

Monika Lesicka, MSc

An analysis of methylation and expression profile of core circadian genes in breast cancer

Dissertation for the degree of Doctor of Medical Sciences

The work was done at the Department of Molecular genetics and Epigenetics of Nofer Institute of Occupational Medicine under supervision of Prof. Edyta Reszka

A series of publications included in the doctoral dissertation

1.1 Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Siekierzycka A., Skokowski J., Kalinowski L., Wąsowicz W., Reszka E. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics PLoS ONE 13(6): e0199622; 2018; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199622>

1.2. Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Skokowski J., Kalinowski L., Reszka E. A different methylation profile of circadian genes promoter in breast cancer patients according to clinicopathological features, Chronobiology International, 36:8, 1103-1114, 2019; DOI: 10.1080/07420528.2019.1617732

1.3 Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Peptońska B., Gromadzinska J., Seroczyńska B., Kalinowski L., Skokowski J., Reszka E. Circadian gene polymorphisms associated with breast cancer susceptibility. International Journal of Molecular Sciences 2019, 20(22), 5704; <https://doi.org/10.3390/ijms20225704>

Total score for the series of publications

IF= 9,521 MNiSW= 275

Introduction

Breast cancer is a complex disease that is a significant problem for contemporary society. Recently, it has been postulated that molecular causes of the disease include circadian rhythm disruptions. Circadian rhythm is the recurrent sequence of physiological processes and behavioral activities during 24 hours. It is a central oscillator, which allows to adjust numerous internal processes to external environmental factors. Genes involved in the generation and maintenance of circadian rhythms at the cellular level are known as clock genes (clock genes or circadian genes).

Recently, around 20 clock genes have been identified which form pathways and interact on a feedback loop. In mammals including human, the basic clock genes are represented by three transcription factors: *BMAL1*, *CLOCK*, *NPAS2* and genes activated by them including *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*. Clock genes are involved in maintaining the homeostasis of the body by controlling many physiological processes including cell cycle control, repairing DNA damage, cell proliferation, maintaining genome stability, oxidative stress, apoptosis as well as metabolism. Due to the fact that these physiological processes are often disturbed in various cancers including breast cancer, it is supposed that circadian genes deregulations may also play an important role in breast cancer development. Only few studies revealed altered expression and methylation profile of circadian genes in breast cancer. These alterations have been observed in breast tumor tissue and in peripheral blood leukocytes, especially in women who work night shifts system and exposed to light at night. Circadian gene polymorphisms are one of the important aspects of breast cancer research. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of circadian genes is recognized as one of the breast cancer risk factors due to the association between various SNP variants and disruptions of circadian genes transcriptions. Epidemiological studies have shown a significant association between clock genes variants and susceptibility to mental disorders, obesity, type II diabetes, metabolic syndrome and cancer. So far, there are not many studies related to the association between breast cancer risk and circadian gene polymorphisms.

The Aim of doctoral dissertation

The main objective of the doctoral dissertation was to search for significant effects of crucial circadian genes *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2*, *PERIOD* (*PER1*, *2*, *3*), *CRYPTOCHROME* (*CRY1*, *2*) and *TIMELESS* in the process of the carcinogenesis in the mammary gland by examining methylation profile of promoter regions and expression of circadian genes in breast tumor tissue and in adjacent non-tumor tissue with reference to clinical and histopathological type of tumor and estrogen receptor/progesterone receptor status. Additional aim of the doctoral thesis was to find an association between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of selected clock genes and breast cancer susceptibility among population of polish women.

Material and methods

The conducted studies in the presented doctoral thesis were approved by the relevant Ethical Institutional Review Board at the Nofer Institute of Occupational Medicine, resolution No. 20/2014 on 4 November 2014 and resolution No. 04/2019 on 10 April 2019.

The study group consisted of 321 patients with newly diagnosed breast cancer from two Polish medical centres and control group consisted of 364 healthy women from lodzkie voivodship enrolled by the Nofer Institute of Occupational Medicine in Lodz (NIOM). Cancer patients were recruited from two medical centres including 107 patients from the Department of Surgical Oncology at the Medical University of Gdansk (107 pairs of tissues: tumor tissues and adjacent non-tumor tissues have been archived at Central Bank of Frozen Tissues and Genetic Specimens; Department of Medical Laboratory Diagnostics) and 214 patients from the Copernicus Memorial Hospital in Lodz (214 samples of whole peripheral blood have been archived at NIOM). Demographic and clinical features were collected from the participants.

Gene expression analysis for ten circadian genes *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *CRY2*, *TIMELESS*, *CSNK1ε* was performed. To examine the gene expression profile in tissue pairs, quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) technique with intercalating SYBR Green dye was used (**manuscript 1.1**). The methylation profile of the promoter regions of eight clock genes: *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS* was analyzed in the tissue pairs, based on the Real-Time Methylation-Specific PCR quantitative reaction method (**manuscript 1.2**). An analysis of sixteen single nucleotide polymorphisms of circadian genes including *BMAL1* (rs2279287), *CLOCK* (rs1801260), *CLOCK* (rs12505266), *CRY1* (rs8192440), *CRY2* (rs10838524), *CRY2* (rs3824872), *PER3* (rs10462020), *PER1* (rs2735611), *PER2* (rs934945), *PER2* (rs2304672), *PER1* (rs3027178), *PER2* (rs11894491), *PER3* (rs2640909), *NPAS2* (rs2305160), *TIMELESS* (rs2279665), *TIMELESS* (rs774047) were performed by genotyping using fluorescent TaqMan probes SNP in Real-Time PCR system. Selected circadian genetic variants were evaluated regarding to risk of breast cancer susceptibility in population of polish women (**manuscript 1.3**)

Summary of main results

1. Tumor tissues were characterized by a significantly higher level of *CLOCK* and *TIMELESS* expression in comparison to adjacent non-tumor tissues. In contrast, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2* expression were reduced in tumor tissue in comparison to adjacent non-tumor tissue. (**manuscript 1.1**)
2. The clinical classification (TNM) of disease affects *CRY2* transcript level in breast cancer tissue. The tumor grading and hormonal status affect the expression level of selected clock genes *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* in mammary gland tumor. (**manuscript 1.1**)
3. A significantly reduced methylation level of *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY2* promoter regions were observed in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue. Whereas, *PER1*,

PER2, *PER3* promoter regions had an increased methylation level in cancer tissues in comparison to adjacent non-tumor tissues. (**manuscript 1.2**)

4. Significant changes in methylation pattern of *PER1*, *PER2*, *PER3* promoter regions were observed in tumor tissues with higher histological and hormonal malignancy (ER-/PR-). (**manuscript 1.2**)
5. Overexpression of *CLOCK* may be associated with hypomethylation of their promoter region. Promoter regions hypermethylation of *PERIOD* suppressor genes may lead to decrease of gene expression and disrupt their function. (**manuscript 1.2**)
6. Genetic polymorphism of clock genes can modulate the risk of breast cancer susceptibility of Polish women. The probable protective effect may be indicated for the *BMAL1* rs2279287 while the *CRY2* rs10838524, *PER1* rs2735611, *PER2* rs934945 indicate to probable increased risk of breast cancer in the studied population. (**manuscript 1.3**)
7. Genetic variants of circadian genes may affect transcription level in adjacent non-tumor tissues (*PER1*, *PER2*) and breast cancer tissue (*BMAL1*, *CRY2*, *PER3*). (**manuscript 1.3**)

Conclusions

Based on the obtained results, it could be concluded that core circadian genes may play a role in the process of carcinogenesis in the mammary gland.

1. There is a difference in the transcription level of selected clock genes in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue, which may indicate their impact on carcinogenesis in the mammary gland.
2. There is an association between the transcription level of circadian genes and clinical features of breast cancer patients.
3. There is an altered methylation pattern of circadian promoter regions in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue, which may have impact on carcinogenesis in the mammary gland.
4. Differences of circadian promoter methylation pattern in breast tumor are associated with stage of cancer in the mammary gland.
5. Methylation of clock gene genes may affect the circadian gene expression level in tissues derived from the mammary gland of breast cancer patients.
6. Single nucleotide polymorphisms of core circadian genes may modulate the breast cancer susceptibility.
7. Genetic polymorphism may affect the circadian gene expression in adjacent non-tumor tissues and breast cancer tissue.

Monika Desicke

Mgr Monika Lesicka

Analiza profilu metylacji i ekspresji kluczowych genów rytmu okołodobowego w raku piersi

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Epigenetyki
Instytutu Medycyny Pracy imp. Prof. J. Nofera
pod kierunkiem dr hab. Edyty Reszki, prof. IMP

Zbiór publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1.1 Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Siekierzycka A., Skokowski J., Kalinowski L., Wąsowicz W., Reszka E. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics PLoS ONE 13(6): e0199622; 2018; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199622>

1.2. Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Seroczyńska B., Skokowski J., Kalinowski L., Reszka E. A different methylation profile of circadian genes promoter in breast cancer patients according to clinicopathological features, Chronobiology International, 36:8, 1103-1114, 2019; DOI: 10.1080/07420528.2019.1617732

1.3 Lesicka M., Jabłońska E., Wieczorek E., Peptońska B., Gromadzinska J., Seroczyńska B., Kalinowski L., Skokowski J., Reszka E. Circadian gene polymorphisms associated with breast cancer susceptibility. International Journal of Molecular Sciences 2019, 20(22), 5704; <https://doi.org/10.3390/ijms20225704>

Łączna punktacja dla cyklu publikacji

IF= 9,521 MNiSW= 275

Wstęp

Rak piersi jest złożoną chorobą, która stanowi istotny problem dla współczesnego społeczeństwa. Od niedawna, przypuszcza się że, jedną z molekularnych przyczyn tej choroby, są zaburzenia rytmu okołodobowego. Cykl okołodobowy to powtarzające się w ciągu 24 godzin zmiany procesów fizjologicznych i aktywności behawioralnej. Jest on centralnym regulatorem, który pozwala przystosować liczne procesy wewnętrzne do zewnętrznych czynników środowiska. Geny zaangażowane w generację i utrzymanie rytmu okołodobowego na poziomie komórek, nazwane są genami zegarowymi (ang. clock genes lub circadian genes). Do tej pory poznano ok. 20 genów zegarowych, które tworzą między sobą szlaki sygnałowe i oddziałują na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Podstawowymi genami zaangażowanymi w tę sieć oddziaływań są: czynniki transkrypcyjne: *BMAL*, *CLOCK*, *NPAS2* oraz geny przez nie aktywowane *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*. Geny zegarowe biorą udział w utrzymaniu homeostazy organizmu poprzez kontrolę wielu procesów fizjologicznych w tym: kontrolę cyklu komórkowego, naprawę uszkodzeń DNA, proliferację komórek, utrzymywanie stabilności genomu, stres oksydacyjny, zaprogramowaną śmierć komórki – apoptozę, a także prawidłowy metabolizm. Z tego powodu, że w różnych typach nowotworów, w tym w raku piersi obserwuje się deregulację wymienionych procesów komórkowych, uważa się, że zaburzenia rytmu okołodobowego na poziomie molekularnym mogą odgrywać istotną rolę również w procesie kancerogenezy w gruczole piersiowym. Nieliczne badania wskazują bowiem na zmieniony profil ekspresji oraz metylacji genów zegarowych. Zmiany te zostały już zaobserwowane w tkance guza piersi lub leukocytach krwi obwodowej, zwłaszcza u kobiet pracujących w systemie pracy zmianowej i narażone na światło w nocy.

Ważnym aspektem w badaniach nad wpływem zaburzeń rytmu okołodobowego na etiologię raka piersi jest polimorfizm genetyczny. Coraz częściej jest on uznawany, jako istotny czynnik wpływający na podwyższenie ryzyka zachorowania na nowotwory z powodu wpływu wariantów genetycznych na poziom ekspresji genów zegarowych. Wiele badań epidemiologicznych wskazuje na związek polimorfizmu genów zegarowych a skłonnością do zaburzeń psychicznych, otyłości, cukrzycy typu II, zespołu metabolicznego jak i nowotworów. Jak dotąd niewiele prac podejmuje temat związku z zachorowalnością na raka piersi a wariantami polimorficznymi genów zegarowych.

Cele pracy doktorskiej

Głównym celem prezentowanej pracy doktorskiej było poszukiwanie znaczenia kluczowych genów zegarowych: *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2* *PERIOD* (*PER1*, *2*, *3*), *CRYPTOCHROME* (*CRY1*, *2*) oraz *TIMELESS* w procesie kancerogenezy w gruczole piersiowym poprzez zbadanie profilu metylacji regionów promotorowych oraz ekspresji genów zegarowych w guzach piersi oraz w tkance otaczającej guz w odniesieniu do parametrów klinicznych, histopatologicznych oraz statusu receptora estrogenowego i progesteronowego. Dodatkowym celem pracy doktorskiej było zbadanie zależności pomiędzy polimorfizmem genetycznym (SNP) wybranych genów zegarowych a ryzykiem zachorowania na raka piersi w populacji polskich kobiet.

Materiał i metody

Na przeprowadzenie badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej otrzymano stosowne zgody lokalnej Komisji Bioetycznej przy Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi im. prof. J. Nofera w Łodzi uchwała nr 20/2014 z dnia 4.11.2014r. oraz uchwała nr 04/2019 z dnia 10.04.2019r.

Grupa badana składała się 321 pacjentek z nowo rozpoznany rakiem piersi z dwóch polskich ośrodków medycznych oraz grupa kontrolna składająca się z 364 zdrowych kobiet pochodzących z województwa łódzkiego zgłaszających się do Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi (IMP).

Pacjentki z rakiem piersi pochodziły z dwóch ośrodków medycznych: 107 pacjentek z Kliniki Chirurgii Onkologicznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (107 par tkanek: guza i otaczających guz zdeponowano i zarchiwizowano w Centralnym Banku Tkanek i Materiału Genetycznego przy Zakładzie Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz 214 pacjentek z Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi (214 próbek pełnej krwi obwodowej zdeponowano i zarchiwizowano w IMP). Zebrano dane kliniczne, jak i kwestionariuszowe.

W nowotworowo zmienionej tkance gruczołu piersiowego oraz tkance wolnej od komórek nowotworowych, przeprowadzono badanie konstytutywnej ekspresji mRNA dziesięciu genów zegarowych *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS*, *CSNK1ε* za pomocą ilościowej techniki Real-Time PCR (qRT-PCR) z interkalującym barwnikiem SYBR Green (**publikacja 1.1**). Profil metylacji regionów promotorowych ośmiu genów zegarowych: *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *TIMELESS* w tkance guza i tkance otaczającej guz został zanalizowany w oparciu o metodę ilościowej reakcji Real-Time Methylation-Specific PCR (**publikacja 1.2**). Analizę szesnastu wyselekcjonowanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) genów zegarowych: *BMAL1* (rs2279287), *CLOCK* (rs1801260), *CLOCK* (rs12505266), *CRY1* (rs8192440), *CRY2* (rs10838524), *CRY2* (rs3824872), *PER3* (rs10462020), *PER1* (rs2735611), *PER2* (rs934945), *PER2* (rs2304672), *PER1* (rs3027178), *PER2* (rs11894491), *PER3* (rs2640909), *NPAS2* (rs2305160), *TIMELESS* (rs2279665), *TIMELESS* (rs774047) wykonano za pomocą znakowanych fluorescencyjnie sond TaqMan w systemie Real-Time PCR. Wybrane warianty genetyczne przeanalizowano pod kątem ryzyka zachorowania na raka piersi, oraz ich wpływu na poziom ekspresji badanych genów zegarowych (**publikacja 1.3**).

Podsumowanie najważniejszych wyników

1. Tkanki nowotworowe charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem ekspresji dla genów *CLOCK* oraz *TIMELESS* w odniesieniu do tkanki okołonowotworowej. Natomiast geny *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2* charakteryzowały się istotnie obniżonym poziomem ekspresji w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz. (**publikacja 1.1**)
2. Stopień zaawansowania (TNM) choroby wpływa na poziom ekspresji genu *CRY2* w tkance nowotworowej. Stopień złośliwości histologicznej (G) oraz status hormonalny guza wpływa na poziom ekspresji wybranych genów zegarowych *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* w tkance guza. (**publikacja 1.1**)
3. Zaobserwowano istotnie obniżony poziom metylacji regionów promotorowych dla genów *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY2* w tkance nowotworowej w odniesieniu do tkanki

otaczającej guz. Odwrotną zależność wykazano dla genów *PER1*, *PER2*, *PER3*, gdzie tkanki guza charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem metylacji regionów promotorowych w odniesieniu do tkanki okołonowotworowej. (**publikacja 1.2**)

4. Istotne zmiany we wzorze metylacji regionów promotorowych zaobserwowano dla genów *PER1*, *PER2*, *PER3* w odniesieniu do tkanek nowotworowych o wyższej złośliwości histologicznej (G) jak i hormonalnej (ER-/PR-). (**publikacja 1.2**)
5. Nadekspresja genu *CLOCK* może być związana z hipometylacją regionu promotorowego wskazanego genu. Hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych z grupy *PERIOD* może wpływać na obniżoną ekspresję tych genów i zaburzenie ich supresorowej funkcji. (**publikacja 1.2**)
6. Polimorfizm genetyczny genów zegarowych może wpływać na ryzyko zachorowania na raka piersi w populacji polskich kobiet. Prawdopodobny efekt ochronny można wskazać dla polimorfizmu genu *BMAL1* rs2279287. Natomiast polimorfizmy genów *CRY2* rs10838524, *PER1* rs2735611, *PER2* rs934945 charakteryzują się prawdopodobnie podwyższonym ryzykiem zachorowania raka piersi w badanej populacji. (**publikacja 1.3**)
7. Polimorfizm genetyczny badanych genów zegarowych może wpływać na poziom transkrypcji genów zarówno w tkance otaczającej guz (*PER1*, *PER2*), jak i w tkance guza (*BMAL1*, *CRY2*, *PER3*). (**publikacja 1.3**)

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować iż kluczowe geny zegarowe mogą pełnić rolę w procesie nowotworzenia w gruczole piersiowym.

1. Istnieje różnica w poziomie transkrypcji wybranych genów zegarowych w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, co może świadczyć o ich wpływie na proces kancerogenezy w gruczole piersiowym.
2. Istnieje zależność pomiędzy poziomem transkrypcji genów zegarowych a określonymi parametrami klinicznymi pacjentek z rakiem piersi.
3. Istnieje zmieniony wzorec metylacji regionów promotorowych wybranych genów zegarowych w tkance guza w odniesieniu do tkanki otaczającej guz, co może świadczyć o jego wpływie na proces transformacji nowotworowej w gruczole piersiowym.
4. Zmiany na poziomie epigenetycznym w regionach promotorowych badanych genów zegarowych w tkance guza korespondują ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w gruczole piersiowym.
5. Metylacja regionów promotorowych genów zegarowych może wpływać na poziom ekspresji tych genów w tkankach pochodzących z gruczołu piersiowego pacjentek z rakiem piersi.
6. Polimorfizm genetyczny pojedynczych nukleotydów badanych genów zegarowych może modulować ryzyko zachorowania na raka piersi.
7. Polimorfizm genetyczny badanych genów zegarowych może wpływać na poziom transkrypcji tych genów zarówno w tkance otaczającej guz, jak i w tkance guza

Maria Lesińska