



Gdański Uniwersytet Medyczny

Rozprawa doktorska

**Znaczenie alternatywnego składania mRNA w patogenezie wybranych
nowotworów człowieka**

Anna Jasiak

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Ratajska

Promotor pomocniczy: dr n.med. Alina Kuźniacka

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ LEKARSKI

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII I GENETYKI MEDYCZNEJ

Gdańsk 2023

Serdecznie dziękuję wszystkim, których wsparcie
zaowocowało powstaniem przedłożonej pracy,
w szczególności:

Mojej promotor

Pani dr hab. n. med. Magdalenie Ratajskiej
za ogromne wsparcie, opiekę mentorską oraz
pokazanie jak być nie tylko dobrym naukowcem,
ale przede wszystkim dobrym człowiekiem.

Pracę dedykuję mojemu mężowi.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH	4
2. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE	5
3. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
4. STRESZCZENIE	8
5. ABSTRACT	9
6. WPROWADZENIE	10
7. HIPOTEZA I CELE BADAŃ	17
7.1 Hipoteza:	17
7.2 Cel Główny:	17
7.3 Cele Szczegółowe:	17
8. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.	18
8.1 Publikacja 1	18
8.2 Publikacja 2	19
9. NIEOPUBLIKOWANA CZĘŚĆ BADAŃ	21
9.1. Materiały i metody	21
9.2. Wyniki	24
9.3. Dyskusja	28
10. PODSUMOWANIE	31
11. PIŚMIENNICTWO	32
12. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	34

1. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH

1.1. DOI:10.1016/j.yexmp.2023.104856

JASIAK ANNA, KOCZKOWSKA MAGDALENA, STUKAN MACIEJ, WYDRA DARIUSZ, BIERNAT WOJCIECH, IŻYCKA-ŚWIESZEWSKA EWA, BUCZKOWSKI KAMIL, ECCLES MICHAEL, WALKER LOGAN, WASAG BARTOSZ, RATAJSKA MAGDALENA. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 alternative splicing in predisposition to ovarian cancer*. Exp. Mol. Pathol.; 2023: vol. 130, art. ID 104856, s. 1-7.

Charakterystyka Merytoryczna: praca oryginalna

Impact Factor: 4.401

Punktacja MEiN:70.000

1.2. DOI: 10.3390/genes12020168

JASIAK ANNA, KRAWCZYŃSKA NATALIA, ILISZKO MARIOLA, CZARNOTA KATARZYNA, BUCZKOWSKI KAMIL, STEFANOWICZ JOANNA, ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA ELŻBIETA, CICHOSZ GRZEGORZ, IŻYCKA-ŚWIESZEWSKA EWA. *Expression of BARD1 β isoform in selected pediatric tumors*. Genes; 2021:vol. 12,nr 2, art ID 168, s. 1-14.

Charakterystyka merytoryczna: praca oryginalna

Impact Factor: 4.141

Punktacja MEiN:100.000

Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): **8.542**

Łączna punktacja MEiN:**170.000**

Badania wykonano dzięki finansowaniu z:

Narodowego Centrum Nauki:

2014/15/B/NZ4/04855; KBN N401 176 31/3867; 2011/02/A/NZ2/00017

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

ST 02/0562/07; ST 02-0002

Nowozelandzkiego Instytut Badań nad Nowotworami (z ang. *The New Zealand Institute For Cancer Research Trust*)

2. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

2.1. Prezentacje plakatowe na konferencjach naukowych:

2.1.1. New Zealand Society for Oncology Conference; 21-23 September 2023; Napier, New Zealand:

Jasiak Anna, Anderson Leah, Neumann Silke, Wasąg Bartosz, Weeks Robert, Walker Logan, Cunliffe Heather, Ratajska Magdalena. “Adaptive homeostasis as a possible non-genetic regulator of *BRCA1/2* splicing in ovarian cancer”

2.1.2. CLEPIC: Clinical Epigenetics International Conference, Szczecin, 24-26 May 2023, Poland:

Jasiak Anna, Anderson Leah, Neumann Silke, Wasąg Bartosz, Weeks Robert, Walker Logan, Cunliffe Heather, Ratajska Magdalena. “Adaptive homeostasis as a possible non-genetic regulator of *BRCA1/2* splicing in ovarian cancer”

2.1.3 Molecular Biology and Immunology of Cancer – R&D perspectives: ScanBalt Forum 2019; 24-25 September 2019; Gdańsk, Poland

Jasiak Anna, Fatima Muhanna, Magdalena Ratajska. “Emerging roles of *BRCA1* alternative splicing in pathogenesis of ovarian cancer.”

3. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

A	adenina
cDNA	<i>ang. complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy
Ct	<i>ang. comparative threshold</i> ; cykl progowy
DNA	<i>ang. deoxyribonucleic acid</i> ; kwas deoksyrybonukleinowy
ESE/ESS	<i>ang. exonic splicing enhancers/ silencers</i> ; znajdujące się w eksonie sekwencje regulatorowe (wzmacniające/ wyciszające) dla procesu składania mRNA
FANC	<i>ang. Fanconi anemia proteins</i> ; grupa białek zaangażowanych w replikację i naprawę DNA
G	guanina
GCT	<i>ang. germ cell tumors</i> ; nowotwory z komórek germinalnych
ISE/ISS	<i>ang. intronic splicing enhancers/ silencers</i> ; znajdujące się w intronie sekwencje regulatorowe (wzmacniające/ wyciszające) dla procesu składania mRNA
MRN	<i>MRE11/RAD50/NBN</i> ; kompleks składający się z trzech białek: MRE11, RAD50, NBN
mRNA	<i>ang. messenger ribonucleic acid</i> ; matrycowy kwas rybonukleinowy
PARP	<i>ang. Poli ADP-ribosepolimerase</i> ; polimeraza Poli-ADP-rybozy
PKB	Produkt Krajowy Brutto
RMS	<i>ang. rhabdomyosarcoma</i> ; mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy
RNA	<i>ang. ribonucleic acid</i> ; kwas rybonukleinowy
RPMI	<i>ang. Roswell Park Memorial Institute Medium</i> ; pożywka do hodowli różnych komórek ssaków

RT-qPCR	<i>ang. reverse transcriptse quantitative polymerase chain reaction;</i> reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z etapem odwrotnej transkrypcji
SNV	<i>ang. single nucleotide variant;</i> wariant pojedynczego nukleotydu
VUS	<i>ang. variants of unknown significance;</i> warianty o nieznanym efekcie biologicznym
Nazwy białek	BRCA1, BRCA2, BARD1, ATM, ATR, CHEK2, MSH2, MSH6, FANCD2, RAD51
Nazwy genów	<i>BRCA1, BRCA2, BARD1, BRAF, KRAS, MYC, CDKN2A, PTEN, RBI, TP53, ATM, ATR, CHEK2, MSH2, MSH6, FANCD2, RAD51, TERT, DNMT3A, METTL3, HDAC1, HPRT1, IPO8</i>

4. STRESZCZENIE

Składanie mRNA jest procesem złożonym i podlegającym ścisłej kontroli, która ma na celu zapewnienie prawidłowego poziomu ekspresjonowanych białek i ich izoform. Równowaga ta jest kluczowa dla utrzymania homeostazy i zapewnienia prawidłowości funkcjonowania komórki. Obecność głęboko intronowych wariantów genetycznych może prowadzić do ekspresji potencjalnie szkodliwych transkryptów, które będą predysponowały do zachorowania na nowotwory, lub (w przypadku zmian somatycznych) mogą prowadzić do promowania progresji nowotworowej. Ponadto, rozwój choroby nowotworowej cechuje się wzrostem ekspresji wielu naturalnie występujących izoform i tak na przykład, jak w przypadku izoformy *BRCA1ΔE11q* może skutkować wystąpieniem oporności na leczenie inhibitorami PARP. Co istotne, sekwencje głęboko intronowe są zwykle pomijane podczas rutynowej diagnostyki, a przez to warianty prowadzące do zaburzenia składania mogą nie być wykrywane.

Celem niniejszej pracy było pogłębienie wiedzy na temat roli alternatywnego składania genów *BARD1*, *BRCA1* i *BRCA2* w wybranych nowotworach człowieka.

W ramach przeprowadzonych badań zostały określone zmiany poziomu ekspresji *BARD1β* w neuroblastoma, nowotworach z komórek rozrodczych i rhabdomiosarcoma. Sprawdzone zostały też częstości występowania patogennych transkryptów *BRCA1/2* powstających na skutek obecności zmian głęboko intronowych. Tym samym oceniono stosowane dotychczas procedury diagnostyczne, aby uzyskać odpowiedź na pytanie, czy wystarczające jest ograniczenie badania do intronowych sekwencji flankujących. Podjęto próbę wyjaśnienia zaobserwowanej nadekspresji izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* oraz *BRCA2ΔE3* w RNA wyizolowanym z krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika, u których wykluczono występowanie wariantów genetycznych potencjalnie promujących splicing. Co istotne, zjawisko to nie występowało w próbkach kontrolnych (kobiety zdrowe). Na chwilę obecną, uzyskane wyniki wskazują na ogólnoustrojowy charakter tych zmian, jednak dokładne zrozumienie przyczyn tego zjawiska wymaga przeprowadzenia dodatkowych, bardziej szczegółowych badań.

Słowa kluczowe: alternatywne składanie mRNA, izoformy, alternatywne transkrypty, nowotwory człowieka.

5. ABSTRACT

mRNA splicing is a complex and strictly controlled process. The control mechanisms ensure the proper level of expressed isoforms and their function. This balance is crucial for maintaining homeostasis and the proper functioning of cells.

Deep-intronic variants may result in the expression of potentially carcinogenic transcript-splicing disorders, which may be involved in promoting disease progression. In addition, deregulation of many naturally occurring isoforms might result in development and progression of cancer, e.g. overexpression of the *BRCA1ΔE11q* results in resistance to PARP inhibitors.

Importantly, deep intronic sequences are usually missed during routine diagnostics, and variants leading to splicing disorders are frequently undetected.

This study aimed to deepen our knowledge of the role of alternative splicing of *BARD1*, *BRCA1* and *BRCA2* genes in set human cancers.

Our study determined changes in *BARD1β* expression in neuroblastoma, germ-cell tumours and rhabdomyosarcoma.

In addition, we analyzed the frequency of pathogenic transcripts in *BRCA1/2* resulting from profound intronic changes. Thus, assessing the present diagnostic procedures by addressing whether testing only flanking intronic sequences is sufficient.

We also try to define the overexpression of *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3* isoforms in RNA extracted from peripheral blood of sporadic ovarian cancer patients (previously found negative, with standard diagnostic approach, for genetic variants potentially promoting splicing). Notably, the overexpression was absent in a healthy women (controls) cohort. Current results indicate the systemic nature of the changes noted above; however, a detailed understanding of the underlying mechanisms requires more detailed studies.

Keywords: alternative mRNA splicing, isoforms, alternative transcripts, human cancers.

6. WPROWADZENIE

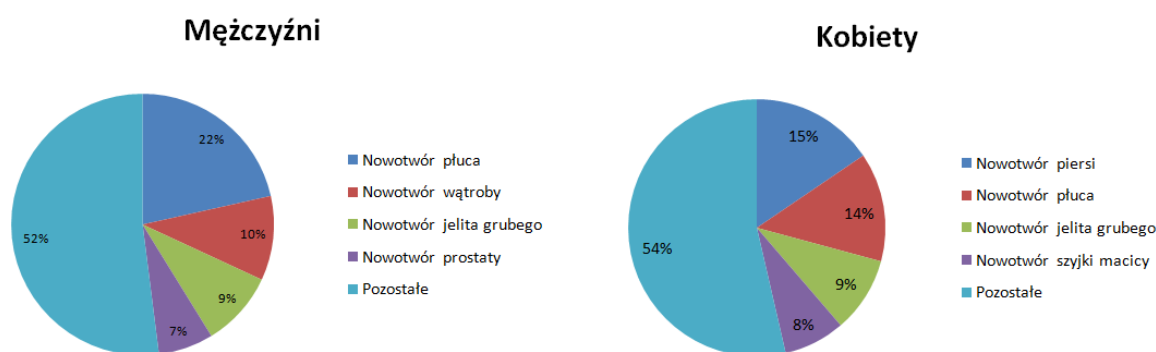
Nowotwory to heterogenna grupa chorób, charakteryzująca się nieprawidłowościami dotyczącymi zarówno namnażania jak i różnicowania się komórek.

Koszty finansowe związane z leczeniem chorób nowotworowych, spadkiem lub utratą potencjału produkcyjnego (pracowników) zostały oszacowane na 0,55% światowego PKB [1].

W Polsce, z powodu choroby nowotworowej umiera rocznie ok. 100 tys. osób, i jest to wartość odpowiadająca liczbie mieszkańców średniej wielkości miasta w naszym kraju [2].

Najczęstsze nowotwory to: rak płuca, prostaty i jelita u mężczyzn, oraz nowotwory piersi, jelita i płuca u kobiet [3]. Statystyki zachorowań z roku na rok rosną, co stanowi poważne obciążenie nie tylko dla finansów państwa (utrata mocy produkcyjnej oraz zwiększenie wydatków na ochronę zdrowia), ale także rodzin dotkniętych chorobą nowotworową. Poza globalnym aspektem finansowym, istotną rolę odgrywa także obciążenie emocjonalne i finansowe samych chorych, jak i ich rodzin. Często mówi się o spirali ubóstwa związanej z chorobą nowotworową [4].

W krajach o wysokim poziomie wydatków na służbę zdrowia współczynniki epidemiologiczne dotyczące nowotworów ulegają ciągłej poprawie, co jest często bezpośrednią konsekwencją szybkiej diagnostyki i nowoczesnych metod leczenia [5].



Rycina 1. Przedstawienie szacunkowej liczby zgonów na świecie z powodu najczęstszych nowotworów (bez podziału na grupy wiekowe) [6].

W zdrowym organizmie proliferacja i apoptoza zachodzą w sposób ciągły i pozostają w równowadze. Jednak wymknięcie się komórki spod ścisłej kontroli może zainicjować wieloetapowy proces kancerogenezy [7]. Jest to proces ciągły, jednak możliwe jest wyróżnienie czterech głównych etapów tego zjawiska: preinicjacji, inicjacji, promocji i progresji (Ryc. 2) [8].



Rycina 2. Proces kancerogenezy z podziałem na poszczególne etapy [7].

W czasie preinicjacji (etapu trwającego przez całe życie osobnicze) dochodzi do ciągłej ekspozycji organizmu na działanie czynników mutagennych (uszkodzających DNA). Do bodźców tych należy zaliczyć czynniki fizyczne (np. promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe, itp.), chemiczne (np. leki alkilujące, związki interkalujące do DNA) oraz czynniki biologiczne (np. grzyby, wirusy lub produkty metabolizmu samego organizmu). Wpływ tych czynników zależy od indywidualnych predyspozycji genetycznych i może mieć bardzo zróżnicowane skutki [3].

Inicjacja nowotworowa jest etapem, który rozpoczyna się w momencie pojawienia się uszkodzeń w DNA. Na skutek niestabilności genomowej (zjawiska charakterystycznego dla kancerogenezy), dochodzi do nagromadzenia zarówno zmian punktowych w DNA, jak i rearanżacji chromosomowych. Zmiany te upośledzają prawidłowe funkcjonowanie komórek, w tym regulację cyklu komórkowego. W wyniku tego obserwuje się nieprawidłową proliferację. Na tym etapie kluczową rolę odgrywają tak zwane mutacje kierujące lub napędzające (*ang. driving mutations*), ponieważ w ich efekcie komórki somatyczne nabywają cechy, które dają im przewagę w ich mikrośrodowisku, skutkując dalszą proliferacją i akumulacją kolejnych zmian genetycznych. Mutacje te mogą prowadzić do aktywacji onkogenu, jak również inaktywacji genu supresorowego. Przykładem tych pierwszych są zmiany w takich genach jak *BRAF*, *KRAS* i *MYC* (mają one charakter aktywujący), natomiast do najczęściej badanych genów supresorowych możemy zaliczyć: *CDKN2A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *RBI* i *TP53* [9].

Dodatkowo niestabilność genomowa prowadzi także do pojawiania się mutacji towarzyszących (*ang. passenger mutations*). Pojedynczo mutacje te, nie skutkują nabywaniem nowych, korzystnych dla komórki nowotworowej cech, jednak są one bardzo częste i stanowią nawet do 97% wszystkich mutacji identyfikowanych w nowotworze. Uważa się, że ich skumulowany efekt może być proporcjonalny do wpływu mutacji kierujących. Nagromadzenie mutacji obu typów prowadzi do zjawiska określanego jako krach mutacyjny [10].

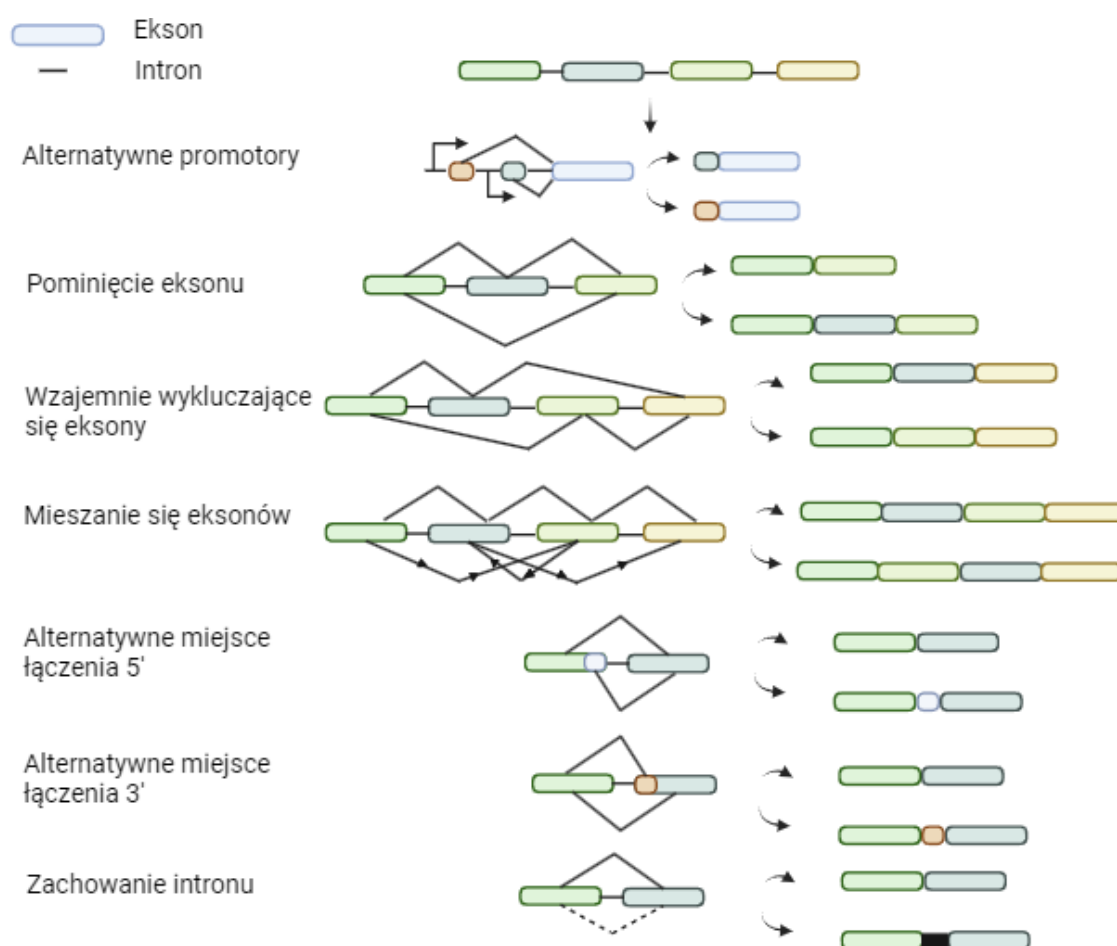
Następnie, dochodzi do akumulacji kolejnych zmian w sekwencji DNA, które powodują zmiany fenotypowe. Na tym etapie (promocja guza) zachodzi selekcja klonalna komórek nowotworowych i zapoczątkowanie tworzenia się masy guza, który występuje w określonej lokalizacji (nowotwór *in situ*). Ostatecznie, dalsze nagromadzenie zmian genetycznych i epigenetycznych prowadzi do pozyskania przez komórkę nowotworową takich cech, jak zdolność do inwazji okolicznych tkanek i przerzutowania. Ten etap rozwoju nowotworu nazywamy progresją [11].

Podsumowując najbardziej charakterystyczną cechą nowotworów jest ich zdolność do niepohamowanych podziałów komórkowych, która wraz z upośledzonym procesem apoptozy skutkuje szybkim rozrostem. Komórki nowotworowe, charakteryzują się także nieśmiertelnością, dużą niestabilnością genomową, brakiem różnicowania się, zmianami metabolizmu, zdolnością do naciekania sąsiednich tkanek oraz kolonizacji (inwazji) odległych obszarów organizmu.

Komórki nowotworowe wykazują ponadto zmiany w procesie dojrzewania mRNA (*ang. splicing*) w wyniku których może wzrosnąć poziom ekspresji występujących naturalnie izoform, lub mogą powstawać nowe, nieprawidłowe transkrypty genów. Często nadreprezentacja alternatywnych transkryptów (o odmiennych lub nawet antagonistycznych funkcjach) prowadzi do zaburzenia równowagi w komórce i pozwala komórce nowotworowej uzyskać dalszą przewagę względem komórek prawidłowych [12,13].

Redagowanie transkryptu, zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych, polega najczęściej na wycięciu intronów i połączeniu sekwencji kodującej (eksonów). W komórkach nowotworowych zaburzenia procesu składania mogą również polegać na zmianie w organizacji dojrzałego mRNA (np. inna kolejność eksonów, zachowanie fragmentów eksonów i/lub intronów; Ryc. 3).

W procesie wycinania i składania, główną rolę odgrywa kompleks rybonukleoproteinowy (tzw. spliceosom), który rozpoznaje charakterystyczną sekwencję nukleotydową zlokalizowaną na granicy ekson/intron (w pozycji od -3 do +6), a także serię luźno zdefiniowanych sekwencji tworzących tzw. punkt rozgałęzienia (ang. *branch point*) wraz z przylegającymi elementami (sekwencja polipirymidynowa i sekwencja bogata w AG/G). Ponadto, dla zapewnienia prawidłowego przebiegu procesu składania mRNA konieczny jest udział dodatkowych elementów regulatorowych, w tym sekwencji wzmacniających (ang. *enhancers*) i/lub wyciszających (ang. *silencers*). Ww. sekwencje wspomagają wczesne tworzenie kompleksu rybonukleoproteinowego i mogą być zlokalizowane zarówno w sekwencji kodującej (ang. *exonic splicing enhancers -ESE* lub *exonic splicing silencers -ESS*), jak również w sekwencji niekodującej (ang. *intronic splicing enhancers -ISE* lub *intronic splicing silencers -ISS*) [12].



Rycina 3. Przykładowe zmiany w strukturze genu na skutek alternatywnego składania mRNA [12].

Mutacje zlokalizowane w sekwencjach odpowiedzialnych za regulację składania mRNA, mogą wpływać na kształt powstałych transkryptów [13,14].

Zaburzenia w procesie składania mRNA mogą być także efektem zmian epigenetycznych, które prowadzą do modyfikacji struktury chromatyny np. na skutek metylacji DNA lub modyfikacji w obrębie histonów [15]. W cząsteczce RNA, regulacja składania odbywa się za pośrednictwem metylacji M6-adenozyny (m6A) [16].

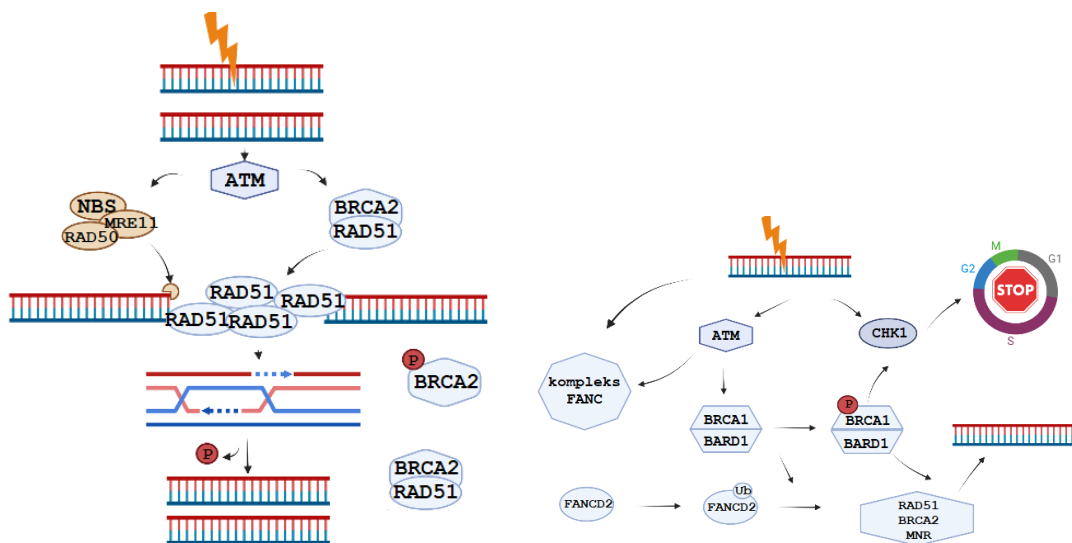
Proces alternatywnego składania mRNA odgrywa również istotną rolę w zespołach predysponujących do zachorowania na nowotwory. Zespoły te powodowane są przez zmiany germinalne lub genach supresorowych, których uszkodzenie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu. Analiza wariantów w tych genach, zwykle ogranicza się do badania sekwencji kodujących wraz z niewielkimi „flankującymi” fragmentami intronów. A zatem badanie takie nie dostarcza informacji na temat potencjalnie patogennych wariantów głęboko intronowych. Co więcej, sama klasyfikacja zidentyfikowanych zmian jest procesem złożonym i niepozbawionym wad, w którym potencjalne znaczenie wariantu dla procesu składania mRNA jest określane przy wykorzystaniu narzędzi *in silico* [17]. Zmiany sklasyfikowane jako warianty o nieznanym efekcie biologicznym (ang. *variants of unknown significance; VUS*) lub potencjalnie łagodne zmiany intronowe (ang. *benign*) mogą wpływać na proces składania mRNA [18].

W diagnostyce zmian związanych z predyspozycją do zachorowania na nowotwory właściwa klasyfikacja jest niezmiernie ważna. Według ostatnich szacunków, nawet około 10% rzadkich patogennych wariantów intronowych w genach *BRCA1* i *BRCA2*, zlokalizowanych poza miejscami łączy intron/ekson, nie jest wykrywana przy stosowaniu obecnych protokołów diagnostycznych [19].

Aby chronić materiał genetyczny przed permanentnymi zmianami powstającymi wskutek działania mutagenów, komórka posiada szereg systemów naprawy. Zalicza się do nich systemy naprawy bezpośredniej (wycinające uszkodzoną zasadę lub fragment uszkodzonego DNA), ratunkowe systemy naprawcze (oparte na działaniu polimeraz DNA) oraz niehomologiczną i homologiczną naprawę rekombinacyjną (NHEJ i HR). Mutacje w genach kodujących czynniki uczestniczące w procesach naprawczych często sprzyjają kancerogenezie [7].

W ostatnim z wymienionych mechanizmów naprawczych kluczową rolę pełnią białka BRCA1, BRCA2 i BARD1.

Pęknięcie obu nici DNA prowadzi do uruchomienia kinaz wrażliwych na uszkodzenia DNA, tj.: ATM, ATR, CHEK2, które powodują fosforylację BRCA1. Białko to może być też aktywowane przez inne czynniki np. odpowiedzialne za naprawę źle sparowanych zasad takie jak MSH2 i MSH6. Po aktywacji (na drodze fosforylacji) BRCA1 reguluje kompleks MRN, który odcina końce DNA sąsiadujące z pęknięciem. BRCA1 tworzące heterodimer z BARD1 razem wspiera przyłączenie monomerów ubikwityny FANCD2 przez białka z kompleksu FANC. Proces ten pomaga przenieść aktywowane białka w miejsce gdzie znajduje się BRCA2. Główną funkcją BRCA2 jest kontrola RAD51 poprzez inhibicję i zapobieganie wiązania do DNA. Uszkodzenie najpierw musi być poddane działaniu kompleksu MRN, który łączy się z końcami DNA poprzez białko MRE11 oraz uczestniczy w ich wczesnej „obróbce enzymatycznej“. Dopiero później fosforylowany BRCA2 uwalnia RAD51, który łączy się z uszkodzonymi niemi DNA i wykorzystuje nienaruszoną homologiczną podwójną helisę jako matrycę do naprawy (Ryc.4) [20].



Rycina 4. Przedstawienie szlaku naprawy pęknięć DNA za pomocą procesu rekombinacji homologicznej i kontroli naprawy z szczególnym uwzględnieniem roli produktów białkowych genów *BRCA1/2* i *BARD1*. ATM aktywowany przez uszkodzenie DNA fosforyluje kompleks MRN oraz aktywuje BRCA2 do uwolnienia RAD51. Ponowne połączenie RAD51 do BRCA2 zakańczą proces. ATM także wpływa na dimer BRCA1-BARD1, który oddziaływując z wieloma cząsteczkami przyczynia się nie tylko do naprawy, ale także do ewentualnego zatrzymania cyklu komórkowego. Zarówno BRCA1, jak i BRCA2 są zaangażowane w regulowanie i wykonywanie naprawy przez rekombinację homologiczną stymulowaną przez białka FANC i oddziałują z MRN [20,21].

Mutacje zarówno somatyczne, jak i germinalne w białkach należących do wyżej opisanego szlaku sygnałowego są związane z wrażliwością na terapię celowaną inhibitorami PARP. Przy niewydolnej jednej ścieżce naprawy komórka zdaje się na działające mechanizmy. Wybiórcze hamowanie tych ścieżek prowadzi do nagromadzenia zmian w genomie i w konsekwencji śmierć komórki.

Jednak poza zmianami w DNA, także alternatywne transkrypty, kodujące izoformy znanych białek zaangażowanych w naprawę DNA, a wykazujące antagonistyczne cechy względem podstawowego produktu genu, mogą pełnić istotną rolę w inicjacji nowotworzenia lub progresji choroby. Przykładami takich izoform są *BARD1 β* i *BARD1 δ* , (promujące rozwój nowotworów) lub *BRCA1 $\Delta E11q$* , *BRCA1 $\Delta E11$* (częściowo kompensujące funkcję BRCA1) związane z wystąpieniem wtórnej oporności na leczenie związkami platyny i inhibitorami PARP [22].

7. HIPOTEZA I CELE BADAŃ

7.1 Hipoteza:

Proces alternatywnego składania mRNA odgrywa kluczową rolę w patobiologii nowotworów, a jego dogłębne poznanie jest niezbędne dla opracowania czułych i dokładnych metod diagnostycznych, jak również wypracowania nowych metod leczenia.

7.2 Cel Główny:

Celem pracy była analiza alternatywnego składania mRNA w podstawowych genach naprawy DNA, takich jak *BARD1*, *BRCA1* i *BRCA2*.

7.3 Cele Szczegółowe:

1. Ocena poziomu ekspresji izoformy *BARD1 β* w wybranych nowotworach wieku dziecięcego.
2. Ocena spektrum i częstości występowania nieprawidłowych transkryptów genów *BRCA1* i *BRCA2* u pacjentek z rakiem jajnika.
3. Próba identyfikacji mechanizmów prowadzących do nadekspresji *BRCA1 Δ E11q*, *BRCA1 Δ E11* oraz *BRCA2 Δ E3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie oryginalne prace pełnotekstowe, opublikowane w międzynarodowych czasopismach indeksowanych na liście filadelfijskiej. Dysertacja zawiera ponadto niepublikowane wyniki badań, będące przedmiotem przygotowywanej obecnie publikacji. Wyniki te dotyczą określenia ewentualnego wpływu nowotworu jajnika na występowanie ogólnoustrojowych zmian ekspresji wybranych izoform genów *BRCA1* i *BRCA2*. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem modelu *in vitro*, w którym zdrowe, jądrzaste komórki krwi poddawano działaniu czynników produkowanych przez komórki nowotworowe. Rozszerzenie dotyczy wyników opublikowanych w Jasiak et al., 2023.

8. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

8.1 Publikacja 1

Jasiak Anna, Krawczyńska Natalia, Iliszko Mariola, Czarnota Katarzyna, Buczkowski Kamil, Stefanowicz Joanna, Adamkiewicz-Drożyńska Elżbieta, Cichosz Grzegorz, Iżycka-Świeszewska Ewa. *Expression of BARD1 β isoform in selected pediatric tumors*. Genes; 2021: vol. 12, nr 2, art ID 168, s. 1-14.

Celem publikacji, była ocena ekspresji *BARD1-FL* i *BARD1 β* w wybranych guzach pediatrycznych. W pracy oceniono nerwiaki zarodkowe, wybrane guzy germinalne oraz pilotażową serię przypadków mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego.

Na podstawie parametrów jakościowych do badania zakwalifikowano:

- 89 przypadków nerwiaka zarodkowego, w tym dla trzech przypadków dostępny był materiał przed i po leczeniu
- 24 nowotwory z komórek germinalnych; 19 przypadków tkanki guza sparowanej z prawidłową tkanką okalającą (obrzeże guza)
- siedem guzów mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego; dla wszystkich przypadków dostępny był także materiał z obrzeża guza.

Poziom izoformy *BARD1 β* oceniano w stosunku do poziomu ekspresji transkryptu podstawowego (*BARD1-FL*). Ponadto, dla przypadków, gdzie dostępna była tkanka nowotworowa wraz z materiałem z obrzeża guza, wykonane zostało porównanie pomiędzy ekspresją *BARD1 β* i *BARD1-FL* w obu tkankach.

Zaobserwowano podwyższoną ekspresję *BARD1 β* w tkance nowotworowej oraz brak zmian ekspresji *BARD1FL* zarówno w materiale nowotworowym, jak i tkance kontrolnej.

Poziom ekspresji *BARD1 β* zależał od typu histopatologicznego neuroblastoma: najwyższy poziom izoformy β zidentyfikowano w ganglioneuroblastoma i ganglioneuroma.

Również w przypadku guzów pęcherzyka żółtkowego (typ GCT) oraz RMS, zaobserwowano podwyższoną ekspresję *BARD1 β* w tkance nowotworowej, w porównaniu z tkanką okalającą. Dodatkowo, oba typy nowotworów charakteryzowały się podwyższoną ekspresją genu *TERT* (kodującego telomerazę).

U dwóch pacjentów z RMS zaobserwowano obniżony poziom *BARD1β* w materiale po chemioterapii, w porównaniu z materiałem pobranym przed rozpoczęciem leczenia.

Podsumowując, niniejsza praca potwierdza potencjalnie onkogenny charakter *BARD1β* w neuroblastoma, przy czym pierwszy raz opisana została zależność pomiędzy poziomem *BARD1β* a typem histologicznym i stopniem dojrzewania wyżej wymienionych guzów.

Ponadto po raz pierwszy sprawdzono poziom ekspresji *BARD1β* w pilotażowej grupie GCT i RMS.

8.2 Publikacja 2

Jasiak Anna, Koczkowska Magdalena, Stukan Maciej, Wydra Dariusz, Biernat Wojciech, Iżycka-Świeszewska Ewa, Buczkowski Kamil, Eccles Michael, Walker Logan, Wasąg Bartosz, Ratajska Magdalena. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 alternative splicing in predisposition to ovarian cancer*. *Exp. Mol. Pathol.*; 2023: vol. 130, art. ID 104856, s. 1-7.

Publikacja Jasiak et al., 2023 jest pracą oryginalną, w której opisano wyniki analizy alternatywnego składania mRNA w materiale wyizolowanym z krwi obwodowej 101 pacjentek z rakiem jajnika.

U wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania, w ramach wcześniejszej diagnostyki, wykluczono występowanie zmian germinalnych w wybranych genach związanych z predyspozycją do wystąpienia choroby: *BRCA1* (OMIM:113705) i *BRCA2* (OMIM:600185), *APC* (OMIM:611731), *ATM* (OMIM: 607585), *BARD1* (OMIM: 601593), *BLM* (OMIM: 604610), *BRIP1* (OMIM: 605882), *CDH1* (OMIM: 192090), *CDKN2A* (OMIM:600160), *CHEK2* (OMIM:604373), *MLH1* (OMIM:120436), *MRE11A* (OMIM:600814), *MSH2* (OMIM:609309), *MSH6* (OMIM:600678), *NBN* (OMIM: 602667), *PALB2* (OMIM:610355), *PMS2* (OMIM:600259), *PTEN* (OMIM:601728), *RAD50* (OMIM:604040), *RAD51* (OMIM:179617), *RAD51B* (OMIM:602948), *RAD51C* (OMIM:602774), *RAD51D* (OMIM:602954), *STK11* (OMIM: 602216), *TP53*(OMIM: 191170).

Głównym celem pracy była ocena częstości występowania nieprawidłowych transkryptów mRNA, powstałych na skutek obecności wariantów głęboko intronowych (fragmenty genu

nieobjęte rutynową analizą) lub nieprawidłowo sklasyfikowanych wariantów sekwencyjnych zlokalizowanych w eksonach genów *BRCA1* i *BRCA2*.

W opisywanej pracy nie zidentyfikowano nowych nieprawidłowych transkryptów, jednak wykazano znaczną nadekspresję *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* u pacjentek z rakiem jajnika, która nie występowała u zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. Co interesujące, nie potwierdzono związku pomiędzy obecnością SNV rs5820483 a podwyższonym poziomem izoform *BRCA1*, wykazujących całkowitą lub częściową utratę eksonu 11. Ponadto, nie zaobserwowano innych zmian genetycznych (zarówno w *BRCA1* i *BRCA2*), które mogłyby promować ekspresję *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*.

Analiza *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* w guzie oraz pochodzącej od tej samej pacjentki tkance okalającej (10 przypadków), nie wykazała różnic w poziomie ekspresji, co może (wraz z obserwacją dotyczącą poziomu ekspresji tych izoform w krwi obwodowej pacjentek z rakiem jajnika) sugerować globalny charakter obserwowanych zmian i ogólnoustrojowe zaburzenie procesu składania mRNA. W wyniku niemożności identyfikacji czynników genetycznych, które skutkowały zaobserwowanymi zmianami, postawiono wstępną hipotezę o udziale czynników niegenetycznych w regulacji splicingu i promowaniu ekspresji *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*.

9. NIEOPUBLIKOWANA CZĘŚĆ BADAŃ

Adaptacyjna homeostaza jako możliwy niegenetyczny regulator splicingu *BRCA1/2* w raku jajnika

Niepublikowana część badań, miała na celu wyjaśnienie podłoża obserwowanej nadekspresji *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* we krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika (publikacja 2; Jasiak et al., 2023).

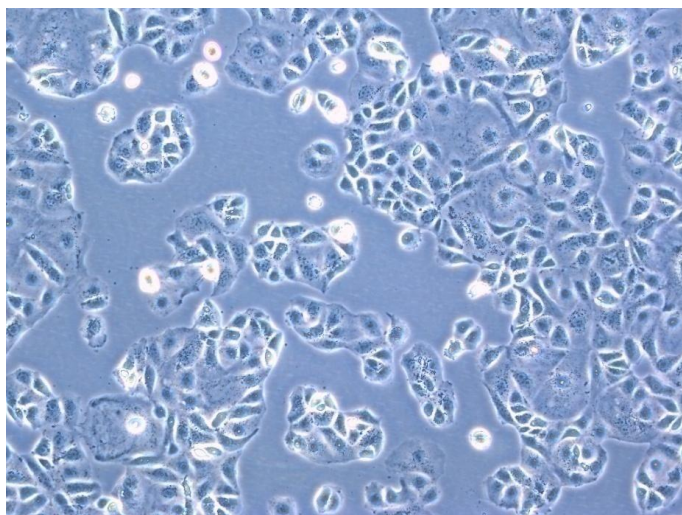
Hipoteza badawcza: Nadekspresja *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* w krwi obwodowej pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika ma podłoże niegenetyczne i jest związana z ogólnoustrojowymi zmianami w odpowiedzi na obecność nowotworu.

W celu weryfikacji powyżej postawionej hipotezy, prawidłowe komórki jądrzaste krwi hodowano *in vitro* w przygotowanym wcześniej medium kondycyjnym (medium, w którym wcześniej była hodowana linia komórkowa ludzkiego raka jajnika OVCAR-4) oraz medium kontrolnym (standardowa pożywka do hodowli komórek). Komórki zbierano w określonych punktach czasowych, a następnie sprawdzano poziom ekspresji badanych izoform oraz wybranych enzymów regulujących zmiany epigenetyczne.

9.1. Materiały i metody

9.1.1 Przygotowanie medium kondycyjnego

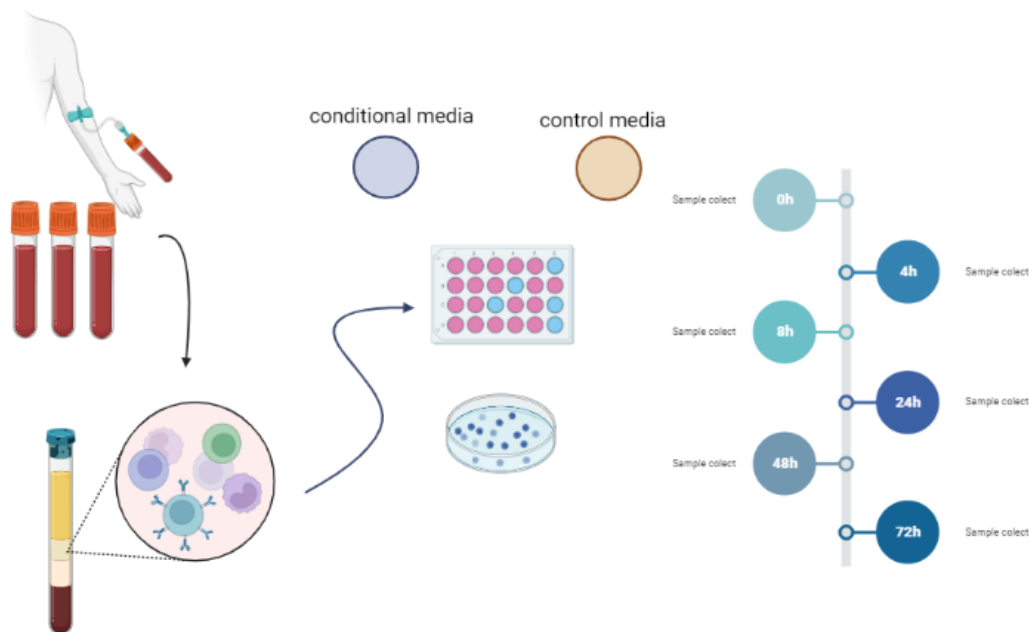
Ludzkie komórki raka jajnika (OVCAR-4) uzyskano z American Type Culture Collection (Manassas, USA). Komórki OVCAR-4 hodowano w pożywce RPMI z 8,67 µg/ml insuliny (GIBCO), 10% bydlęcej surowicy płodowej i 20 mM L-glutaminy w inkubatorze z przepływem CO₂ (37°C i 5% CO₂). Komórki dwukrotnie pasażowano a następnie, po drugim pasażu, gdy komórki OVCAR-4 zajmowały 60-70% powierzchni naczynia hodowlanego, pożywkę wymieniano. Medium kondycyjne uzyskano po 24 godzinach inkubacji.



Rycina 5. Komórki OVCAR-4 przed rozpoczęciem inkubacji w celu pozyskania medium kondycyjnego. Mikroskop LEICA DMI1 10x powiększenie.

9.1.2 Izolacja i hodowla jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Krew pochodziła od zdrowych dawców. Po uzyskaniu świadomej zgody pobrano od każdego dawcy 50 ml krwi do 10 ml probówek Vacutainer z heparyną sodową. Krew rozcieńczono pożywką RPMI w stosunku 1:1, a następnie 25-30 ml nakładano na 15 ml Ficoll'u (roztwór do separacji elementów krwi). Probówki wirowano w temperaturze pokojowej (800 x g/ 20 min.). Po tym czasie jądrzaste komórki krwi obwodowej zbierano ze szczytu gradientu fikolowego, przemywano RPMI, wirowano (300 x g/ 7 min.) i zakładano hodowlę *in vitro*. Komórki hodowano w pożywce kondycyjnej lub standardowej, a następnie zbierano w punktach czasowych: w momencie założenia hodowli i po czterech, ośmiu, dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od momentu założenia hodowli (Ryc.6).



Rycina 6. Schemat przebiegu etapu eksperymentu, w którym wykorzystano jądraste komórki krwi obwodowej.

9.1.3 Izolacja RNA

Materiał do analizy stanowił wyizolowany RNA (Maxwell, Promega). Do syntezy cDNA z otrzymanego RNA użyto 200 nanogramów całkowitego RNA (MultiScribe, ThermoFisher), stosując kombinację starterów losowych (ang. *Random Primers*) oraz starterów specyficznych dla genu *BRCA1* (5'-ACTTTGTAAGCTCATTCTT-3') i *BRCA2* (5'-TTAGATA-TATTTTTTAGT 3') .

9.1.4 Analiza ekspresji czynników metylacyjnych

Aby określić potencjalny wpływ metylacji DNA i RNA na regulację splicingu i zmiany ekspresji, za pomocą RT-qPCR sprawdzono poziom dwóch podstawowych metylotransferaz *DNMT3A* (DNA), *METTL3* (RNA) oraz acetylotransferazy *HDAC1*. Reakcje RT-qPCR wykonano z użyciem sond TaqMan (IDT, Inc.), w trzech powtórzeniach (LightCycler® 480 Real-Time PCR System, Roche). Poziom ekspresji badanych genów był znormalizowany względem dwóch genów referencyjnych (*HPRT1* i *IPO8*). W celu wyznaczenia cyklu progowego (Ct), krzywe amplifikacji analizowano stosując oprogramowanie Roche LC (Roche).

9.1.5 Analiza ekspresji wybranych izoform

Do oceny ekspresji *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* wykorzystano amplikonowe sekwencjonowanie RNA (*ang. targeted RNAseq*). W tym celu, dla każdej izofromy zaprojektowano parę starterów, gdzie jeden ze starterów był zlokalizowany w miejscu łączenia (ekson-ekson) unikalnego dla badanego transkryptu. Ponadto, starter 3' posiadał unikalny identyfikator molekularny (*ang. Unique Molecular Identifiers*, UMI), który minimalizował ryzyko błędów powstałych w czasie reakcji PCR. Gotowe biblioteki zostały zmierzone, zmieszane w identycznych proporcjach i zsekwenconowane (iSeq, Illumina). Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona za pomocą pakietu oprogramowania CLC Genomics Workbench Version 23.0.4 (QIAGEN Aarhus A/S).

9.1.6 Analiza statystyczna

Do sprawdzenia hipotez statystycznych wykorzystano test U Manna-Whitneya, wariancji Kruskala-Wallisa, test sumy rang Wilcoxon lub testu ANOVA dla powtarzalnych pomiarów. Wszystkie założenia zostały przetestowane przed analizą, a $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

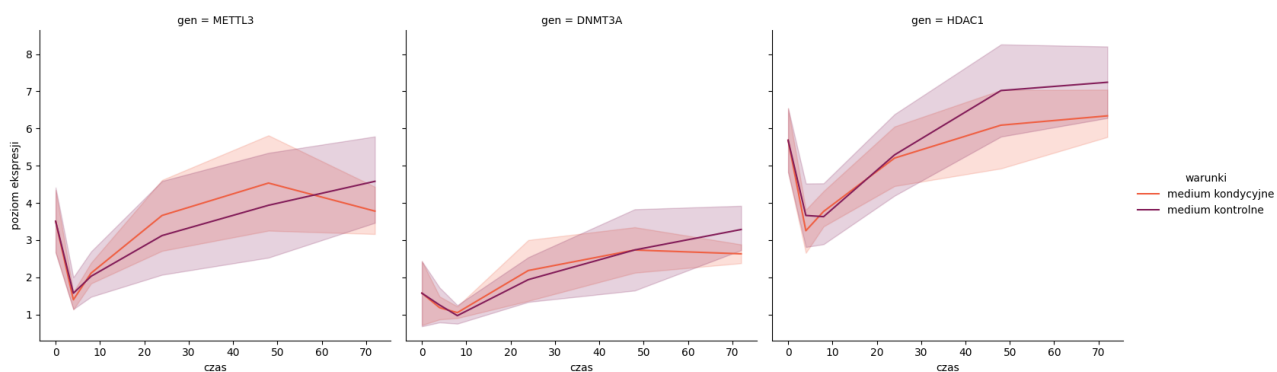
Wyniki badań przedstawiono jako *mediana ± odchylenie kwartyłowe*. Do analizy oraz prezentacji wyników wykorzystano oprogramowanie Statistica (Statsoft Software) oraz język programowania Python.

9.2. Wyniki

9.2.1 Analiza ekspresji czynników metylacyjnych: *DNMT3A*, *METTL3* i *HDAC1*

Analiza RT-qPCR poziomu ekspresji *DNMT3A*, *METTL3* i *HDAC1* w komórkach hodowanych w medium kondycyjnym lub medium kontrolnym, w różnych punktach czasowych (0, 4 godz., 8 godz., 24 godz., 48 godz. i 72 godz.), wykazała zmiany poziomu ekspresji czynników metylacyjnych w czasie (Tab 1.). Dla wszystkich czynników w obydwu warunkach hodowli widoczny był początkowy spadek ekspresji, a następnie powolny wzrost (Ryc.7).

W przypadku *DNMT3A* najniższy poziom był obserwowany w ósmej godzinie hodowli (60,3% wartości początkowej), podczas gdy dla *HDAC1* i *MTTL3* najniższy poziom był odnotowany w czwartej godzinie hodowli, i stanowił 41,6 % ekspresji początkowej dla *MTTL3* i 59,3% dla *HDAC1* (Ryc. 7).



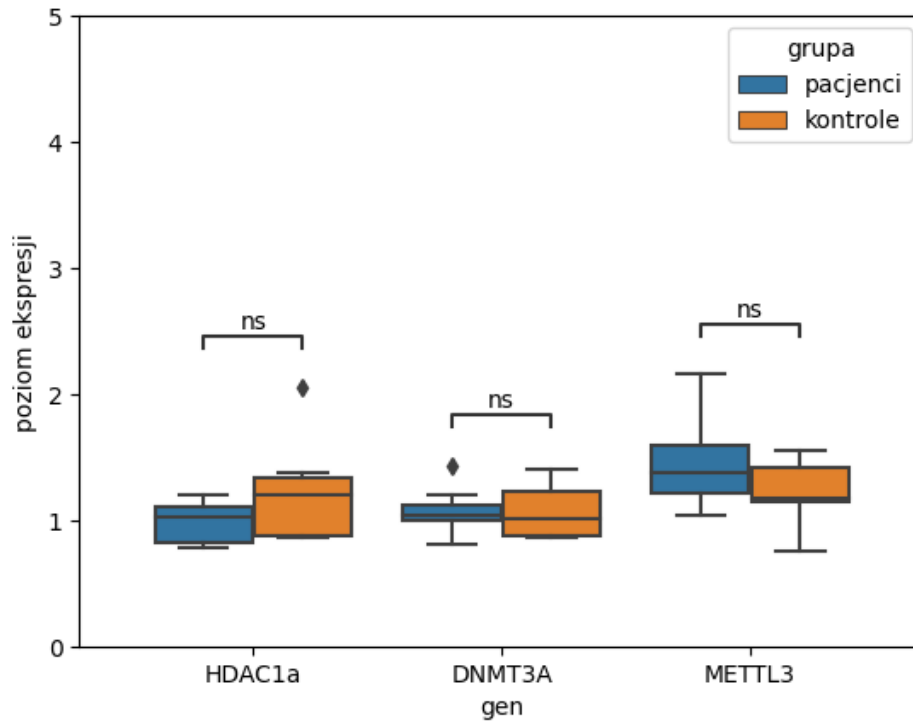
Rycina 7: Ekspresja *METTL3*, *DNMT3A* i *HDAC1* w hodowli jądrzastych komórek krwi obwodowej.

Tabela 1: Wartości p (prawdopodobieństwa testowego) dla poszczególnych genów badanych.

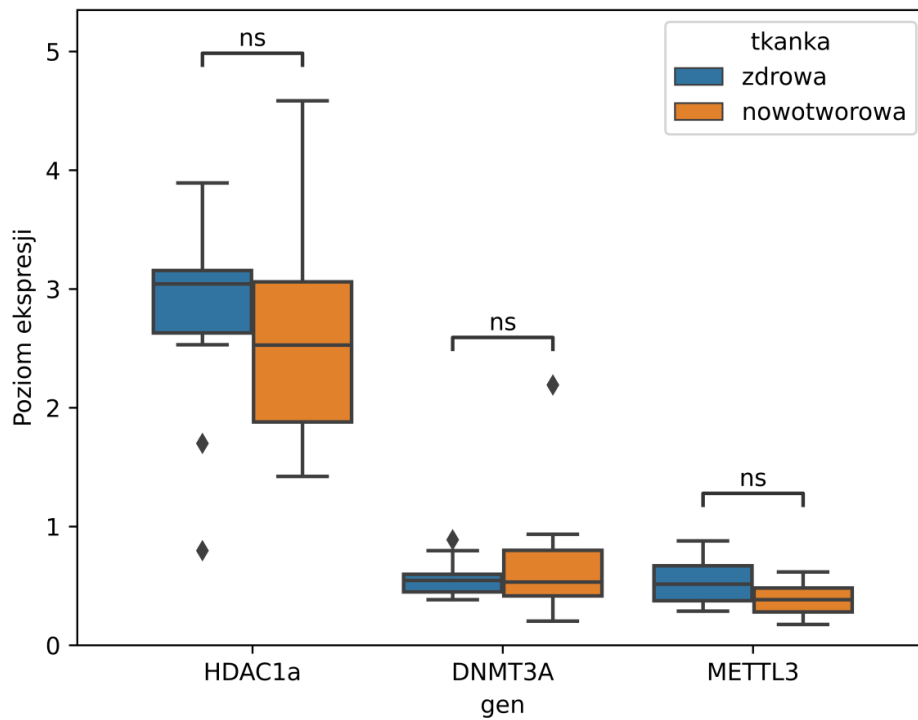
Badany czynnik metylacyjny	p zmiany w czasie	p zmiany w warunkach
DNMT3A	0,08	0,53
METTL3	<0,05	0,67
HDAC1	<0,05	0,145

Nie zaobserwowano natomiast różnic znamiennej statystycznie pomiędzy komórkami hodowanymi w medium kondycyjnym i medium kontrolnym, ale około 48-mej godziny zauważalny jest stopniowy spadek ekspresji *METTL3*, *DNMT3A* i *HDAC1* w komórkach hodowanych w medium kondycyjnym. Powyższy wynik należy traktować jako wstępną obserwację wymagającą dalszego potwierdzenia (Tab. 1).

Brak różnic w poziomie ekspresji *METTL3*, *DNMT3A* i *HDAC1*, zaobserwowano również w materiale wyizolowanym z tkanki guza oraz zdrowej tkanki okalającej (Ryc. 8-9).



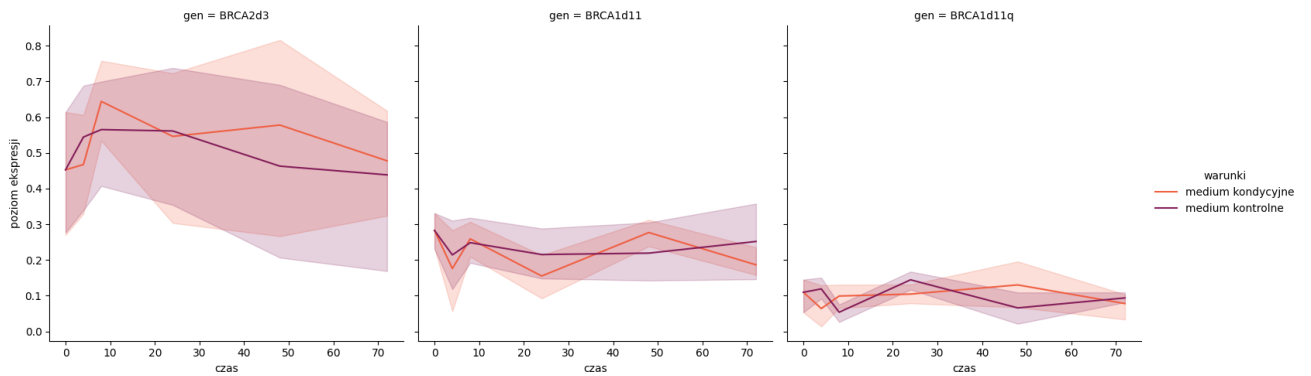
Rycina 8: Poziom ekspresji *DNMT3A*, *METTL3* i *HDAC1* w grupie pacjentek z nowotworem jajnika i zdrowej grupie kontrolnej. Wyniki zaprezentowano w postaci wykresu ramka wąsy (mediana \pm rozstęp kwartyłowy). Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porówna dwóch grup niezależnych w każdym z prezentowanych porównań wyniósł $p > 0,05$, co zaznaczono w postaci oznaczenia 'ns' nad porównywanymi wykresami (ang. *not significant*).



Rycina 9: Poziom ekspresji *DNMT3A*, *METTL3* i *HDAC1* w tkance nowotworowej i zdrowej tkance okalającej. Wyniki zaprezentowano w postaci wykresu ramka wąsy (mediana \pm rozstęp kwartyłowy). Wynik testu U Manna-Whitneya dla porówna dwóch grup niezależnych w każdym z prezentowanych porównań wyniósł $p > 0,05$, co zaznaczono w postaci oznaczenia 'ns' nad porównywanymi wykresami (*ang. not significant*).

9.2.2 Analiza ekspresji wybranych izoform

Ostatnią z przeprowadzonych analiz było określenie poziomu ekspresji izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*. Również w tym przypadku nie zaobserwowano różnic znamienych statystycznie (Ryc. 10).



Rycina 10: Zmiany ekspresji izoform *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* w PBMC w czasie hodowli w medium kondycyjnym i kontrolnym.

W przypadku *BRCA2ΔE3* ekspresja, bez względu na warunki hodowli, rosła od początku trwania hodowli, osiągając maksimum w ósmej godzinie. Dodatkowo ekspresja *BRCA2ΔE3* była najbardziej zmienna we wszystkich warunkach eksperymentu. Izoformy genu *BRCA1* wykazywały znacznie niższą ekspresję i w obu izoformach tego genu widoczne są jej spadki w początkowych godzinach hodowli. Uzyskane wyniki nie były znamienne statystycznie.

9.3. Dyskusja

Nowotwór aby przetrwać, do stworzenia optymalnych warunków dla swojego dalszego wzrostu, wykorzystuje kombinację unikalnych cząsteczek, takich jak cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu, mediatory stanu zapalnego i enzymy przebudowujące macierz [23]. Część z tych substancji oddziałuje lokalnie (w miejscu guza) i nosi nazwę mikrośrodowiska, natomiast inne substancje są zdolne do wprowadzenia zmiany na poziomie całego organizmu [24].

Komórki nowotworowe nie są odizolowane, ale poprzez złożoną sieć komunikacyjną (interakcje z innymi komórkami) wpływają na funkcjonowanie całego organizmu [25]. Homeostaza, to zachowanie stanu równowagi wewnętrznej i wymaga współdziałania wszystkich komórek, a zatem sytuacji, w której wszystkie ulegające ekspresji w komórce

geny oraz ich alternatywne izoformy znajdują się na właściwym poziomie. Ekspresja alternatywnych transkryptów może wynikać z obecności wariantów genomowych (zmieniających sekwencje regulatorowe dla składania mRNA), lub też z niegenetycznych zmian w sygnalizacji komórkowej [26].

Zaprojektowany eksperyment miał na celu sprawdzenie czy środowisko wytworzone przez komórki nowotworowe może skutkować zmianami w poziomie ekspresji wybranych izoform genów *BRCA1/2* (*BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*).

Otrzymane wyniki, nie potwierdziły założonej hipotezy badawczej (nie wykazano znaczących zmian w poziomie ekspresji badanych izoform *BRCA1/2*). Co więcej, analiza poziomu podstawowych metylaz, tj. *DNMT3A* (metylaza DNA), *METTL3* (metylaza RNA) oraz acetylazy *HDAC1*, nie wykazała znaczących zmian w odpowiedzi na obecność czynników produkowanych przez komórki raka jajnika OVCAR-4.

Warto jednak zauważyć, że obserwacje poczynione w modelu eksperymentalnym pokrywają się z wynikami uzyskanymi przy porównaniu tkanki nowotworu ze zdrową tkanką pochodzącą od tej samej pacjentki. Tutaj też nie zaobserwowano różnic zarówno w poziomie ekspresji izoform, jak i czynników epigenetycznych, co wskazuje na prawdziwość hipotezy, że wcześniej zaobserwowane zmiany zachodzą na poziomie całego organizmu, a nie lokalnie w guzie nowotworowym.

Brak różnic w wynikach otrzymanych z komórek hodowanych w medium kondycyjnym i kontrolnym w zastosowanym modelu eksperymentalnym (*in vitro*) może być spowodowany niedoskonałościami samego modelu, a mianowicie – metoda separacji komórek jądrazystych krwi może skutkować utratę znacznej części frakcji zawierającej granulocyty [27].

Co więcej, to właśnie granulocyty (postaci zarówno dojrzałe, jak i niedojrzałe) są obecne we krwi obwodowej pacjentów nowotworowych [28]. Częściowej odpowiedzi na pytanie, na ile utrata frakcji granulocytów wpłynęła na otrzymane wyniki z eksperymentu z *in vitro* (w stosunku do wyników otrzymanych dla pacjentek z rakiem jajnika), mogłaby udzielić analiza rozmazu krwi badanych pacjentek i ocena profilu krwinek białych tj. określenie procentowego składu każdego rodzaju krwinek białych.

Kolejnym ograniczeniem przeprowadzonego eksperymentu jest krótki (72 godz.) czas hodowli, jednak powodem wybrania takich punktów czasowych był fakt, że długotrwale hodowane komórki nie tylko obumierają, ale także zaczynają produkować własne metabolity, co mogłoby skutkować sfalszowaniem uzyskanych wyników [29].

Podsumowując, zastosowany model badawczy posiada ograniczenia i nie odzwierciedla złożoności procesów zachodzących *in vivo* w komórkach pacjentek z rakiem jajnika, a uzyskane wyniki po raz kolejny dowodzą, jak złożony jest organizm ludzki, zachodzące w nim interakcje oraz trudne jest modelowanie tych procesów w warunkach *in vitro*.

10. PODSUMOWANIE

Wyniki badań wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej ukazują złożoność alternatywnego składania mRNA i jego znaczenia w patobiologii nowotworów.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących obserwacji:

1. *BARD1β* ulegał wyższej ekspresji w tkance nowotworowej w porównaniu ze zdrową tkanką, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi i może potwierdzać onkogenny charakter tej izoformy.
2. W neuroblastoma, poziom ekspresji *BARD1β* nie korelował z danymi patoklinicznymi, a zatem *BARD1β* nie jest dobrym markerem progresji i/lub zaawansowania choroby.
3. Poziom *BARD1β* spadał w odpowiedzi na leczenie w dwóch przypadkach RMS, jednakże w uwagi na bardzo małą liczebność próby, należy potwierdzić tę obserwację w większej grupie pacjentów. Z uwagi na rzadkość RMS zgromadzenie reprezentatywnej grupy badanej, wymagałoby badania wielośrodkowego.
4. Brak obecności nieprawidłowych transkryptów *BRCA1* i *BRCA2* w badanej grupie 101 pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika, wskazuje na fakt, że obecnie stosowane protokoły diagnostyczne są wystarczające dla identyfikacji większości wariantów patogennych.
5. Obecność wyższej ekspresji naturalnie występujących izofrom *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3* u pacjentek z rakiem jajnika może wskazywać na znaczenie tych izoform w procesie onkogenezy lub ich wpływu na przebieg choroby.
6. Nie wykazano wpływu czynników genetycznych promujących splicing oraz środowiska nowotworowego na wzrost ekspresji izofrom *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*.
7. Pośrednio wykluczono wpływ wybranych czynników epigenetycznych na ekspresję izofrom *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* i *BRCA2ΔE3*. Doświadczenie mające na celu sprawdzenie wpływu środowiska tworzonego przez nowotwór na ekspresję badanych izoform nie potwierdziło tego założenia.

11. PIŚMIENNICTWO




1. Chen S, Cao Z, Prettner K et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories from 2020 to 2050. *JAMA Oncol.* 2023; 9: 465–72.
2. Rejestr KRN | Krajowy Rejestr Nowotworów. <https://onkologia.org.pl/pl/rejestr-krn> (accessed August 12, 2023).
3. Wark PA, Peto J. *Cancer Epidemiology*, Second Edi. Elsevier, 2016.
4. Wilkes G, Freeman H, Prout M. Cancer and poverty: breaking the cycle. *Semin. Oncol. Nurs.* 1994; 10: 79–88.
5. Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (accessed August 12, 2023).
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2018; 68: 394–424.
7. Bal J. *Genetyka Medyczna i Molekularna*, 3rd edn. Warszawa: PWN, 2017.
8. Nowak-Markwitz E, Spaczynski M. Rak jajnika - nowe spojrzenie na pochodzenie i histogenezę. *Ginekol Pol* 2012; 83: 454–7.
9. Morjaria S, Morjaria S. Driver mutations in oncogenesis. *Int. J. Mol. Immuno Oncol.* 2021; 6: 100–2.
10. McFarland CD, Yaglom JA, Wojtkowiak JW et al. The damaging effect of passenger mutations on cancer progression. *Cancer Res.* 2017; 77: 4763–72.
11. Shomar A, Barak O, Brenner N. Cancer progression as a learning process. *iScience* 2022; 25: 103924.
12. Chen J, Weiss WA. Alternative splicing in cancer: Implications for biology and therapy. *Oncogene*, 2015.
13. Szcześniak M, Szweykowska-Kulińska Z. Regulation of Alternative Splicing. *Postępy Biol. Komórki* 2009; 36: 23–36.
14. De Conti L, Baralle M, Buratti E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2013; 4: 49–60.
15. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 2011; 144: 16.
16. Zhu L-Y, Zhu Y-R, Dai D-J, Wang X, Jin H-C. Epigenetic regulation of alternative splicing. *Am J Cancer Res* 2018; 8: 2346–58.
17. Alamut Visual version 2.11 Interactive Biosoftware, Rouen, France.
18. Gelli E, Colombo M, Pinto AM et al. Usefulness and limitations of comprehensive characterization of mRNA splicing profiles in the definition of the clinical relevance of BRCA1/2 variants of uncertain significance. *Cancers (Basel)*. 2019; 11: 295.
19. James PA, Fortuno C, Li N, Lim BWX, Campbell IG, Spurdle AB. Estimating the proportion of pathogenic variants from breast cancer case–control data: Application to

- calibration of ACMG/AMP variant classification criteria. *Hum. Mutat.* 2022.
20. Schulz WA. Molecular Biology of Human Cancers. *Mol. Biol. Hum. Cancers* 2023: 1–542.
21. Scientific Image and Illustration Software | BioRender. <https://www.biorender.com/> (accessed August 26, 2023).
22. Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, Krais JJ, Nacson J. The BRCA1- Δ 11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin. *Cancer Res.* 2016; 5: 1–8.
23. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* 2020; 30: 905–31.
24. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 2010.
25. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun. Signal.* 2020 181 2020; 18: 1–19.
26. Shin C, Manley JL. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 727–38.
27. Goods BA, Vahey JM, Steinschneider AS, Askenase MH, Sansing L, Christopher Love J. Blood handling and leukocyte isolation methods impact the global transcriptome of immune cells. *BMC Immunol.* 2018; 19: 1–12.
28. CHE Y-Q, SHEN D, ZHANG S-M, QI J. Identification of immature granulocytes in cancer chemotherapy patients by cell counting vs. microscopic examination of blood smears. *Mol. Clin. Oncol.* 2014; 2: 207.
29. Duthoo E, Vral A, Baeyens A. An updated view into the cell cycle kinetics of human T lymphocytes and the impact of irradiation. *Sci. Reports* 2022 121 2022; 12: 1–12.

**12.PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Article

Expression of BARD1 β Isoform in Selected Pediatric Tumors

Anna Jasiak ^{1,2} , Natalia Krawczyńska ^{1,3}, Mariola Iliszko ^{1,2}, Katarzyna Czarnota ⁴, Kamil Buczkowski ^{4,5}, Joanna Stefanowicz ⁶ , Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska ⁶, Grzegorz Cichosz ¹ and Ewa Iżycka-Świeszewska ^{4,5,*} 

- ¹ Department of Biology and Medical Genetics, Medical University of Gdansk, 1 Debinki St., 80-211 Gdansk, Poland; anna.jasiak@gumed.edu.pl (A.J.); milisz@gumed.edu.pl (M.I.); grzcichosz@gmail.com (G.C.)
- ² Laboratory of Clinical Genetics, University Clinical Centre, 17 Smoluchowskiego St., 80-210 Gdansk, Poland
- ³ Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 407S Goodwin Ave, Urbana, IL 61801, USA; natalia.krawczynska@gumed.edu.pl
- ⁴ Department of Pathology and Neuropathology, Medical University of Gdansk, 1 Debinki St., 80-211 Gdansk, Poland; kat.czarnota@gumed.edu.pl (K.C.); kam.buczkowski92@gmail.com (K.B.)
- ⁵ Department of Pathomorphology, Copernicus Hospitals, 1-6 Nowe Ogrody St., 80-803 Gdansk, Poland
- ⁶ Department of Pediatrics, Hematology, Oncology, Medical University of Gdansk, 1 Debinki St., 80-211 Gdansk, Poland; joanna.stefanowicz@gumed.edu.pl (J.S.); elzbieta.adamkiewicz-drozynska@gumed.edu.pl (E.A.-D.)
- * Correspondence: eczis@gumed.edu.pl



Citation: Jasiak, A.; Krawczyńska, N.; Iliszko, M.; Czarnota, K.; Buczkowski, K.; Stefanowicz, J.; Adamkiewicz-Drożyńska, E.; Cichosz, G.; Iżycka-Świeszewska, E. Expression of BARD1 β Isoform in Selected Pediatric Tumors. *Genes* **2021**, *12*, 168. <https://doi.org/10.3390/genes12020168>

Academic Editors: Irmgard Irminger-Finger and Magda Ratajska
Received: 20 December 2020
Accepted: 23 January 2021
Published: 26 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Currently, many new possible biomarkers and mechanisms are being searched and tested to analyse pathobiology of pediatric tumours for the development of new treatments. One such candidate molecular factor is *BARD1* (BRCA1 Associated RING Domain 1)—a tumour-suppressing gene involved in cell cycle control and genome stability, engaged in several types of adult-type tumours. The data on *BARD1* significance in childhood cancer is limited. This study determines the expression level of *BARD1* and its isoform beta (β) in three different histogenetic groups of pediatric cancer—neuroblastic tumours, and for the first time in chosen germ cell tumours (GCT), and rhabdomyosarcoma (RMS), using the qPCR method. We found higher expression of beta isoform in tumour compared to healthy tissue with no such changes concerning *BARD1* full-length. Additionally, differences in expression of *BARD1* β between histological types of neuroblastic tumours were observed, with higher levels in ganglioneuroblastoma and ganglioneuroma. Furthermore, a higher expression of *BARD1* β characterized yolk sac tumours (GCT type) and RMS when comparing with non-neoplastic tissue. These tumours also showed a high expression of the *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase) gene. In two RMS cases we found deep decrease of *BARD1* β in post-chemotherapy samples. This work supports the oncogenicity of the beta isoform in pediatric tumours, as well as demonstrates the differences in its expression depending on the histological type of neoplasm, and the level of maturation in neuroblastic tumours.

Keywords: BARD1; BARD1 β ; BARD1 isoforms; splicing; pediatric tumor; germ cell tumors; yolk sac tumors; rhabdomyosarcoma; neuroblastoma; TERT

1. Introduction

Significant patho-clinical heterogeneity of pediatric tumours, together with their low incidence, results in the limited number of ongoing studies, compared to the adult malignancies. Notably, the pathogenesis of pediatric cancers' differs significantly from adulthood tumours, with a little importance of environmental factors [1]. Cancer is the second cause of death in children, and the reason for morbidity is that most survivors suffer from various long-term side post-treatment effects. Pediatric cancer occurs in the context of development and developmental biology. The genetic predisposition accounts for only 5–10% of pediatric tumours, suggesting other mechanisms, including acquired genetic

alterations [2,3]. Alternative RNA splicing, resulting in expression of alternative isoforms, often playing antagonistic functions to the canonical gene product is one of the primary mechanisms in cancer development [4]. BARD1 (BRCA1 Associated RING Domain 1, 2q34-q35) is a leading partner of BRCA1 and consists of 11 exons spanning 777 amino acid protein. *BARD1* has an N-terminal RING-finger domain, three centrally located ankyrin repeats (ANK), and two C-terminal BRCT (BRCA1 C Terminus) domains (Figure 1a) [5–7]. A heterodimer of BRCA1 and BARD1 has E3 ubiquitin ligase activity participating in DNA repair, modulating chromatin structure, cell cycle regulation, hormone signaling, as well as some developmental processes [7–9]. The function of the BARD1 protein is to form a heterodimer in conjunction with BRCA1 protein. Stable formation of the heterodimer may be critical for BRCA1 exerting cancer inhibition. Full length (FL) *BARD1* is a tumour-suppressor gene playing an essential role in cell cycle control and genome stability. However, *BARD1* encodes at least 11 different isoforms playing antagonistic functions towards FL protein [6,10]. Overexpression of those oncogenic isoforms might result in disrupting the cell cycle and telomeric instability [11]. Mainly, *BARD1* isoforms that lack RING or/and ANK domains were described as oncogenic. Up-regulation of β , δ , ω is associated with unfavorable prognosis in cancers and can antagonize the functions of *BARD1* FL as a tumour suppressor. Several scientific evidence shows that cancer-associated *BARD1* isoforms act as a driving force for carcinogenesis [6]. *BARD1* β (exon structure shows on Figure 1b), which during mitosis, binds, and stabilizes the Aurora A and B kinases and is overexpressed in several adulthood malignancies [7]. The expression of *BARD1* isoforms was widely studied in several adult type malignancies, such as colorectal, lung, and gynaecological cancers, whereas its role in pediatric tumours is yet to be discovered [12–14]. The best-analyzed is neuroblastoma, but only limited data on *BARD1* is available for Wilms' tumour, case studies in Ewing sarcoma, and osteosarcoma or does not exist as in case of GCT or RMS [15–17].

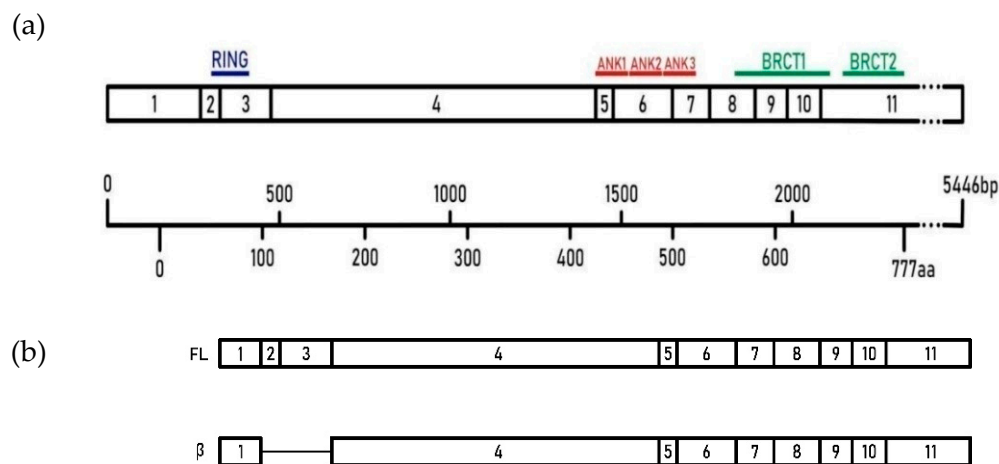


Figure 1. (a). Structure of *BARD1*. Exon structure, length, and domain composition of *BARD1* FL (NCBI Reference Sequence: NM_000465.4, UniProtKB-Q99728). (b). Exon structure of full-length *BARD1* and its beta isoform.

Neuroblastoma is the second most common pediatric solid tumour type growing in the adrenal glands and the abdominal ganglia, mediastinum, and head and neck area [18]. Histologically three categories are discerned: neuroblastoma with undifferentiated, poorly differentiated, and differentiating Schwannian stroma-poor subtypes, ganglioneuroblastoma rich of Schwannian stroma, and ganglioneuroma showing mature phenotype and Schwannian stroma predominance. NB course can be various, but metastatic disease has poor long-term prognosis. The risk group systems aimed for treatment optimization, are based on patients' age, tumour location, histology, stage, and molecular changes such as *N-myc* status, chromosomal and single gene abnormalities (ALK, Aurora K) [19–21].

Several SNPs in *BARD1* are found to be related to invasive NB. A study comparing 397 high-risk cases and 2043 controls revealed six new SNPs at 2q35 within the *BARD1* gene locus significantly associated with NB. They showed that common variation in *BARD1* associates with the risk of the aggressive and most clinically corresponding subtype of human NB. One of these SNPs has been associated with higher expression of the *BARD1* β isoform [5]. Furthermore, Pugh et al. tested tumour tissue DNA and the matching peripheral blood DNA by using the next sequencing, discovering that *BARD1* could undergo germline mutations [22].

Germ cell tumours (GCT) create a heterogeneous group with various directions and stages of differentiation [23]. Histologically they include two categories—seminomatous (exact names depend on location) and non-seminomatous—encompassing yolk sac tumour (YST), embryonal carcinoma, choriocarcinoma, teratomas, and mixed GCT [24–26]. The patho-clinical features, treatment and outcome of GCT are age, histology, and site-dependent. Theories on GCT origin encompass disturbed mitosis-meiosis switch, deregulation of apoptosis and signalling pathways (bFGF, cKIT or SHH), disorganized migration of germ cell precursors and gonadal dysgenesis [27,28]. The molecular pathogenesis of pediatric GCT is not well understood. The genomic profiles in pediatric GCT depend on their location and patient's age (pre vs post-pubertal) [29]. The single gene defects like point mutations are rare and involve mainly *KIT*, *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* [30,31]. Some genes polymorphisms and the biological role of the methylation profiles is also under the investigation in GCTs [32]. To our best knowledge, the role of *BARD1* in GCT has not been investigated so far.

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common aggressive soft tissue pediatric sarcoma with high metastatic potential and local regrowth [33]. Two principal histological RMS subtypes exist: embryonal and alveolar. The crucial prognostic markers include tumour histology, location, stage and age of the patient. Genetic alterations comprise reciprocal translocations and their associated fusions in alveolar RMS subtype (*PAX*, *FOXO*), while chromosomal losses and gains in embryonal RMS. The most frequent alterations in RMS include *TP53*, *NF1*, *NRAS*, *MDM2*, and *CDKN2A* aberrations. [34,35]. We have not come across studies on the *BARD1* gene and its isoforms in RMS in the literature so far.

The present study aimed to assess the expression of *BARD1 FL* and *BARD1* β in different pediatric tumours. The neuroblastic tumours, chosen germ cell tumours, and a pilot series of rhabdomyosarcoma cases were evaluated to look for possible BARD role in their pathogenesis and clinical characteristics.

2. Materials and Methods

Samples (formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material) included in the study were collected at the time of diagnosis, with all the individuals enrolled being children under 18 years. All cases were clinically and pathologically characterized during previously managed projects (N401 176 31/3867 2005 and NCN 2014/15/B/NZ4/04855). Histological review was performed on hematoxylin-eosin stained preparations. The local ethics committee approved the study at the Medical University of Gdansk. Table 1 contains summarized characteristic of a cohort of neuroblastoma patients.

In total, we analyzed 101 neuroblastoma samples from the patients in the age between 1 month and 14 years. The next examined group consisted of 26 cases of GCTs, where for 21 samples, both tumour and adjacent normal tissue were available. The cohort included seven immature teratomas, nine yolk sac tumours, and ten dysgerminomas. The last group was composed of seven rhabdomyosarcoma (RMS) cases, where for all of them, both tumour and adjacent normal tissue were available. Tables 2 and 3 show the patho-clinical characteristic of GCTs and RMS group. For three neuroblastoma and two RMS cases tumour tissue was available before and after chemotherapy treatment.

The study material was RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) using the FormaPure Total (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). RNA quality and concentration were assessed using NanoDrop and Qubit, respectively. MultiScribe (Applied

Biosystem, Foster City, CA, USA) using random primers was applied for cDNA synthesis, using 200 ng of RNA. Before further analysis, the quality of cDNA was evaluated by amplifying ACTB (Fw: 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; Rev: 5'CGTGGATGCCACAGGACT-3'), using GoTaq (Promega, Madison, WI, USA) polymerase followed by gel electrophoresis.

Table 1. Patho-clinical characteristics of tumours–neuroblastoma analyzed cases.

Age (range in months (median))	1–169 (30)
Sex	
boys	48 (54%)
girls	41 (46%)
Stage (INSS)	
1	7 (8%)
2	12 (13%)
3	30 (34%)
4	33 (37%)
4s	7 (8%)
Mitosis Karyorrhexis Index (MKI)	
low	40 (45%)
intermediate	25 (28%)
high	24 (27%)
Histological category	
Neuroblastoma	71 (80%)
undifferentiated	7 (9%)
poorly differentiated	35 (50%)
differentiating	29 (41%)
Ganglioneuroblastoma	12 (13%)
Ganglioneuroma	6 (7%)
Tumor localization	
adrenal	46 (51%)
extra-adrenal	43 (49%)
NMYC status	
amplification	18 (20%)
no amplification	70 (79%)
unknown	1 (1%)
Histological risk group (INPC)	
favorable	51 (57%)
unfavorable	38 (43%)
Clinical risk group	
low	26 (29%)
intermediate	27 (30%)
high	36 (41%)

Table 2. Patho-clinical characteristics of germ cell tumors.

Histological Type	Group Characteristic:		
	Age (Range in Months (Median))	Sex (Boys/Girls)	Tumor Location
Immature Teratoma (7)	Congenital-204 (55)	4 (57%)/3 (43%)	Testicle (3) (43%), Mediastinum (1) (14%), Sacro-caudal area (3) (43%)
Yolk sac tumor (9)	6–138 (51)	8 (89%)/1 (11%)	Testicle (8) (89%), Ovary (1) (11%)
Dysgerminoma (10)	84–204 (156)	10 girls (100%)	Ovary (10) (100%)

A total of 156 samples were qualified for *BARD1* analysis, including 97 neuroblastoma samples and 59 samples from 32 patients with other tumours.

Expression analysis for samples was performed using the *BARD1 FL* assay (ID: Hs00957649_m1), spanning exons 3 and 4, while expression of *BARD1 β* was evaluated using commercial TaqMan probes spanning exon 1 and 4 (Assay ID: Hs04408502_m1).

Additionally, in GCTs and RMS we evaluated expression of TERT, using a specific FAM TaqMan™ Gene Expression Assay (Hs00972650_m1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All the reactions were run in triplicates. The analysis was performed on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). Target amplicons were assessed against a control sequence of two reference genes: *PGK1* (Assay ID: Hs99999906_m1) and *IPO8* (Assay ID: Hs00183533_m1). The amplification curves were analyzed using the Roche LC software (Roche, Basel, Switzerland) to determine the threshold cycle (Ct). *BARD1* positive control (HeLa cell line) and PCR negative controls were amplified in each qPCR (quantitative real-time PCR) reaction.

Table 3. Patho-clinical characteristics of Rhabdomyosarcoma.

Age (Range in Months (Median))	36–156 (104.6)
Sex	
boys	5 (71%)
girls	2 (29%)
Tumor localization	
Thorax, head and neck	2 (29%)
Limbs	3 (42%)
Pelvic	2 (29%)
Histological category	
RMS alveolare	3 (43%)
RMS embryonale	4 (57%)

Neuroblastoma samples without *BARD1* expression ($n = 5$) were further investigated toward potential *BARD1* deletion using FISH (*BARD1* specific probe, Empire Genomics; a protocol according to the manufacturer's guidelines) on the Zeiss microscope AXIO Imager.Z2 in 1000× magnification; image analysis system was MetaSystem (MetaSystems Probes, Heidelberg, Germany).

All inconclusive results were repeated twice. Finally, statistical analysis was performed on 89 neuroblastoma cases and 31 other tumours (GCTs and RMSs), using Statistica software (StatSoft, Kraków, Poland). Paired two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed-rank test and two-tailed R Spearman correlation test were applied. Differences between the groups were evaluated with the Mann–Whitney U test after checking the normality of the distribution with the Shapiro–Wilk test and the equality of variance with the Levene test.

In all statistical tests, a $p < 0.05$ was considered to be significant. All figures were created in Microsoft Excel. All Supplementary Files heat maps were created by using R language and p heatmap package [36].

3. Results

3.1. *BARD1* in Tumor Tissue

In total, 89 neuroblastoma samples (with three pre- and post-chemotherapy cases), 24 GCTs (19 with paired adjacent tissue), and 7 RMS (all with paired adjacent tissue, and two with samples before and after chemotherapy) passed the quality control and were used for the further analysis.

In the results of *BARD1 FL* expression and the beta isoform for the whole material from neoplastic tissue ($n = 120$; FL: 0.0111 ± 0.0123 ; β : 0.004 ± 0.0048) and healthy tissue ($n = 26$; FL: 0.0063 ± 0.0048 ; β : 0.002 ± 0.0025), we found that there were no statistically significant differences in the level of FL expression. There are, however, statistically significant differences ($Z = 2.25$; $p = 0.01$) between these groups in the level of expression of the beta isoform. In healthy tissue, the beta isoform was expressed at a lower level than in neoplastic tissue.

Comparing the expression in groups of different types of childhood tumours, a higher level of *BARD1 FL* in neuroblastoma (FL: 0.0128 ± 0.0135 ; β : 0.0045 ± 0.0054) series is noticeable. When compared neuroblastoma group to GCTs (FL: 0.057 ± 0.0055 ;

β : 0.0029 ± 0.0022), in which case expression of *BARD1 FL* is on the lowest level, difference reaches statistical significance ($Z = 2.53$; $p = 0.039$).

In the case of the beta isoform in neoplastic tissues, statistically, significantly higher expression of the beta isoform was found in a group of ganglioneuroblastoma and ganglioneuroma (FL : 0.0145 ± 0.0136 ; β : 0.0084 ± 0.0086), comparing to the neuroblastoma group and also in comparison to GCTs ($Z = 2.62$; $p = 0.015$).

3.2. Characteristic of *BARD1* Expression in Different Histogenetic Groups of Pediatric Tumors

3.2.1. Neuroblastic Tumors

The majority ($n = 84/89$; 94.4%) of neuroblastoma samples expressed *BARD1 FL*. Interestingly, all five samples that did not express *BARD1 FL* were at stages 3 or 4 and did not either express the *BARD1* β isoform. There was no deletion of the 2q35 region in those samples while checking by FISH. About 73% of the analyzed samples expressed *BARD1* β ($n = 69/89$). However, the group with no *BARD1* β expression is very heterogeneous concerning pathological clinical characteristics. The correlation between *BARD1 FL* and *BARD1* β expression in quantitative analysis in neuroblastoma probes was not found. The results of this analysis are presented in Figure 2. A detailed breakdown analysis was made with access to patho-clinical information: sex, stage, MKI, amplification status, histological subtype, age of diagnosis, localization, histological and clinical risk group. Due to relatively small clinical INSS stage groups, related groups were created: a group I (stage 1 and 2), and group II (stage 3, 4, and 4s). Group II was more numerous, accounting for 79% of cases. In total, lack of *BARD1* β was observed in 27% of samples ($n = 24/89$), 17 in group II (71%, $n = 17/24$) and 7 in group I (29%, $n = 7/24$). Relative expression of *BARD1 FL* and *BARD1* β isoform in INSS grouped data are shown in Figure 3A. Statistically, a significant difference was not observed between NB stage in *BARD1 FL* and *BARD1* β expression analysis. Mitosis-karyorrhexis index (MKI), with the larger number of tumours classified was MKI low ($n = 40/89$; ~45%). Relative expression of *BARD1 FL* and *BARD1* β isoform in MKI subgroups are shown in Figure 3B. In the examined NB group, there was 80% ($n = 71/89$) neuroblastoma type in three histological subtypes: differentiating 32.6%, poorly differentiated 49.3%, and undifferentiated 9.9%. Additionally, 6 (6%) ganglioneuroma cases and 12 (14%) ganglioneuroblastoma were tested. There was a statistically significant difference in beta isoform expression between neuroblastoma (β : 0.0036 ± 0.004) and other histological types (β : 0.0084 ± 0.0086) ($Z = 2.57$; $p = 0.01$). Higher expression was found in the group consisting of ganglioneuroma and ganglioneuroblastoma compared to different histological subtypes of neuroblastoma. In post-chemotherapy NB tissues, *BARD1 FL* and *BARD1* β isoform expression levels varied, but no pattern was observed. The complex analysis of other factors in different constellations did not reveal any specific patterns.

3.2.2. Germ Cell Tumors

All analyzed GCTs expressed *BARD1 FL*, with statistically significant differences between the *BARD1 FL* expression in the tumour (0.005 ± 0.004) and adjacent tissue (0.008 ± 0.0042) in the yolk sac tumour (YCT) ($Z = 2.19$; $p = 0.024$). Higher expression was noticed in adjacent tissue. While expression of *BARD1* β was detected in 23 tumor tissues ($n = 23/24$; 96%) and 16 adjacent tissues ($n = 16/19$; 84%). *TERT* was not expressed in 52% ($n = 10/19$) of the adjacent tissues and only in 8% ($n = 2/24$) of tumour tissues (teratomas). Interestingly, when analyzing *BARD1* β compared to *FL* expression depending on GCTs subtype, we found a higher correlation in YCT tissue (0.617 ± 0.151) than adjacent healthy tissues (0.243 ± 0.0729) ($Z = 2.07$; $p = 0.02$). However, such differences were not found in teratoma and dysgerminoma (expression level for immature teratoma samples are presented in Supplementary File S2). Data for representative samples are presented in Figure 4 and for all yolk sac-in Supplementary File S3. Correlation data and analysis for yolk sac tumours are presented in Figure 5. Moreover, YCT showed a higher expression of *BARD1* β and *TERT*. However, only in tumor samples statistically significant positive correlation was found between *BARD1* β and *TERT* expression ($r = 0.8824$; $p = 0.003$).

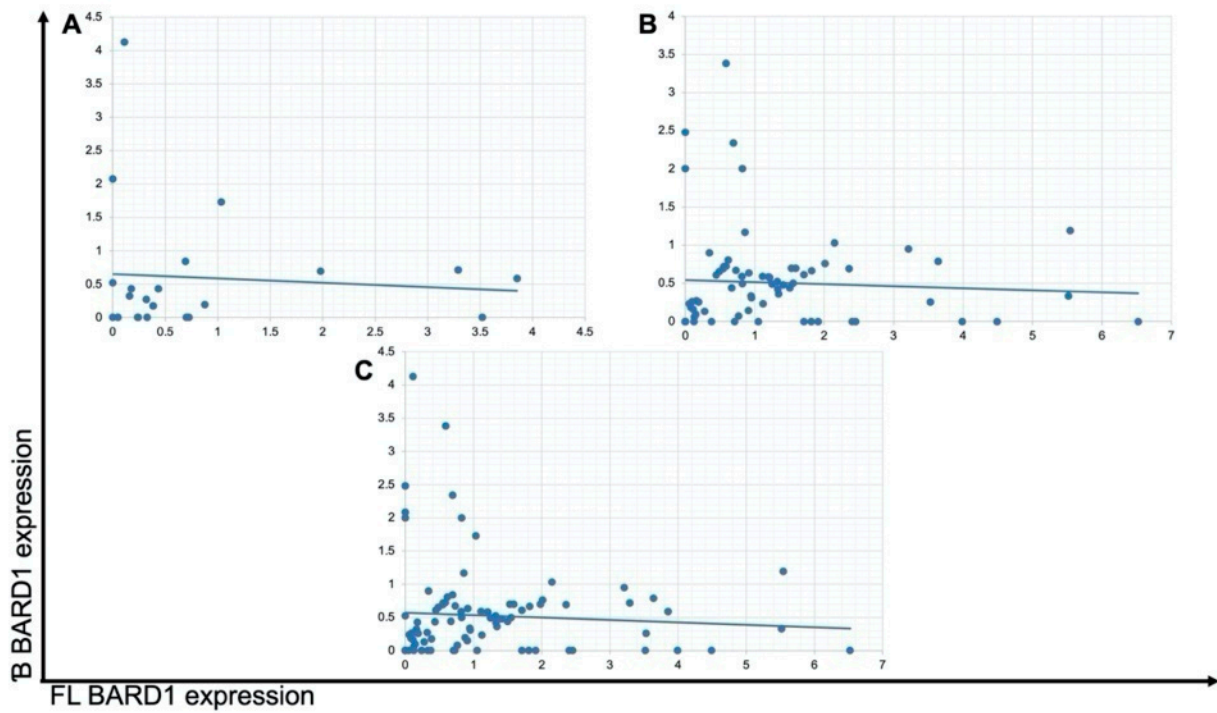


Figure 2. *BARD1* FL and *BARD1* β isoforms mRNA expression correlation. Neuroblastoma patients were divided into two groups based on the stage of the disease: (A) Connected stages 1 & 2 ($n = 19$), (B) Stage 3, 4 & 5 ($n = 70$) and (C) Patients' data without stage division ($n = 89$).

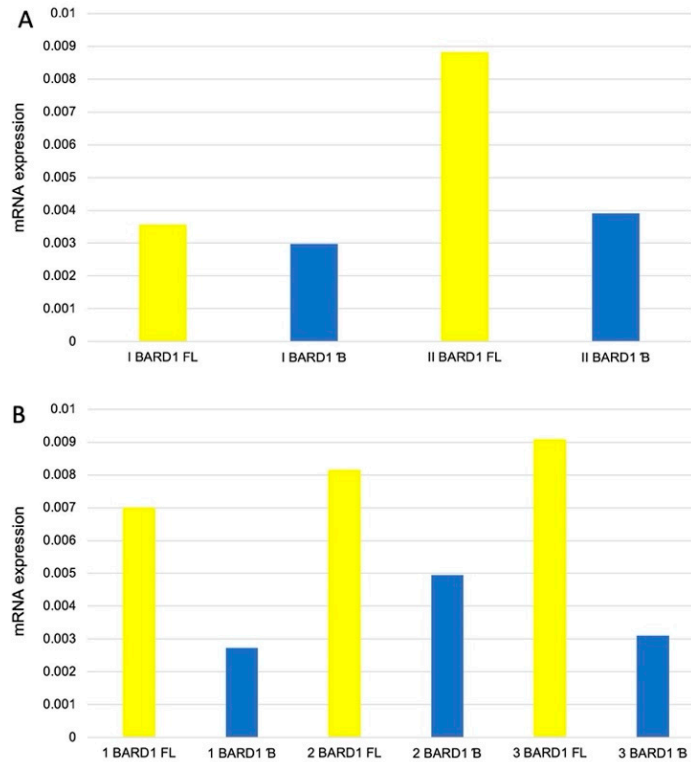


Figure 3. RNA *BARD1* isoforms relative expression of neuroblastoma cases. Neuroblastoma patients were divided into two groups based on the INSS stage (A) of the disease and Mitosis-karyorrhexis index (MKI) (B). Expression *BARD1* FL and β results were presented for each group. The results are depicted as median.

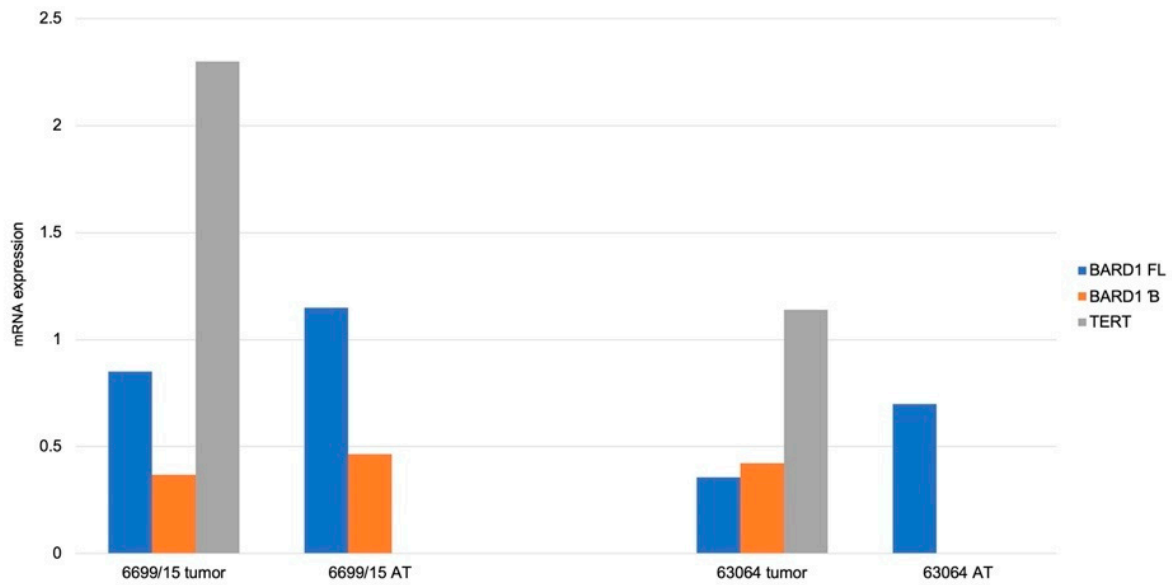


Figure 4. *TERT* and *BARD1* isoforms expression level of yolk sac representative samples. Histogram of mRNA expression for *TERT* and *BARD1* isoforms of representative samples. Results are depicted as median. AT—adjacent tissue.

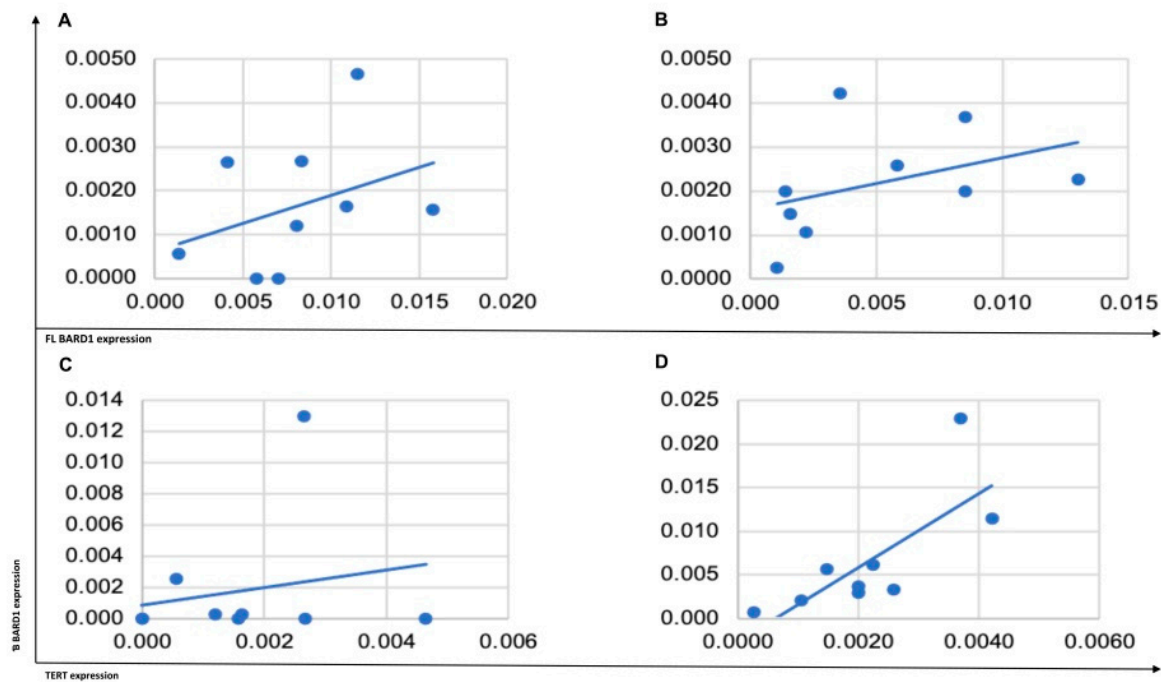


Figure 5. *TERT*, *BARD1 FL*, and β isoform mRNA expression correlation in yolk sac samples. (A) Correlation between *BARD1 FL* and β isoform in unchanged histological tissue. (B) Correlation between *BARD1 FL* and β isoform in tumor tissue. (C) Correlation between *BARD1* β isoform and *TERT* in unchanged histological tissue. (D) Correlation between *BARD1* β isoform and *TERT* in tumor tissue.

3.2.3. Rhabdomyosarcoma

All analyzed pilot group RMS tumour tissue expressed *BARD1 FL* and *BARD1* β ($n = 7/7$; 100%), while in adjacent tissue, one did not express *BARD1 FL*, and two did not express *BARD1* β ($n = 5/7$; 71%). *TERT* was detected in 6 tumor (86%) and 4 (57%) adjacent tissue. We found higher expression of *BARD1* β isoform in neoplastic tissue (0.0032 ± 0.00095) than adjacent healthy tissues (0.00067 ± 0.000223) ($Z = 2.36$; $p = 0.018$). A statistically significant difference was also performed between tumour (0.00576 ± 0.00164)

and healthy tissue (0.00079 ± 0.000385) in *TERT* expression ($Z = 2.19$; $p = 0.028$). Statistically significant results for RMS probes are presented in Figure 6.

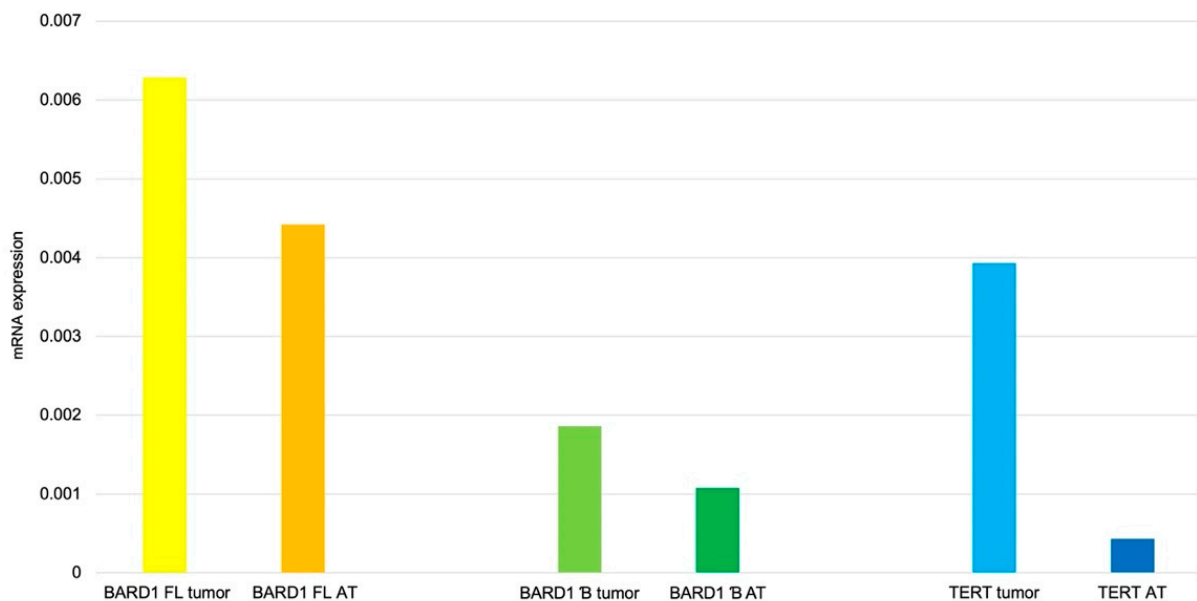


Figure 6. *TERT* and *BARD1* isoforms expression levels of RMS samples. Histogram of mRNA expression for *TERT*, *BARD1 FL*, and *BARD1 β* isoform of RMS samples. Results are depicted as median. AT-adjacent tissue.

In the RMS group, there were 2 cases with samples collected after chemotherapy treatment. The expression of *BARD1 FL*, *BARD1 β*, and *TERT* decreased after treatment in these samples.

4. Discussion

In cancer cells, the mRNA assembly process, like other processes, undergoes specific changes that may result in disease progression. In a healthy cell, naturally occurring isoforms are in the right proportions, allowing harmonic and carefully controlled operation of all processes. The alternative assembly processes may also result in new, unfavourable, isoforms [37].

BARD1 is an example of a gene whose changes can lead to cancerogenesis. The full-length *BARD1* is classified as a tumour suppressor and the main partner of *BRCA1* (forming a heterodimer via the RING domain). beta is one of the most studied isoforms; lack of RING domain makes its incapable of interacting with *BRCA1*. *BARD1* alternative isoforms have been described, among others, in the colorectal, lung, gynaecological cancers, and neuroblastoma [38,39]. Here, we describe the analysis of *BARD1 β* in three types of childhood cancers: neuroblastoma, germ cell tumours, and rhabdomyosarcoma. The previous data suggest that a high level of *BARD1 β* is associated with an adverse prognosis in different cancer types [5,12,40,41].

In our cohort, we confirmed a higher expression of *BARD1 β* in the tumour but not in adjacent tissue; however, we did not observe any difference in *BARD1 FL* between cancer and non-neoplastic control. This observation contradicts Cimmino et al., who reported a reduction of *BARD1 FL* in cancer cells [6]. A possible explanation of this phenomena is a limitation of the TaqMan probe that we used in this study. The Hs00957649_m1 binds on exon 3 and 4 junction, therefore will also detect other isoforms that have these exons.

BARD1 is also an important factor involved in all stages of spermatogenesis and embryogenesis. Its isoforms were found in the human cytotrophoblast [42], and depletion of *BARD1* leads to lethality in embryonic life or development or cerebral malformations [7]. Besides, the *BRCA1-BARD1* complex plays an essential role in meiosis, homologous recombination, and also takes part in brain and neural crest line morphogenesis [43]. Therefore,

we hypothesise that *BARD1* alternative isoforms might play a role in most childhood tumours and as such, these cancers might share similar *BARD1* profiles.

The genome-wide association study (GWAS) associated several *BARD1* variants with susceptibility to high-risk neuroblastoma [44], mainly rs6435862 T>G was related with overexpression of *BARD1* β [5]. Additional studies, genotyping neuroblastoma patients, were conducted in other populations [45–47]; however, not all of them confirmed previous findings [45]. Our cohort of patients has not been genotyped prior to *BARD1* expression analysis; therefore, our study was performed in an unselected cohort, limiting possible bias of earlier molecular results.

Earlier studies demonstrated that *BARD1* β blocks the apoptosis of neuroblastoma cells and stabilizes the Aurora kinase A and B, which are essential players in NB biology [5,7]. However, our results do not demonstrate a correlation between expression of *BARD1* β and patho-clinical features in neuroblastoma and lack of *BARD1* β (but not *BARD1* FL) did not correlate with more favourable phenotype. This observation was unexpected, especially given the direct impact of *BARD1* β in cancerogenesis.

Furthermore, we observed a statistically significant difference in *BARD1* β expression in different histological subtypes; with *BARD1* β being highly expressed in more mature ganglioneuroma/ganglioneuroblastoma ($p = 0.01$). These NB family members are more mature and characterized with a higher degree of neural cells differentiation, and significant content of Schwannian stroma [48], and have a better prognosis than neuroblastoma. A possible explanation is a link between neural crest differentiation, maturing morphology in NB tumours and a role of *BARD1* isoforms in these processes; however, this phenomenon needs further evaluation.

In our cohort, we identified five tumours without *BARD1* (both β and FL) expression, to assess *BARD1* gene status we performed FISH analysis. However, the result did not confirm a potential deletion of *BARD1*. Therefore, the absence of *BARD1* expression may indicate other inactivating mechanisms, like promotor methylation or genetic mutation [7,49]. Interestingly, the absence of *BARD1* due to promotor methylation was observed only once, in a series of colon cancers [13].

Importantly, here we report for the first time the expression of *BARD1* in other childhood cancers, including germ cell tumours (GCTs) and rhabdomyosarcoma (RMS). However, due to a low number of RMS cases, this analysis should be considered as a pilot study, which findings require further evaluation. In GCTs and RMS cohorts, we additionally assessed the *TERT* expression level, as it was previously reported that *BARD1* plays a role in telomere stability [11,40,50]. Therefore, we wanted to explore a possible correlation between *BARD1* expression and *TERT* level.

Teratomas and yolk sac tumours histologically represent the tumors with a wide pattern of differentiation—the first contains mixture of elements of three germ layers, since the second recapitulates specific endodermal derived structures [51,52]. Dysgerminoma is built of the undifferentiated primordial-like germ cells with lymphocytic stroma [53]. Therefore, our hypothesis assumed that *BARD1* taking part in early stage of development plays an essential role in the pathology of these specific neoplasms. GCTs develop mainly in gonads, where migrating primordial germ cells reach their destination during embryogenesis, and most of GCTs occur in males, which rises another link with *BARD1* being naturally elevated in testis [54].

In our study group, *BARD1* β was higher expressed in a tumour that non-neoplastic adjacent tissue, with the difference being statistically significant in yolk sack tumours. Besides, there was a positive correlation in expression of *BARD1* β and *TERT*, which support the known role of *BARD1* β in cancerogenesis. Interestingly, this correlation was not present in other analysed GCTs subtypes (immature teratoma and dysgerminoma). Nevertheless, it might be partially explained by variegated histological characteristics of these neoplasms.

Lastly, we examined the expression of *BARD1* (FL and β) in a small group of aggressive soft tissue sarcoma, RMS. The *TP53*, *NF1*, *NRAS*, *CDK4*, *MYCN*, *GLI*, *MDM2*, *FGFR1*, and

FGFR4 are listed among the most frequently altered in these tumours, interestingly they play a role in the cell cycle regulation and DNA repair, and interact with *BARD1* [55,56]. Also, chromosome 2 alterations (where *BARD1* is located, 2q34-35) are commonly found in RMS [57]. Our research showed that *BARD1*β isoform and the *TERT* gene were significantly more strongly expressed in the neoplastic tissue compared to the healthy control tissue.

Additionally, in two RMSs we had access to the material pre- and post-chemotherapy, where expression of *BARD1* β was dramatically reduced post-treatment (accompanied with *TERT* being below detection limits). In our opinion, although this observation has a preliminary character (due to the limited size of the studied group), it designates the role of *BARD1* β not only in RMS pathobiology but also carcinogenesis itself.

It is worth emphasizing that the study conducted requires further confirmation using other methods, larger groups of respondents of different ethnic origins and comparison with available databases. Validation of the obtained results by using methods with other strengths and weaknesses would avoid limitations resulting from the homogeneity of the analytical workshop applied.

To summarise, here we examine the role of *BARD1* β in a series of neuroblastoma tumours, but also in a relatively poorly recognized GCTs and RMS. Our results indicated a highly probable function of *BARD1* and its isoforms in other childhood tumours' pathobiology; however, it needs to be verified in a larger cohort of patients.

5. Conclusions

In our work, we confirmed the higher expression of *BARD1* β isoform in neoplastic tissues of pediatric tumors. Here, we show that there may be a specific *BARD1* isoforms pattern in germ cell tumors, rhabdomyosarcoma, and neuroblastoma subtypes. The differences in *BARD1* expression depend on the histological type of neoplasm, and the level of maturation in neuroblastic tumours. Our findings confirm the association with oncogenesis of *BARD1* β not only in the neuroblastoma, but for the first time also in selected GCT and RMS.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/2/168/s1>. File S1: Representative photos of analyzed neoplasms, File S2, *BARD1*FL and beta isoforms expression level in neuroblastoma sample, File S3, *BARD1*isoforms and *TERT* expression level of all teratomas samples.

Author Contributions: Conceptualization, E.I.-Ś., A.J.; Methodology, A.J.; Validation, A.J. and G.C.; Formal Analysis, A.J., and N.K.; Investigation, A.J., M.I., and G.C.; Resources, E.I.-Ś., K.C., and K.B.; Data Curation, A.J., and N.K.; Writing—Original Draft Preparation, A.J., N.K., K.C.; Writing—Review & Editing, E.I.-Ś., J.S., and E.A.-D.; Visualization, N.K., and A.J.; Supervision, E.I.-Ś.; Funding Acquisition, E.I.-Ś. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by a grant from the National Science Center Poland, project NCN 2014/15/B/NZ4/04855(GCT part), KBN N401 176 31/3867and grant Medical University of Gdansk ST 02/0562/07 (RMS, NB part), (leader- E.Iżycka-Świeszewska).

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the local ethics committee at the Medical University of Gdansk (no NKBBN/667/2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Raw data, detailed protocols, and analyzed data during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Downing, J.R.; Wilson, R.K.; Zhang, J.; Mardis, E.R.; Pui, C.-H.; Ding, L.; Ley, T.J.; Evans, W.E. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 619–622. [[CrossRef](#)]
2. Gröbner, S.N.; Worst, B.C.; Weischenfeldt, J.; Buchhalter, I.; Kleinheinz, K.; Rudneva, V.A.; Johann, P.D.; Balasubramanian, G.P.; Segura-Wang, M.; Brabetz, S.; et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **2018**, *555*, 321–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Thakur, S.; Zhang, H.B.; Peng, Y.; Le, H.; Carroll, B.; Ward, T.; Yao, J.; Farid, L.M.; Couch, F.J.; Wilson, R.B.; et al. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 444–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sveen, A.; Kilpinen, S.; Ruusulehto, A.; Lothe, R.A.; Skotheim, R.I. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* **2016**, *35*, 2413–2427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bosse, K.R.; Diskin, S.J.; Cole, K.A.; Wood, A.C.; Schnepf, W.; Norris, G.; Nguyen, L.B.; Jagannathan, J.; Winter, C.; Diamond, M.; et al. Common Variation at BARD1 Results in the Expression of an Oncogenic Isoform that Influences Neuroblastoma Susceptibility and Oncogenicity. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2068–2078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cimmino, F.; Formicola, D.; Capasso, M. Dualistic Role of BARD1 in Cancer. *Genes* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Irminger-Finger, I.; Ratajska, M.; Pilyugin, M. New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *72*, 1–17. [[CrossRef](#)]
8. Thakar, A.; Parvin, J.D.; Zlatanova, J. BRCA1/BARD1 E3 Ubiquitin Ligase Can Modify Histones H2A and H2B in the Nucleosome Particle. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2010**, *27*, 399–405. [[CrossRef](#)]
9. Ryser, S.; Dizin, E.; Jefford, C.E.; Delaval, B.; Gagos, S.; Christodoulidou, A.; Krause, K.H.; Birnbaum, D.; Irminger-Finger, I. Distinct roles of BARD1 isoforms in mitosis: Full-length BARD1 mediates Aurora B degradation, cancer-associated BARD1 β scaffolds Aurora B and BRCA2. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1125–1134. [[CrossRef](#)]
10. Watters, A.K.; Seltzer, E.S.; Mackenzie, D.J.; Young, M.; Muratori, J.; Hussein, R.; Sodoma, A.M.; To, J.; Singh, M. The Effects of Genetic and Epigenetic Alterations of Non-Gynecological Cancers. *Genes* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
11. Irminger-Finger, I.; Pilyugin, M.; Ratajska, M. The BARD1 BRCT domains are essential for maintenance of telomere integrity. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *74*. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, Y.Q.; Bianco, A.; Malkinson, A.M.; Leoni, V.P.; Frau, G.; De Rosa, N.; André, P.A.; Versace, R.; Boulvain, M.; Laurent, G.J.; et al. BARD1: An independent predictor of survival in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 83–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, Y.Q.; Pilyugin, M.; Kuester, D.; Leoni, V.P.; Li, L.; Casula, G.; Zorcolo, L.; Schneider-Stock, R.; Atzori, L.; Irminger-Finger, I. Expression of oncogenic BARD1 isoforms affects colon cancer progression and correlates with clinical outcome. *Br. J. Cancer* **2012**, *107*, 675–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ratajska, M.; Matusiak, M.; Kuzniacka, A.; Wasag, B.; Brozek, I.; Biernat, W.; Koczkowska, M.; Debniak, J.; Sniadecki, M.; Kozłowski, P.; et al. Cancer predisposing BARD1 mutations affect exon skipping and are associated with overexpression of specific BARD1 isoforms. *Oncol. Rep.* **2015**, *34*, 2609–2617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fu, W.; Zhu, J.; Xiong, S.W.; Jia, W.; Zhao, Z.; Zhu, S.B.; Hu, J.H.; Wang, F.H.; Xia, H.; He, J.; et al. BARD1 Gene Polymorphisms Confer Nephroblastoma Susceptibility. *EBioMedicine* **2017**, *16*, 101–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Venier, R.E.; Maurer, L.M.; Kessler, E.M.; Ranganathan, S.; McGough, R.L.; Weiss, K.R.; Malek, M.M.; Meade, J.; Tersak, J.M.; Bailey, K.M. A germline BARD1 mutation in a patient with Ewing Sarcoma: Implications for familial testing and counseling. *Pediatr. Blood Cancer* **2019**, *66*. [[CrossRef](#)]
17. Savani, M.; Skubitz, K.M. Long-term Outcome after Doxorubicin and Ifosfamide Overdose in a Patient With Osteosarcoma and BARD1 Mutation. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2019**, *41*, e94–e96. [[CrossRef](#)]
18. Deyell, R.J.; Attiyeh, E.F. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet.* **2011**, *204*, 113–121. [[CrossRef](#)]
19. Altungoz, O.; Aygun, N.; Tumer, S.; Ozer, E.; Olgun, N.; Sakizli, M. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2007**, *172*, 113–119. [[CrossRef](#)]
20. Storlazzi, C.T.; Lonoce, A.; Guastadisegni, M.C.; Trombetta, D.; D’Addabbo, P.; Daniele, G.; L’Abbate, A.; Macchia, G.; Surace, C.; Kok, K.; et al. Gene amplification as doubleminutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1198–1206. [[CrossRef](#)]
21. Valent, A.; Guillaud-Bataille, M.; Farra, C.; Lozach, F.; Spengler, B.; Terrier-Lacombe, M.-J.; Valteau-Couanet, D.; Danglot, G.; Lenoir, G.M.; Brison, O.; et al. Alternative pathways of MYCN gene copy number increase in primary neuroblastoma tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2004**, *153*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pugh, T.J.; Morozova, O.; Attiyeh, E.F.; Asgharzadeh, S.; Wei, J.S.; Auclair, D.; Carter, S.L.; Cibulskis, K.; Hanna, M.; Kiezun, A.; et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Richardson, B.E.; Lehmann, R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 37–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Echevarría, M.E.; Fangusaro, J.; Goldman, S. Pediatric Central Nervous System Germ Cell Tumors: A Review. *Oncologist* **2008**, *13*, 690–699. [[CrossRef](#)]
25. Horton, Z.; Schlatter, M.; Schultz, S. Pediatric germ cell tumors. *Surg. Oncol.* **2007**, *16*, 205–213. [[CrossRef](#)]

26. Khaleghnejad-Tabari, A.; Mirshemirani, A.; Rouzrokh, M.; Mohajerzadeh, L.; Khaleghnejad-Tabari, N.; Hasas-Yeganeh, S. Pediatric germ cell tumors; A 10-year experience. *Iran. J. Pediatr.* **2014**, *24*, 441–444. [PubMed]
27. Cohen, M.; Kicheva, A.; Ribeiro, A.; Blassberg, R.; Page, K.M.; Barnes, C.P.; Briscoe, J. Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nat. Commun.* **2015**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
28. Packer, R.J.; Cohen, B.H.; Coney, K. Intracranial Germ Cell Tumors. *Oncologist* **2000**, *5*, 312–320. [CrossRef] [PubMed]
29. Kuleszo, D.; Lipska-Ziętkiewicz, B.; Koczkowska, M.; Zakrzewski, K.; Grajkowska, W.; Roszkowski, M.; Dembowska-Bagińska, B.; Czarnota, K.; Adamkiewicz-Drożyńska, E.; Łzycka-Świeszewska, E. Hedgehog signalling network gene status analysis in paediatric intracranial germ cell tumours. *Folia Neuropathol.* **2019**, *57*, 227–238. [CrossRef]
30. Perlman, E.J.; Hu, J.; Ho, D.; Cushing, B.; Lauer, S.; Castleberry, R.P. Genetic Analysis of Childhood Endodermal Sinus Tumors by Comparative Genomic Hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2000**, *22*, 100–105. [CrossRef]
31. Sakuma, Y.; Sakurai, S.; Oguni, S.; Satoh, M.; Hironaka, M.; Saito, K. C-Kit Gene Mutations in Intracranial Germinomas. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 716–720. [CrossRef] [PubMed]
32. Fukushima, S.; Yamashita, S.; Kobayashi, H.; Takami, H.; Fukuoka, K.; Nakamura, T.; Yamasaki, K.; Matsushita, Y.; Nakamura, H.; Totoki, Y.; et al. Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors indicate a primordial germ cell origin for germinomas. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 445–462. [CrossRef] [PubMed]
33. Skapek, S.X.; Ferrari, A.; Gupta, A.A.; Lupo, P.J.; Butler, E.; Shipley, J.; Barr, F.G.; Hawkins, D.S. Rhabdomyosarcoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*. [CrossRef]
34. Parhman, D.M.; Barr, F.G. Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Adv. Anatom. Pathol.* **2013**, *20*, 387–397. [CrossRef]
35. Chen, C.; Dorado Garcia, H.; Scheer, M.; Henssen, A.G. Current and Future Treatment Strategies for Rhabdomyosarcoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*. [CrossRef]
36. Raivo Kolde 1.0.12. Pheatmap: Pretty Heatmaps. R Package Version. Available online: <https://cran.r-project.org/package=pheatmap> (accessed on 21 January 2021).
37. Chen, J.; Weiss, W.A. Alternative splicing in cancer: Implications for biology and therapy. *Oncogene* **2015**, *34*, 1–14. [CrossRef]
38. Hu, C.; Hart, S.N.; Gnanaolivu, R.; Huang, H.; Lee, K.Y.; Na, J.; Gao, C.; Lilyquist, J.; Yadav, S.; Boddicker, N.J.; et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2021**. [CrossRef]
39. Koczkowska, M.; Krawczynska, N.; Stukan, M.; Kuzniacka, A.; Brozek, I.; Sniadecki, M.; Debniak, J.; Wydra, D.; Biernat, W.; Kozłowski, P.; et al. Spectrum and Prevalence of Pathogenic Variants in Ovarian Cancer Susceptibility Genes in a Group of 333 Patients. *Cancers* **2018**, *10*, 442. [CrossRef]
40. Pilyugin, M.; André, P.A.; Ratajska, M.; Kuzniacka, A.; Limon, J.; Tournier, B.B.; Colas, J.; Laurent, G.; Irminger-Finger, I. Antagonizing functions of BARD1 and its alternatively spliced variant BARD1 δ in telomere stability. *Oncotarget* **2017**, *8*, 9339–9353. [CrossRef]
41. Sporn, J.C.; Hothorn, T.; Jung, B. BARD1 expression predicts outcome in colon cancer. *Clin Cancer Res.* **2011**, *17*, 5451–5462. [CrossRef]
42. Li, L.; Cohen, M.; Wu, J.Y.; Sow, M.H.; Nikolic, B.; Bischof, P.; Irminger-Finger, I. Identification of BARD1 splice-isoforms involved in human trophoblast invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1659–1672. [CrossRef] [PubMed]
43. Feki, A.; Jefford, C.-E.; Durand, P.; Harb, J.; Lucas, H.; Krause, K.-H.; Irminger-Finger, I. BARD1 Expression During Spermatogenesis Is Associated with Apoptosis and Hormonally Regulated1. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 1614–1624. [CrossRef] [PubMed]
44. Capasso, M.; Devoto, M.; Hou, C.; Asgharzadeh, S.; Joseph, T.; Attiyeh, E.F.; Mosse, Y.P.; Kim, C.; Diskin, S.J.; Kristina, A.; et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 718–723. [CrossRef] [PubMed]
45. Shi, J.; Yu, Y.; Jin, Y.; Lu, J.; Zhang, J.; Wang, H.; Han, W.; Chu, P.; Tai, J.; Chen, F.; et al. Functional polymorphisms in BARD1 association with neuroblastoma in a regional han Chinese population. *J. Cancer* **2019**, *10*, 2153–2160. [CrossRef] [PubMed]
46. Zhang, R.; Zou, Y.; Zhu, J.; Zeng, X.; Yang, T.; Wang, F.; He, J.; Xia, H. The association between GWAS-identified BARD1 gene SNPs and neuroblastoma susceptibility in a Southern Chinese population. *Int. J. Med. Sci.* **2016**, *13*, 133–138. [CrossRef] [PubMed]
47. Latorre, V.; Diskin, S.J.; Diamond, M.; Zhang, H.; Hakonarson, H.; Maris, J.M.; Devoto, M. Replication of neuroblastoma SNP association at the BARD1 locus in African-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2012**, *21*, 658–663. [CrossRef] [PubMed]
48. Tomolonis, J.A.; Agarwal, S.; Shohet, J.M. Neuroblastoma pathogenesis: Deregulation of embryonic neural crest development. *Cell Tissue Res.* **2018**, *372*, 245–262. [CrossRef] [PubMed]
49. Pilyugin, M.; Irminger-Finger, I. Long non-coding RNA and microRNAs might act in regulating the expression of BARD1 mRNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *54*, 356–367. [CrossRef]
50. Pilyugin, M.; Andre, P.-A.; Ratajska, M.; Irminger-Finger, I. An isoform of BARD1, associated with many types of cancer, is a driver of oncogenesis by inducing telomere aberrations in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2296. [CrossRef]
51. DeVita, V.T.; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S.A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 10th ed.; Wolters Kluwer Health Adis (ESP): London, UK, 2015; ISBN1 978-146989455-3. ISBN2 978-145119294-0.
52. Schneider, D.T.; Calaminus, G.; Koch, S.; Teske, C.; Schmidt, P.; Haas, R.J.; Harms, D.; Göbel, U. Epidemiologic Analysis of 1,442 Children and Adolescents Registered in the German Germ Cell Tumor Protocols. *Pediatr. Blood Cancer* **2004**, *42*, 169–175. [CrossRef]
53. Irminger-Finger, I.; Soriano, J.V.; Vaudan, G.; Montesano, R.; Sappino, A.P. In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1329–1339. [CrossRef] [PubMed]

54. Wang, H.W.; Wu, Y.H.; Hsieh, J.Y.; Liang, M.L.; Chao, M.E.; Liu, D.J.; Hsu, M.T.; Wong, T.T. Pediatric primary central nervous system germ cell tumors of different prognosis groups show characteristic miRNome traits and chromosome copy number variations. *BMC Genom.* **2010**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sun, X.; Guo, W.; Shen, J.K.; Mankin, H.J.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Rhabdomyosarcoma: Advances in molecular and cellular biology. *Adv. Mol. Cell. Biol. Sarcoma.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Dziuba, I.; Kurzawa, P.; Dopierała, M.; Larque, A.B.; Januszkiewicz-Lewandowska, D. Rhabdomyosarcoma in children—Current pathologic and molecular classification. *Polish J. Pathol.* **2018**, *69*, 20–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Weber-Hall, S.; Anderson, J.; McManus, A.; Abe, S.; Nojima, T.; Pinkerton, R.; Pritchard-Jones, K.; Shipley, J. Gains, Losses, and Amplification of Genomic Material in Rhabdomyosarcoma Analyzed by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3220–3224.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* alternative splicing in predisposition to ovarian cancer

Anna Jasiak^{a,*}, Magdalena Koczkowska^{b,c}, Maciej Stukan^{d,e}, Dariusz Wydra^f,
Wojciech Biernat^g, Ewa Izyczka-Swieszewska^h, Kamil Buczkowski^h, Michael R. Eccles^{i,1},
Logan Walker^{j,1}, Bartosz Wasag^{a,k}, Magdalena Ratajska^{a,i,1,**}

^a Department of Biology and Medical Genetics, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^b 3P Medicine Laboratory, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^c Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^d Department of Gynecologic Oncology, Gdynia Oncology Center, Pomeranian Hospitals, Gdynia, Poland

^e Department Oncological Propedeutics, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^f Department of Gynaecology, Gynaecological Oncology and Gynaecological Endocrinology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^g Department of Pathology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

^h Department of Pathology & Neuropathology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

ⁱ Department of Pathology, Dunedin School of Medicine, University of Otago, Dunedin, New Zealand

^j Department of Pathology and Biomedical Science, University of Otago, Christchurch, New Zealand

^k Laboratory of Clinical Genetics, University Clinical Centre, Gdansk, Poland

¹ Maurice Wilkins Centre for Molecular Biodiscovery, Auckland, New Zealand

ARTICLE INFO

Keywords:

Epithelial ovarian cancer

Alternative splicing

Isoform

*BRCA1**BRCA2*

ABSTRACT

Background: The mRNA splicing is regulated on multiple levels, resulting in the proper distribution of genes' transcripts in each cell and maintaining cell homeostasis. At the same time, the expression of alternative transcripts can change in response to underlying genetic variants, often missed during routine diagnostics.

Aim: The main aim of this study was to define the frequency of aberrant splicing in *BRCA1* and *BRCA2* genes in blood RNA extracted from ovarian cancer patients who were previously found negative for the presence of pathogenic alterations in the 25 most commonly analysed ovarian cancer genes, including *BRCA1* and *BRCA2*.

Material and methods: Frequency and spectrum of splicing alterations in *BRCA1* and *BRCA2* genes were analysed in blood RNA from 101 ovarian cancer patients and healthy controls (80 healthy women) using PCR followed by gel electrophoresis and Sanger sequencing. The expression of splicing events was examined using RT-qPCR.

Results: We did not identify any novel, potentially pathogenic splicing alterations. Nevertheless, we detected six naturally occurring transcripts, named *BRCA1ΔE9-10*, *BRCA1ΔE11*, *BRCA1ΔE11q*, and *BRCA2ΔE3*, *BRCA2ΔE12* and *BRCA2ΔE17-18* of which three (*BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3*) were significantly higher expressed in the ovarian cancer cohort than in healthy controls ($p \leq 0.0001$).

Conclusions: This observation indicates that the upregulation of selected naturally occurring transcripts can be stimulated by non-genetic mechanisms and be a potential systemic response to disease progression and/or treatment. However, this hypothesis requires further examination.

1. Introduction

Cancer is a leading cause of death and a substantial barrier to increasing life expectancy worldwide (Bray et al., 2018; Bray et al., 2021), with ovarian cancer (OC) being the 5th most common

malignancy in women and the leading cause of gynaecological cancer-related deaths. OC is a heterogeneous disease (Berek et al., 2021; Liso et al., 2019); however, up to 17% of all cases are due to germline pathogenic variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes (Weiderpass and Tyczynski, 2015).

* Correspondence to: A. Jasiak, Department of Biology and Medical Genetics, Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211 Gdansk, Poland.

** Correspondence to: M. Ratajska, Department of Pathology, Dunedin School of Medicine, University of Otago, 56 Hanover Street, Dunedin 9016; New Zealand.

E-mail addresses: anna.jasiak@gumed.edu.pl (A. Jasiak), magda.ratajska@otago.ac.nz (M. Ratajska).

<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2023.104856>

Received 8 August 2022; Received in revised form 25 January 2023; Accepted 9 February 2023

Available online 3 March 2023

0014-4800/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A pathogenic variant (PV) in the *BRCA1* (OMIM 113705) or *BRCA2* (OMIM 612555) gene increases the risk of developing ovarian cancer by 80 years to 44% and 17%, respectively (Kuchenbaecker et al., 2017).

Screening for germline pathogenic variants (PVs) and somatic mutations in the *BRCA1/2* has been used in diagnosis and treatment of OC for many years now, with *BRCA1/2*-mutated OCs showing better response to platinum-based chemotherapy and targeted therapy with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors (Walsh, 2015; Tan and Kaye, 2015).

Nevertheless, *BRCA1/2* genetic screening is usually limited to the coding sequence and short “flanking” introns fragments, limiting the detection of potentially pathogenic intronic variants, which promote aberrant splicing or upregulation of naturally occurring alternatively transcripts, both having potentially harmful effects on the cell (Pagani and Baralle, 2009; ElSharawy et al., 2006). Recently, James et al. estimated that ~10% of rare pathogenic intronic variants in *BRCA1* and *BRCA2*, which are located outside the acceptor and donor splice sites, are undetected when utilising current diagnostic protocols (James et al., 2022).

To date, numerous naturally occurring alternative splicing variations, missing specific exons, have been described in *BRCA1* and *BRCA2*, each of those undergoing expression changes in response to underlying genetic variants (de Jong et al., 2017; Fackenthal et al., 2016). Notably, some of these alternative transcripts (e.g. *BRCA1ΔE11q* and *BRCA1ΔE9-10*) encode for proteins that appear to retain partial function and are therefore involved in cellular activities (Fackenthal et al., 2016; Caputo et al., 2018; Colombo et al., 2014; de la Hoya et al., 2016; Meulemans et al., 2020). For instance, the predominantly expressed *BRCA1ΔE11q* isoform arises from the use of an alternative exon 11 splice donor site and lacks a distal part of exon 11 (r.788_4096del) and is implicated in the PARPi and cisplatin resistance (Wang et al., 2016). Interestingly, depletion of *BRCA1ΔE11q* restores the treatment sensitivity (Wang et al., 2016). Recent reports have shown that SNP rs5820483 can alter the expression of *BRCA1* isoforms with a complete or fragmentary absence of exon 11 (Ruiz de Garibay et al., 2021).

The *BRCA1ΔE11* results from the exclusion of the entire exon 11 (r.671_4096del) and lacks multiple protein-binding sites, including those recognised by the RAD51 and RAD50 complex and the NLS (nuclear localisation signal) structures (Clark et al., 2012). Mouse studies have indicated its role in proliferation and cell death (Liu and Lu, 2020). *Brc1EΔ11/EΔ11* mice embryos were shown to be lethal; however, these embryos died later during embryonic development compared to *Brc1*-null embryos, supporting partial functionality of *BRCA1ΔE11* (Liu and Lu, 2020). *BRCA2ΔE3* produces another in-frame natural transcript lacking exon 3 coding sequence that is essential in maintaining interactions with PALB2 and for proper localisation of *BRCA2* to DNA damage sites (Xia et al., 2006). In addition, *BRCA2ΔE3* does not have two potentially important sequences, called the primary activating region (PAR: aa 23–60) and an auxiliary activating region (AAR: aa 60–105). PAR has been suggested to play a role in protein-protein interaction (EMSY, SMAD3), while AAR can be possibly related to regulation of the *BRCA2* transcriptional function through phosphorylation (de Jong et al., 2017; Fackenthal et al., 2016; Milner et al., 2000).

High expression of *BRCA2ΔE3* was previously correlated with the presence of two pathogenic variants, deletion of exon 3 (c.68_316del249, p.Asp23_Leu105del) and c.316 + 3delA. Both alterations resulting in expression of stable delta3-transcript (*BRCA2ΔE3* corresponded to 61% and 52% of the total PCRs, respectively) (Muller et al., 2011). Other variants in intron 2 of *BRCA2* were also correlated with low to high increase of *BRCA2ΔE3* (14% to 52%) transcripts, with the large discrepancy of *BRCA2ΔE3* expression within samples carrying the same variant (Muller et al., 2011). Importantly, low to moderate levels of *BRCA2ΔE3* seems to be well tolerated by the cell as long as the full-length transcript is expressed at a relatively normal level (Muller et al., 2011; Colombo et al., 2018; Thomassen et al., 2022; Tubeuf et al., 2020).

Naturally occurring alternative mRNA isoforms are present at the low levels (~10%), which allows for harmonious, carefully controlled operation of all cellular processes (Liu and Lu, 2020; Milner et al., 2000). However, the expression dynamics of both canonical and alternative splicing can be disrupted by specific genetic alterations (Liu and Lu, 2020; Muller et al., 2011). Identification of such splicing disruptions in genes of interest may therefore indicate the presence of previously undetected variants impacting splice regulatory elements.

Here, we analysed germline RNA from 101 ovarian cancer patients, previously found negative for PVs in 25 OC-associated genes (including *BRCA1* and *BRCA2*) utilising custom TruSeq Amplicon assay, for the presence of novel alternative transcripts of *BRCA1* and *BRCA2* genes that may indicate splicing altering variants that conventional screening protocols had overlooked.

In addition, we assessed the expression of selected (*BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3*) naturally occurring alternative transcripts, followed by screening for underlying genetic variants in patients DNA that might promote their expression.

2. Materials and methods

2.1. Analysed cohorts

This study analysed a cohort of 101 OC patients who tested negative for germline PVs in *BRCA1* and *BRCA2* and 23 other cancer-related genes as part of the MAESTRO study (2011/02/A/NZ2/00017; TruSeq Custom Amplicon assay (Illumina Inc., San Diego, CA, USA): *BRCA1* (MIM:113705) and *BRCA2* (MIM:600185), *APC* (MIM:611731), *ATM* (MIM: 607585), *BARD1* (MIM: 601593), *BLM* (MIM: 604610), *BRIP1* (MIM: 605882), *CDH1* (MIM: 192090), *CDKN2A* (MIM:600160), *CHEK2* (MIM:604373), *MLH1* (MIM:120436), *MRE11A* (MIM:600814), *MSH2* (MIM:609309), *MSH6* (MIM:600678), *NBN* (MIM: 602667), *PALB2* (MIM:610355), *PMS2* (MIM:600259), *PTEN* (MIM:601728), *RAD50* (MIM:604040), *RAD51* (MIM:179617), *RAD51B* (MIM:602948), *RAD51C* (MIM:602774), *RAD51D* (MIM:602954), *STK11* (MIM: 602216), *TP53* (MIM: 191170) (Koczkowska et al., 2018)) and 80 healthy women (control group). The median age in the group of patients was 62 years (range: 27–87 years) and 50 years (range: 34–68) of control group. Characteristics of the patient cohort, including the histopathological diagnosis, age of onset and familial history of breast and/or ovarian cancer, is presented in Fig. 1 and in Supplementary materials (Table S1a-b). The criterion for including a sample in the study was the diagnosis of ovarian cancer and the negative result of genetic screening. In addition, we also included 10 new FFPE samples from ovarian cancer patients and matched paired healthy adjacent tissue.

2.2. RNA extraction and RT-PCR

Material for the study was total RNA extracted from 3 mL of peripheral blood collected directly to Tempus™ Blood RNA Tubes containing 6 mL of RNA Stabilizing Reagent (ThermoFisher). Quantification of extracted RNA was carried out using NanoDrop. cDNA was synthesised from 200 ng of total RNA (MultiScribe kit, ThermoFisher), using a combination of random and gene-specific primers (GSP; 5'-ACTTTGTAAGCTCATTCTT-3' for *BRCA1* and 5'-TTAGATA-TATTTTITAGT-3' for *BRCA2*). The amplifiability of tested cDNA was evaluated using *ACTB* primers (Frw: 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTTC-3'; Rev.: 5'-CGTGGATGCCACAGGACT-3'); only samples giving a positive result for *ACTB* amplification were examined further. *BRCA1* and *BRCA2* transcripts were examined, performing 12 and nine different RT-PCRs, respectively (sequences of all primers have been listed in Supplementary materials (Table S2). PCR products were analysed by agarose electrophoresis, next bands were cut from the gel and sequence (ABI PRISM 3130, Life Technologies, Inc.) to confirm the sequence of the product. An example result is provided in supplementary materials (Fig. S1).



Fig. 1. Occurrence of individual isoforms analysed in a cohort of OC patients and healthy controls. The distribution of expressed transcripts and patients’ characteristics is presented on the top panel of Fig. 1, while the bottom panel summaries the occurrence of analysed isoforms in healthy controls. n/a –data not available; SOC- serous ovarian cancer; EOC – endometrioid ovarian cancer; MOC – mucinous ovarian cancer; COC - clear cell ovarian cancer; GCT – ovarian adult granulosa cell tumour; OCS – ovarian carcinosarcoma; DIF - low differentiated subtype and MIX – mixed subtype. Presence of alternative transcript is marked with dark-blue, lack of expression of alternative transcript is indicated with light-blue squares; “X” – no expression of corresponding *BRCA1/2* fragment was detected. (For interpretation of colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

2.3. Quantification of naturally occurring alternative transcripts

To quantify the expression of three naturally occurring isoforms (*BRCA1EA11q*; *BRCA1EA11*, and *BRCA2EA3*), we carried out real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with isoform-specific primers (Supplementary materials; Table S3). RT-qPCR was then performed on a LightCycler 480 instrument (Roche) using KAPA SybrFast kit (Merck Life Science) and 5 nM of the appropriate primer pairs.

Each sample was assayed in triplicate with amplification over 35 cycles, and samples were analysed using LightCycler® 480 Software (Roche Diagnostics). To calculate the $\Delta\Delta C_t$ values, the raw C_t values were normalised using *IPO8* and *HPRT1* as reference genes.

In addition the expression of *BRCA1EA11q*; *BRCA1EA11* was also normalised by full-length *BRCA1* (*FL BRCA1*); primers sequence is provided in supplementary materials; Table S3). The *FL BRCA1* normalisation was possible for 61 samples (due to insufficient genetic material). The results used for calculations and presented in the graphs are the ratio C_t target and reference corrected by the efficiency value obtained from the calibration curves.

Finally, to address the expression level of analysed isoforms (*BRCA1EA11q*; *BRCA1EA11*, and *BRCA2EA3*) in primary ovarian cancer and surrounding healthy tissue (e.g. fallopian tube), we extracted RNA from 10 new FFPE ovarian tumours, and pair-matched normal adjacent tissue, and performed RT-qPCR (supplementary materials; Fig. S2).

2.4. Screening for underlying genetic variants promoting expression of *BRCA1EA11q*, *BRCA1EA11* and *BRCA2EA3*

Genomic DNA was available from blood samples of 60 (out of 101 analysed) patients enrolled on this study.

The genotype of the *BRCA1* single nucleotide polymorphism (SNP), rs5820483, was assessed using bi-directional Sanger sequencing.

To search for possible underlying genetic variants promoting expression of *BRCA2EA3*, the sequence of two flanking introns (intron 2 and 3) was analysed using in silico algorithm (Human Splicing Finder Sequence Analysis tool, Genomnis SAS version 1.5), identifying intron regions with the highest concentration of splicing regulatory elements. Results of HSF analysis are presented in the Supplementary materials (Fig. S3). Based on HSF prediction, we sequenced ~250 bp upstream and downstream of exon 3. Primers used for screening corresponding fragments of *BRCA1* and *BRCA2* are listed in the Supplementary materials (Table S4).

2.5. *BRCA1* and *BRCA2* nomenclature

In the present manuscript, to avoid potential confusion associated with introducing new isoform names in *BRCA1* gene (NM_007294.3), we used legacy exon numbering with exons after exon three being increased +1 compared to the HGVS/Ensemble nomenclature. Similarly, for *BRCA2* the NM_000059.3 was used as reference sequence. The nomenclature of alternative splicing transcripts is based on the previous publications (Fackenthal et al., 2016; Colombo et al., 2014).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica software (TIBCO Software Inc., version 13.3). Analysis of categorical data was done using the Ch2 test or Fisher test, depending on the size of the tested cohorts, while quantitative data was assessed with the Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis analysis of variance or Wilcoxon Rank Sum Test. All the assumptions were tested prior to the analysis; a *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results

The aim of this study was to screen the blood RNA-derived cDNA of 101 OC samples (previously found to be negative for germline-DNA PVs in BC/OC-susceptibility genes) to identify *BRCA1/2* aberrant alternative transcripts that result from undetected spliceogenic variants (e.g., deep-intronic).

The analysis by PCR followed by agarose electrophoresis and bi-directional Sanger sequencing did not identify any novel, alternative splicing events, however we identified four naturally expressed alternative *BRCA1* transcripts, named *BRCA1AE9–10*, *BRCA1AE11*, *BRCA1AE11q* and *BRCA1AE10–11*, and five alternative splicing events from the *BRCA2* gene: *BRCA2AE3*, *BRCA2AE3–4*, *BRCA2AE6q–7*, *BRCA2AE12* and *BRCA2AE17–18*. The distribution of individual isoforms is summarised in Fig. 1 and Table 1.

All identified transcripts were also detectable in the control group. There were no significant differences when comparing the age of onset, histological subtype and tumour grade and presence of detected transcripts. However, three of identified transcripts (*BRCA1AE9–10*, *BRCA1AE11* and *BRCA1AE11q*) were observed with a higher prevalence in the patients’ cohort, while *BRCA2AE17–18* and *BRCA2AE12* were more common among healthy controls (both *P* < 0.05).

Table 1
Distribution of identified alternative transcripts in cases and controls.

Isoform	mRNA prediction	Effect ¹	Frequency of sample expressing analysed transcript		p-value ²
			Study group [101 OC patients]	Control group [80 healthy women]	
<i>BRCA1ΔE9–10</i>	r.548_670del	ORF	100%	87.5% (n = 70)	p = 0.003
<i>BRCA1ΔE10–11</i>	r.594_4096del	PTC; NMD	4% (n = 4)	10% (n = 8)	p = 0.1
<i>BRCA1ΔE11</i>	r.671_4096del	ORF	79% (n = 79)	~64% (n = 51)	p = 0.04
<i>BRCA1ΔE11q</i>	r.788_4096del	ORF	99% (n = 99)	70% (n = 56)	p < 0.001
<i>BRCA2ΔE3</i>	r.68_316del	ORF	100%	100%	N/A ³
<i>BRCA2ΔE3–4</i>	r.68_c.425del	PTC; NMD	44% (n = 44)	~31% (n = 25)	p = 0.22
<i>BRCA2ΔE6q-7</i>	r.478-631del	PTC; NMD	99% (n = 99)	100%	p = 0.37
<i>BRCA2ΔE12</i>	r.6842_6937del	ORF	91% (n = 91)	100%	p = 0.02
<i>BRCA2ΔE17–18</i>	r.7806_8331del	PTC; NMD	35% (n = 35)	72.5% (n = 58)	p < 0.001

¹ ORF – open reading frame; PTC - premature termination codon; NMD – nonsense-mediated mRNA decay.

² p-value was calculated using Ch² or Fisher test depending on the size of the analysed subgroup (Fisher test in case where 20 < N < 40 and single number of expectations < 5).

³ N/A - not applicable for calculations.

3.1. Quantification of naturally occurring alternative transcripts

Three alternative transcripts that retain partial functionality of native BRCA1 and BRCA2 proteins (*BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3*), were selected for quantitative analysis using RT-qPCR (Table 1). Results showed that each of the three splicing events were significantly higher expressed in patients compared to controls (Fig. 2). The highest median ± interquartile range was observed for *BRCA1ΔE11q* (0.401 ± 0.290 vs 0.187 ± 0.060, patients vs controls, respectively), followed by *BRCA1ΔE11* (0.011 ± 0.015 vs 0.002 ± 0.003) and *BRCA2ΔE3* (0.039 ± 0.029 vs 0.024 ± 0.016). Moreover, when analysing the expression of these isoforms in 10 new FFPE ovarian tumours and pair-matched normal adjacent tissue, we did not observe any difference between these two groups for any tested isoforms, which may indicate the global character of pre-mRNA splicing dysregulation (Fig. S2).

3.2. Screening for underlying genetic variants which could influence the expression of *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3*

Garibay et al. previously indicated that rs5820483 (located in intron 10 of *BRCA1*), modifies the expression of the *BRCA1* exon 11 related isoforms, E11q and ΔE11 (Ruiz de Garibay et al., 2021). To test the

association between rs5820483 status and expression of *BRCA1ΔE11q* and *BRCA1ΔE11* transcripts, we genotyped our cohort of patients for the presence of mentioned variant.

Genomic DNA was available for 60 (out of 101 analysed) patients enrolled on this study. The rs5820483 was identified in 29 patients (48.3%), with 24 being heterozygotes (NM_007294.3:c.[671-248_671-246dup];[671-248_671-246=]) and additional five homozygotes (NM_007294.3:c.[671-248_671-246dup];[671-248_671-246dup]), the remaining 31 patients were wild-type.

Next, we evaluated if rs5820483 status correlated with the expression of *BRCA1ΔE11* or *BRCA1ΔE11q* transcripts; however, no statistical difference was observed between the groups. Similarly, there was no statistically significant difference when examining the ratio of the full-length *BRCA1* transcript to the *BRCA1ΔE11* or *BRCA1ΔE11q* isoforms and rs5820483 genotype. Based on these results, we concluded that there was no correlation between rs5820483 status and expression of the exon 11 isoforms (Fig. 3a-b).

Lastly, using in silico profiling, we estimated that most splicing regulatory motifs that could potentially influence exon 3 (*BRCA2*) splicing were located within 250 bp upstream and downstream of exon 3. Nevertheless, the sequencing of both flanking intronic sequences and exon 3 did not reveal any intronic alteration that might dysregulate mRNA splicing and promote the expression of *BRCA2ΔE3*.

4. Discussion

Up to 50% of epithelial ovarian cancers exhibit defective DNA repair via homologous recombination (HR) at diagnosis (Wang et al., 2011). The HR defect can arise as a consequence of genetic and epigenetic alterations and is an important therapeutic target when using platinum-based chemotherapy and targeted therapy with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors (Walsh, 2015; Tan and Kaye, 2015).

Testing for *BRCA1/2* mutations is recommended for all patients with non-mucinous ovarian cancer as PARPi therapy inclusion criteria. However, various studies demonstrated PARPi response beyond *BRCA*-mutated tumours (Gelmon et al., 2011; Swisher et al., 2017).

Although slightly different between laboratories, current diagnostic protocols are based on screening for potentially pathogenic SNVs and CNVs, often limiting to exons with flanking intronic sequences and ignoring deep-intronic alterations (Pujol et al., 2021).

It is generally accepted that introns play a crucial role in controlling gene expression and splicing regulation, with several studies reporting intronic changes to play an essential role in the pathogenesis of individual disorders (Xiong et al., 2015; Li et al., 2012). At the same time, intronic sequences in the human are typically long (average length ~ 5.4 kb (Sakharkar et al., 2004)), making direct screening costly and time-consuming. Therefore, analysis of transcripts becomes a method of

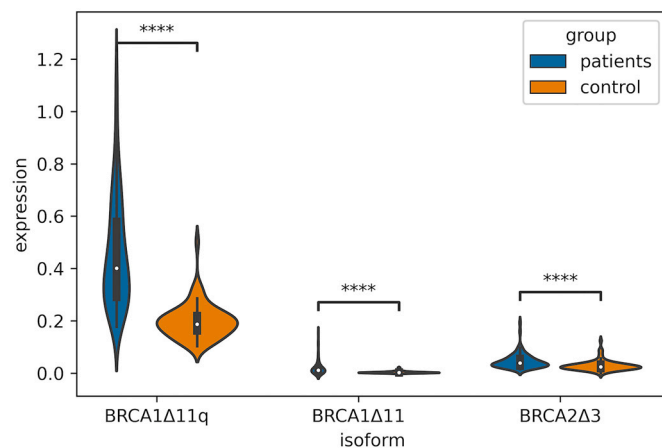


Fig. 2. Relative expression of *BRCA1ΔE11q*, *BRCA1ΔE11* and *BRCA2ΔE3* in OC patients and healthy controls using RT-qPCR.

The comparison between the groups was done using the Mann Whitney U test. P-value annotation legend: ****- p ≤ 0.0001. Plot include a marker for the median of the data and a box indicating the interquartile range. Violin show the kernel probability density of the data at different values.

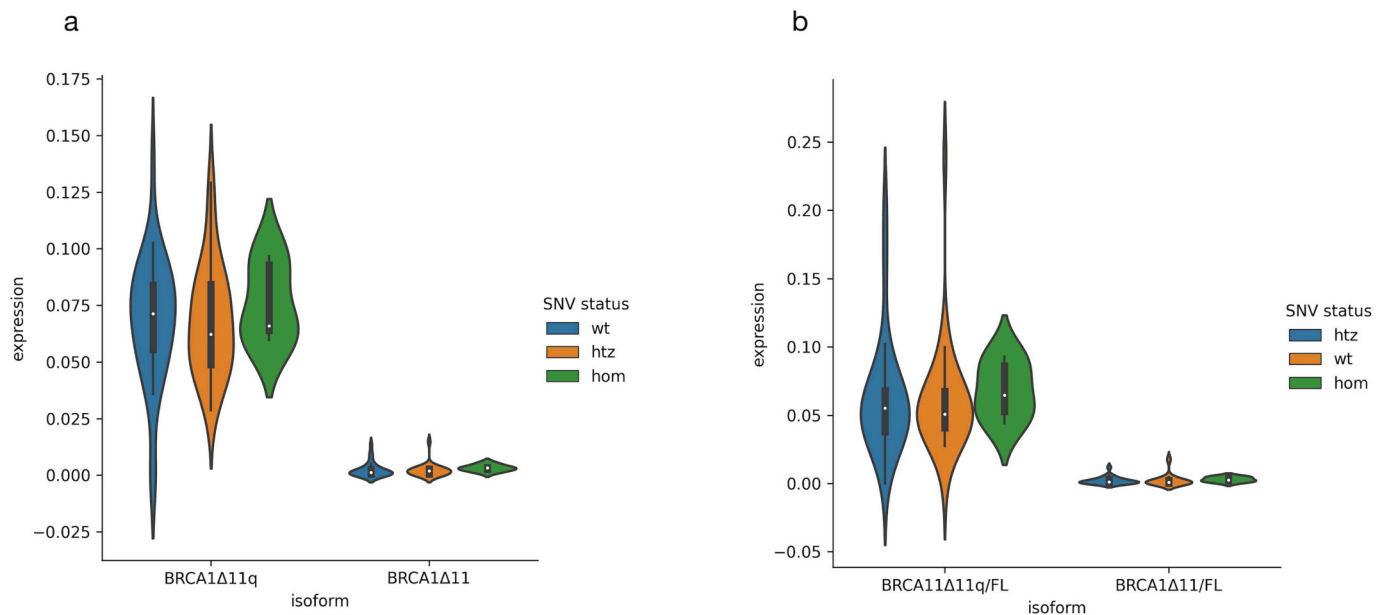


Fig. 3. Relative expression of *BRCA1ΔE11q* and *BRCA1ΔE11* transcripts in OC patients depending on *rs5820483* genotype. (a) normalizing with *IPO8* and *HPR1* genes, and (b) full-length *BRCA1*.

The comparison between the groups was done using the Mann Whitney U test. Plot include a marker for the median of the data and a box indicating the interquartile range. Violin show the kernel probability density of the data at different values.

choice when searching for the presence of potentially pathogenic mRNA alterations (Baralle and Baralle, 2005).

Here we analysed a cohort of 101 OC patients (previously found negative for PVs in 25 OC-genes) for the presence of potentially pathogenic *BRCA1/2* transcripts. We did not demonstrate any aberrant transcripts; however, we identified several naturally expressed isoforms in the *BRCA1* gene named *BRCA1ΔE9–10*, *BRCA1ΔE10–11*, *BRCA1ΔE11*, *BRCA1ΔE11q*, and five different splicing events in the *BRCA2* gene: *BRCA2ΔE3*, *BRCA2ΔE3–4*, *BRCA2ΔE6q–7*, *BRCA2ΔE12* and *BRCA2ΔE17–18* (Fackenthal et al., 2016; Gambino et al., 2015a).

Our results support those of previous studies, that showed splicing events of potential diagnostic importance are relatively infrequent in the *BRCA1/2* genes (dos Santos et al., 2018; Montalban et al., 2021) compared to other genes, e.g. *NF1* and *ATM* (Baralle and Baralle, 2005; Ars et al., 2000).

Although some studies reported presence of pathogenic transcripts, these were very rare cases and usually present in highly selected study groups, e.g. strong family history of breast and ovarian cancer (Anczuków et al., 2012; Gambino et al., 2015b; Montalban et al., 2019; Byers et al., 2016). In our study, we analysed a group of ovarian cancer patients who were negative for the presence of PVs in an earlier study but were unselected based on their family history. In our opinion, this discrepancy in study group composition potentially resulted in a lack of aberrant splicing.

It is well-known that the composition of alternative transcripts (conferring different functions) ensure the biodiversity of the gene's products (Fackenthal et al., 2016; Gambino et al., 2015a), and is essential for the harmonious, carefully controlled operation of many intracellular processes (Li et al., 2019). The violation of this homeostasis might disrupt those key cellular processes, e.g. interfering with cellular signalling and promoting tumour growth (Wang and Aifantis, 2020). Three alternative transcripts identified here (*BRCA1ΔE11*, *BRCA1ΔE11q* and *BRCA2ΔE3*) have been previously shown to be potentially harmful when overexpressed (Caputo et al., 2018; Wang et al., 2016). Hence, we performed RT-qPCR experiments to assess the expression of these isoforms in our OC patients and healthy controls, finding a significant overexpression of each of the transcripts in the OC cohort. *BRCA1ΔE11*

or *ΔE11q* are almost exclusively cytoplasmic (Thakur et al., 1997). In addition, they retain some of the *BRCA1* functions, which, when overexpressed, can lead to secondary resistance to PARPi therapy (Wang et al., 2016). Here, we report the overexpression of *Δ11* isoforms in peripheral lymphocytes of OC patients compared to healthy controls, potentially indicating a role of these transcripts in predisposition to cancer.

Our results also showed that overexpression of *BRCA1ΔE11* or *ΔE11q*, was not associated with *rs5820483* genotype, as reported previously (Ruiz de Garibay et al., 2021). The contrast with results from Garibay et al. may have resulted from a larger samples sizes analysed in our study, thus reducing a potential bias introduced by a smaller study group. Further studies are required to clarify these contrasting results and to better understand the potential role of other genetic variants and *BRCA1ΔE11* or *ΔE11q* expression levels.

The genesis of *BRCA2* natural transcripts remains open, being partially addressed by likely occurring natural events or in contradiction due to the rescue process of expressing partially functional *BRCA2* protein isoform (Mesman et al., 2020). However, our results display a significant overexpression of *BRCA2ΔE3* in OC patients, yet we could not identify any underlying genetic factor that could promote alternative splicing and exclusion of exon 3. It is worth emphasizing that we did not examine the entire sequences of the surrounding introns, however, we significantly expanded the area used in standard diagnostics.

Notably, it was previously demonstrated that ectopically expressed *BRCA2* transcripts lacking exon 3 (*BRCA1ΔE3*) confer hypersensitivity to DNA damage, with cells dying in response to DNA crosslinking Mitomycin C¹⁴ (Caputo et al., 2018). Clinical reports further supported this observation, indicating that deletion of exon 3 is associated with an increased risk of breast and ovarian cancer (Muller et al., 2011). The defective DNA repair function of *BRCA1ΔE3* might be related to a loss of the PALB2 binding site, which has been mapped within the exon 3 (21–39 aa) (Xia et al., 2006; Zhang et al., 2009).

Several previously published studies also emphasised the importance of *BRCA2* and *PALB2* interaction for maintaining a proper DNA repair and cell cycle control, given that *BRCA2* and *PALB2* are key regulators of G2/M checkpoint control in response to DNA damage (Zhang et al.,

2009; Menzel et al., 2011; Siaud et al., 2011; Hartford et al., 2016). The significance of overexpression of *BRCA1/2* naturally-occurring transcripts in predisposition to OC is limited, with most studies addressing their role in neoplastic cells. Nevertheless, the unbalanced expression of these natural isoforms is considered a hallmark of tumorigenesis (Urbanski et al., 2018).

Here we present significant differences in the expression of three naturally-occurring isoforms named *BRCA1ΔE11*, *BRCA1ΔE11q*, and *BRCA2ΔE3* in peripheral blood RNA of ovarian cancer patients. Moreover, we examined the expression of these isoforms in primary ovarian tumours and pair-matched adjacent tissue (from the same patient) and did not observe differences in expression between cancerous and normal tissue. This observation supports a theory of a systemic alteration of the expression of these isoforms. However, addressing the origin of these alterations and answering whether they are causative, increasing the risk of disease, or are a reflection of existing condition (e.g. cancer-related inflammation (Mehta et al., 2021)) warrants further investigation.

The main limitation of this study is analysing individual fragments of *BRCA1/2* transcripts to search for splicing alterations without the potential for observing the parallel occurring splicing events as indicated elsewhere (de Jong et al., 2017). However, the above can be obtained when utilising the long-read sequencing technique, like NanoPore, which is restricted to the excellent quality of biological material. The RNA being analysed here did not meet the requirements for NanoPore sequencing.

In our study, there was a difference in the age distribution between the cases and the controls, resulting from hardships in recruiting older, healthy women to the study. When analysing a relative expression of *BRCA1EΔ11q*, *BRCA1EΔ11*, and *BRCA2EΔ3* between OC patients and healthy controls, the result was normalised using housekeeping genes (*IPO8* and *HPRT1*). Additionally, expression of *BRCA1EΔ11q* and *BRCA1EΔ11* was normalised with full-length *BRCA1* (primers located in exon 11 of the *BRCA1* gene). However, we did not normalise the result with total *BRCA1* or *BRCA2*. Therefore, we cannot exclude that difference in the expression of analysed transcripts reflects a generally higher expression of *BRCA1* and *BRCA2* in those patients.

Finally, we did not investigate here a potential role of RNA methylation, which can regulate RNA splicing and transcripts stability and decay (Lan et al., 2021).

5. Conclusions

Our results support that splicing events of potential diagnostic importance by evaluating blood RNA-derived cDNA are relatively infrequent in the *BRCA1/2* genes and that present diagnostic protocols based on germline DNA allow identifying a majority of aberrant splicing events.

Nevertheless, our analysis identified a significant difference in the expression of selected natural transcripts between OC patients and controls. However, determining the origin of those changes and their implication on diagnostic protocols require further investigation.

Institutional review board statement

The study was approved by the local ethics committee at the Medical University of Gdansk (no NKBBN/10/2021).

Funding

This research was funded by Medical University of Gdansk [grant number: 02-0002], National Science Center [grant number 2011/02/A/NZ2/00017] and The New Zealand Institute for Cancer Research Trust [fellowship of M Ratajska].

CRedit authorship contribution statement

Anna Jasiak: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Magdalena Koczkowska:** Resources. **Maciej Stukan:** Resources. **Dariusz Wydra:** Resources. **Wojciech Biernat:** Resources. **Ewa Izzycka-Swieszewska:** Resources. **Kamil Buczkowski:** Resources. **Logan Walker:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Bartosz Wasag:** Funding acquisition, Writing - review & editing. **Magdalena Ratajska:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The author(s) declare that they have no competing interests.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2023.104856>.

References

- Anczuków, O., Buisson, M., Léonie, M., et al., 2012. BRCA2 deep intronic mutation causing activation of a cryptic exon: opening toward a new preventive therapeutic strategy. *Clin. Cancer Res.* 18 (18), 4903–4909. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1100>.
- Ars, E., Serra, E., García, J., et al., 2000. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* 9 (2), 237–247. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.237>.
- Baralle, D., Baralle, M., 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J. Med. Genet.* 42 (10), 737–748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>.
- Berek, J.S., Renz, M., Kehoe, S., Kumar, L., Friedlander, M., 2021. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 155 (S1), 61–85. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13878>.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 68 (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I., 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* 127 (16), 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/ncr.33587>.
- Byers, H., Wallis, Y., Van Veen, E.M., et al., 2016. Sensitivity of BRCA1/2 testing in high-risk breast/ovarian/male breast cancer families: little contribution of comprehensive RNA/NGS panel testing. *Eur. J. Hum. Genet.* 24 (11), 1591. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2016.57>.
- Caputo, S.M., Léonie, M., Damiola, F., et al., 2018. Full in-frame exon 3 skipping of BRCA2 confers high risk of breast and/or ovarian cancer. *Oncotarget.* 9 (25), 17334–17348. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24671>.
- Clark, S.L., Rodriguez, A.M., Snyder, R.R., Hankins, G.D.V., Boehning, D., 2012. Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 1 (1) <https://doi.org/10.5936/csbi.201204005>.
- Colombo, M., Blok, M.J., Whaley, P., et al., 2014. Comprehensive annotation of splice junctions supports pervasive alternative splicing at the BRCA1 locus: a report from the ENIGMA consortium. *Hum. Mol. Genet.* 23 (14), 3666–3680. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu075>.
- Colombo, M., López-Perolio, I., Meeks, H.D., et al., 2018. The BRCA2 c.68-7T > A variant is not pathogenic: a model for clinical calibration of spliceogenicity. *Hum. Mutat.* 39 (5), 729–741. <https://doi.org/10.1002/humu.23411>.
- de Jong, L.C., Cree, S., Lattimore, V., et al., 2017. Nanopore sequencing of full-length BRCA1 mRNA transcripts reveals co-occurrence of known exon skipping events. *Breast Cancer Res.* 19 (1) <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0919-1>.
- de la Hoya, M., Soukariéh, O., López-Perolio, I., et al., 2016. Combined genetic and splicing analysis of BRCA1 c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. *Hum. Mol. Genet.* 25 (11), 2256–2268. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw094>.
- dos Santos, E.S., Lallemand, F., Burke, L., et al., 2018. Non-coding variants in BRCA1 and BRCA2 genes: potential impact on breast and ovarian cancer predisposition. *Cancers (Basel).* 10 (11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers10110453>.

- ElSharawy, A., Manaster, C., Teuber, M., et al., 2006. SNPSplicer: systematic analysis of SNP-dependent splicing in genotyped cDNAs. *Hum. Mutat.* 27 (11), 1129–1134. <https://doi.org/10.1002/humu.20377>.
- Fackenthal, J.D., Yoshimatsu, T., Zhang, B., et al., 2016. Naturally occurring BRCA2 alternative mRNA splicing events in clinically relevant samples. *J. Med. Genet.* 53 (8), 548–558. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103570>.
- Gambino, G., Tancredi, M., Falaschi, E., Aretini, P., Caligo, M.A., 2015a. Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations. *Int. J. Mol. Med.* 35, 950–956. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2103>.
- Gambino, G., Tancredi, M., Falaschi, E., Aretini, P., Caligo, M.A., 2015b. Characterization of three alternative transcripts of the BRCA1 gene in patients with breast cancer and a family history of breast and/or ovarian cancer who tested negative for pathogenic mutations. *Int. J. Mol. Med.* 35 (4), 950–956. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2015.2103/HTML>.
- Gelmon, K.A., Tischkowitz, M., Mackay, H., et al., 2011. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* 12 (9), 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70214-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70214-5).
- Hartford, S.A., Chittela, R., Ding, X., et al., 2016. Interaction with PALB2 is essential for maintenance of genomic integrity by BRCA2. *PLoS Genet.* 12 (8), e1006236. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006236>.
- James, P.A., Fortuno, C., Li, N., Lim, B.W.X., Campbell, I.G., Spurdle, A.B., 2022. Estimating the proportion of pathogenic variants from breast cancer case-control data: application to calibration of ACMG/AMP variant classification criteria. *Hum. Mutat.* <https://doi.org/10.1002/humu.24357>.
- Koczkowska, M., Krawczynska, N., Stukan, M., et al., 2018. Spectrum and prevalence of pathogenic variants in ovarian cancer susceptibility genes in a group of 333 patients. *Cancers (Basel)*. 10 (11), 442. <https://doi.org/10.3390/cancers10110442>.
- Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., et al., 2017. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers supplemental content. *JAMA.* 317 (23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>.
- Lan, Q., Liu, P.Y., Bell, J.L., et al., 2021. The emerging roles of rna m6a methylation and demethylation as critical regulators of tumorigenesis, drug sensitivity, and resistance. *Cancer Res.* 81 (13), 3431–3440. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4107>.
- Li, H., Chen, D., Zhang, J., 2012. Analysis of intron sequence features associated with transcriptional regulation in human genes. *PLoS One* 7 (10), 46784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046784>.
- Li, D., Harlan-Williams, L.M., Kumaraswamy, E., Jensen, R.A., 2019. BRCA1 - no matter how you splice it. *Cancer Res.* 79 (9), 2091–2098. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3190>.
- Lisio, M.A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z.H., Telleria, C., 2019. High-grade serous ovarian cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (4) <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>.
- Liu, Y., Lu, L.Y., 2020. BRCA1 and homologous recombination: implications from mouse embryonic development. *Cell. Biosci.* 10 (1) <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00412-4>.
- Mehta, S., Campbell, H., Drummond, C.J., et al., 2021. Adaptive homeostasis and the p53 isoform network. *EMBO Rep.* 22 (12), e53085 <https://doi.org/10.15252/embr.202153085>.
- Menzel, T., Näsignhse-Kumpf, V., Kousholt, A.N., et al., 2011. A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance. *EMBO Rep.* 12 (7), 705–712. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.99>.
- Mesman, R.L.S., Calléja, F.M.G.R., de la Hoya, M., et al., 2020. Alternative mRNA splicing can attenuate the pathogenicity of presumed loss-of-function variants in BRCA2. *Genet. Med.* 22 (8), 1355–1365. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0814-5>.
- Meulemans, L., Mesman, R.L.S., Caputo, S.M., et al., 2020. Skipping nonsense to maintain function: the paradigm of BRCA2 exon 12. *Cancer Res.* 80 (7), 1374–1386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2491>.
- Milner, J., Fuks, F., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., 2000. The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. *Oncogene.* 19 (38), 4441–4445. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203793>.
- Montalban, G., Bonache, S., Moles-Fernández, A., et al., 2019. Screening of BRCA1/2 deep intronic regions by targeted gene sequencing identifies the first germline BRCA1 variant causing pseudoexon activation in a patient with breast/ovarian cancer. *J. Med. Genet.* 56 (2), 63–74. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2018-105606>.
- Montalban, G., Bonache, S., Bach, V., et al., 2021. BRCA1 and BRCA2 whole cDNA analysis in unsolved hereditary breast/ovarian cancer patients. *Cancer Gene Ther.* 258–259, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2021.06.003>.
- Muller, D., Rouleau, E., Schultz, I., et al., 2011. An entire exon 3 germ-line rearrangement in the BRCA2 gene: pathogenic relevance of exon 3 deletion in breast cancer predisposition. *BMC Med. Genet.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-121>.
- Pagani, F., Baralle, F.E., 2009. Analysis of human splicing defects using hybrid minigenes. *Mol. Diagnostics Second Ed.* 155–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374537-8.00011-0>.
- Pujol, P., Barberis, M., Beer, P., et al., 2021. Clinical practice guidelines for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. *Eur. J. Cancer* 146, 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.12.023>.
- Ruiz de Garibay, G., Fernandez-Garcia, I., Mazoyer, S., et al., 2021. Altered regulation of BRCA1 exon 11 splicing is associated with breast cancer risk in carriers of BRCA1 pathogenic variants. *Hum. Mutat.* 42 (11), 1488–1502. <https://doi.org/10.1002/humu.24276>.
- Sakharkar, M.K., Chow, V.T.K., Kanguane, P., 2004. Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol.* 4 (4), 387–393. <https://europepmc.org/article/med/15217358>.
- Siaud, N., Barbera, M.A., Egashira, A., et al., 2011. Plasticity of BRCA2 function in homologous recombination: genetic interactions of the PALB2 and DNA binding domains. *PLoS Genet.* 7 (12), e1002409 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002409>.
- Swisher, E.M., Lin, K.K., Oza, A.M., et al., 2017. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 18 (1), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30559-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30559-9).
- Tan, D.S.P., Kaye, S.B., 2015. Chemotherapy for patients with BRCA1 and BRCA2 –mutated ovarian cancer: same or different? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* 35, 114–121. <https://doi.org/10.14694/edbook.am.2015.35.114>.
- Thakur, S., Zhang, H.B., Peng, Y., et al., 1997. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* 17 (1), 444–452. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.1.444>.
- Thomassen, M., Mesman, R.L.S., Hansen, T.V.O., et al., August 2022. Clinical, splicing, and functional analysis to classify BRCA2 exon 3 variants: application of a points-based ACMG/AMP approach. *Hum. Mutat.* <https://doi.org/10.1002/HUMU.24449>.
- Tubeuf, H., Caputo, S.M., Sullivan, T., et al., 2020. Calibration of pathogenicity due to variant-induced leaky splicing defects by using BRCA2 exon 3 as a model system. *Cancer Res.* 80 (17), 3593–3605. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0895>.
- Urbanski, L.M., Leclair, N., Anczuków, O., 2018. Alternative-splicing defects in cancer: splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 9 (4) <https://doi.org/10.1002/wrna.1476>.
- Walsh, C.S., 2015. Two decades beyond BRCA1/2: homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy? *Gynecol. Oncol.* 137 (2), 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.017>.
- Wang, E., Aifantis, I., 2020. RNA splicing and cancer. *Trends Cancer.* 6 (8), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.011>.
- Wang, H.F., Takenaka, K., Nakanishi, A., Miki, Y., 2011. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the rho effector kinase ROCK2. *Cancer Res.* 71 (1), 68–77. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0030>.
- Wang, Y., Bernhardt, A.J., Cruz, C., Kraus, J.J., Nacson, J., 2016. The BRCA1- Δ 11q alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin. *Cancer Res.* 5 (6), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000305.Improved>.
- Weiderpass, E., Tyczynski, J.E., 2015. Epidemiology of patients with ovarian cancer with and without a BRCA1/2 mutation. *Mol. Diagnosis Ther.* 19 (6), 351–364. <https://doi.org/10.1007/s40291-015-0168-x>.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., et al., 2006. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell* 22 (6), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.022>.
- Xiong, H.Y., Alipanahi, B., Lee, L.J., et al., 2015. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science (80-)*. 347 (6218) <https://doi.org/10.1126/science.1254806>.
- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., Andreassen, P.R., 2009. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.* 7 (7), 1110–1118. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0123>.