

KROŽNE RNA IN HEPATOCELULARNI KARCINOM

Hana Trček¹, Benjamin Bajželj¹, Rok Razpotnik¹, Blaž Trotovšek², Arpad Ivanecz³, Miha Petrič², Mihajlo Đokić², Boštjan Plešnik², Irena Plahuta³, Martin Zaplotnik⁴, Linda Cellner⁴, Rado Janša⁴, Robert Vidmar⁵, Marko Fonović⁵, Uršula Prosenc Zmrzljak⁶, Petra Hudler¹, Damjana Rozman¹, Tadeja Režen¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Ljubljana, Slovenija

² Univerzitetni klinični center Ljubljana, Kirurška klinika, Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Ljubljana, Slovenija

³ Univerzitetni klinični center Maribor, Klinični oddelek za splošno in abdominalno kirurgijo, Maribor, Slovenija

⁴ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za gastroenterologijo, Ljubljana, Slovenija

⁵ Institut Jožef Štefan, Odsek Biokemija, Molekularna in Strukturna Biologija, Ljubljana, Slovenija

⁶ BIA Separations CRO, Labena d.o.o., Ljubljana, Slovenija

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najpogostejša oblika primarnega raka jeter in predstavlja enega glavnih vzrokov z rakom povezanih smrti na globalni ravni. S trenutno diagnostiko (slikovne tehnike, biopsija jeter, krvni α -fetoprotein) ta tip raka pogosto odkrijemo v že napredovanem stadiju. V zadnjem desetletju so krožne RNA (circRNA) prišle v ospredje raziskav na področju raka. Večina študij o izražanju circRNA v tumorjih HCC v primerjavi z oddaljenim netumorskim tkivom, ki so trenutno na voljo v podatkovni zbirki Gene Expression Omnibus, je bila izvedena na vzorcih pacientov, zdravljenih v kitajskih zdravstvenih ustanovah. V teh regijah je okužba s hepatitis B virusom za razliko od zahodnega sveta še vedno glavni dejavnik tveganja za razvoj HCC. V povzetku poročamo o karakterizaciji krožne RNA hsa_circ_0062682 in ocenjujemo njen diagnostični potencial na pacientih, zdravljenih v slovenskih zdravstvenih ustanovah Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in Maribor (UKC LJ, UKC MB) (1) ter transkriptomu circRNA 10 pacientov z uporabo metodologije sekvenciranja dolgih branj tehnologije Oxford Nanopore.

Z analizo že objavljenih podatkov, pridobljenih z uporabo mikromrež, smo identificirali 38 (32 nadizraženih, 6 znižano izraženih) spremenjeno izraženih circRNA v tumorjih HCC. Izbrani kandidatni circRNA hsa_circ_0062682 smo potrdili onkogeni potencial z uporabo funkcionalnih testov na modelnih celičnih linijah HCC. S pomočjo biotiniliranih oligonukleotidov v kombinaciji z masno spektrometrijo ter RNA imunoprecipitacijo smo potrdili vezavne partnerje, med drugim z YBX1, znanim onkogenom. Zanimivo je dognanje, da je izražanje hsa_circ_0062682 v naši kohorti pacientov, ki imajo metabolno in z alkoholom povezavo etiologijo bolezni, obratno kot v pacientih, zdravljenih v kitajskih ustanovah. Razlike v izražanju hsa_circ_0062682 med kohortama nakazujejo na možen vpliv etiologije in molekularnih podtipov HCC pacientov, vključenih v študijo. Z metodama RT-qPCR in ddPCR smo določili nivo hsa_circ_0062682 v plazmi in tako ocenili njen diagnostični potencial neinvazivnega biomarkerja.

Z uporabo tehnologije sekvenciranja dolgih branj Nanopore smo ovrednotili transkriptom circRNA tumorskega in oddaljenega netumorskega tkiva 10 pacientov s primarnim HCC, zdravljenih v UKC LJ in UKC MB. Knjižnico circRNA smo pripravili po modificiranem protokolu Rahimi in sod. (2). V prvem koraku smo uporabili biotinilirane DNA probe proti ribosomalni RNA, čemur je sledila razgradnja linearnih RNA s pomočjo encima RNaza R. Tako pridobljen nabor obogateneh circRNA smo linearizirali, prepisali in pomnožili po Nanopore protokolu »cDNA-PCR Sequencing Kit« (SQK-PCS111). Z opisanim protokolom smo skupno sekvencirali 323 milijov branj, ki so presegla določeno mejno vrednost kvalitete (Q score ≥ 9). Med temi smo identificirali 21261 molekul circRNA, katerih mesta povratnega spoja sovpadajo bodisi z eksonskimi mejami ali pa so ta poročana v prostodostopnih podatkovnih zbirkah. Znotraj teh 21261 circRNA branj smo identificirali 9672 različnih mest povratnega spoja. Z metodo RT-qPCR smo na 60 vzorcih RNA zaenkrat potrdili 7 circRNA, ki se v tumorskem tkivu spremenjeno izražajo v primerjavi z okoliškim netumorskim

p22

tkivom. V prihodnje bomo izražanje circRNA ovrednotili na večjem številu FFPE vzorcev slovenskih pacientov. Izbranim kandidatnim circRNA bomo ocenili onkogeno oz. tumor supresorsko vlogo na modelnih celičnih linijah HCC. S tem upamo, da bomo pripomogli k razumevanju izražanja circRNA pri patologiji HCC, predvsem na evropski populaciji pacientov.

Literatura

1. Razpotnik R, Vidmar R, Fonović M, Rozman D, Režen T. Circular RNA hsa_circ_0062682 Binds to YBX1 and Promotes Oncogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 2022;14(18):4524.
2. Rahimi K, Venø MT, Dupont DM, Kjems J. Nanopore sequencing of brain-derived full-length circRNAs reveals circRNA-specific exon usage, intron retention and microexons. *Nat Commun*. 2021;12(1):4825.