu komórek ccRCC, a w szczególności różnic w ekspresji genów pomiędzy próbkami różniącymi się parametrami klinicznymi, genetycznymi (inaktywacja genów *VHL*, *HIF1A* i *EPAS1*) i populacyjnymi (pochodzenie etniczne pacjentów).

Aby odpowiedzieć na pytanie, jakie geny ulegają zróżnicowanej ekspresji w ccRCC, w naszym zespole przeprowadzono meta-analizę opartą na danych macierzowych. Jedną z takich grup genów, które ulegają zróżnicowanej ekspresji na podstawie wyników meta-analizy jest rodzina genów kodujących potencjalne białka transmembranowe (ang. transmembrane proteins, TMEMs). Rodzina białek TMEM to około 320 białek, będących przypuszczalnie integralną częścią błon komórkowych, endosomalnych, aparatu Golgiego oraz reticulum endoplazmatycznego. Poszczególne białka z rodziny TMEM charakteryzują się bardzo dużą konserwatywnością budowy u różnych organizmów, jednak nie stwierdza się homologii pomiędzy różnymi białkami tej grupy. Co ciekawe, funkcja większości tych białek pozostaje nadal nieznaną.

Celem pracy doktorskiej pt. „Analiza różnic na poziomie transkryptomu pomiędzy trzema podtypami molekularnymi raka jasnokomórkowego nerki u pacjentów z województwa wielkopolskiego, ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji genów kodujących białka transmembranowe” jest analiza transkryptomu guzów *VHL+* ccRCC, *VHL-/H2* ccRCC oraz *VHL-/H1H2* przy użyciu sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) należącej do metod sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS). Dodatkowo, dane uzyskane z tych eksperymentów będą korelowane z parametrami klinicznymi, takimi jak wielkość guza, obecność przerzutów czy stopień zaawansowania choroby. Kolejnym celem pracy jest wykazanie możliwości wykorzystania różnic w poziomie ekspresji genów kodujących białka z rodziny TMEM jako biomarkera zdolności do przerzutowania.

W tkance nowotworowej oraz krwi obwodowej pacjentów oznaczano ekspresję 10 genów kodujących białka z rodziny białek TMEM za pomocą metody qPCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy). Porównano ekspresję w/w genów pomiędzy tkankami zmienionymi nowotworowo (n=70) oraz tkankami histopatologicznie niezmiennymi (n=20). Zaobserwowano dużą różnicę w ekspresji pomiędzy porównywanymi grupami w przypadku genów *TMEM7*, *TMEM22*, *TMEM30B*, *TMEM45A*, *TMEM45B*, *TMEM61*, *TMEM72*, *TMEM116*, *TMEM207* oraz *TMEM213*. Największą różnicę w ekspresji uzyskano dla genu *TMEM213* (ekspresja niższa 1600 razy niża w przypadku raka jasnokomórkowego nerki, w odniesieniu do tkanek histopatologicznie niezmiennych). Ponadto, zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy rozmiarem guza, a ekspresją genów *TMEM207*, *TMEM213* i *TMEM45B*, oraz ujemną korelację pomiędzy stopniem zróżnicowania komórek (tzw. Fuhrman grading) a ekspresją genów *TMEM213*, *TMEM207*, *TMEM30B* i *TMEM45B*. Metodą regresji logistycznej

wykazano statystycznie istotną rolę ekspresji genów kodujących białka TMEM w progresji i rozwoju raka jasnokomórkowego nerki, mierzoną wielkością guza, stopniem zróżnicowania komórek oraz zdolnością guza do przerzutowania.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej mają kluczowe znaczenie dla rozwoju gospodarki, zarówno na poziomie globalnym, jak i lokalnym. W chwili obecnej duże znaczenie przywiązuje się do odkrywania genów, mogących być celami dla nowych leków, w tym leków biologicznych. W celu zapobiegania, leczenia oraz wykrywania chorób nowotworowych, konieczna jest obserwacja fenotypu nowotworów, będącego wypadkową zmian w na poziomie genomu, transkryptomu, proteomu oraz cech epigenetycznych. Rozwój nowych technik całogenomowego badania zmian nowotworowych będzie prowadził do zmian w klasyfikowaniu guzów na podstawie cech genetycznych, a nie fenotypowych, jak ma to miejsce w chwili obecnej. Badania przedstawione w pracy doktorskiej wpisują się w powyższe trendy, ponieważ ich celem jest odkrycie nowych markerów genetycznych i celów dla efektywnego leczenia. Spowoduje to, że dzięki temu decyzja dotycząca leczenia oraz przewidywanie progresji rozwoju nowotworów będą mogły być uzależnione od zmian genetycznych w obrębie pojedynczego guza. Bezpośrednim wynikiem pracy doktorskiej będzie lista czynników genetycznych, których ekspresja jest skorelowana z występowaniem i rozwojem konkretnego rodzaju nowotworu, co będzie stanowiło podstawę do opracowania nowatorskich sposobów leczenia, umożliwiających przywrócenie prawidłowej ekspresji tych genów. Dodatkowo, wyniki pracy doktorskiej dotyczące zmian ekspresji genów kodujących białka z rodziny TMEM obserwowanych w komórkach krwi obwodowej umożliwią opracowanie prostego i efektywnego narzędzia diagnostycznego do prognozowania przerzutowania, w konsekwencji powodując wcześniejsze wykrywanie ccRCC, co jest kluczowe dla skuteczności terapii tego typu zmian.