

Streszczenie

Badanie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w procesy aktywnej demetylacji DNA w raku piersi

5-metylocytozyna (5-mC) jest głównym znacznikiem epigenetycznym regulującym poziom ekspresji genów w komórce. Rak piersi, podobnie jak wiele innych nowotworów charakteryzuje się występowaniem globalnej hipometylacji DNA. Poziom 5-mC w komórce może być uwarunkowany m.in. procesem aktywnej demetylacji DNA, w którym uczestniczą białka TET, a także procesem deaminacji zachodzącym przy udziale białek AID. Komórka nowotworowa wykazuje zmieniony metabolizm energetyczny, przejawiający się m.in. zmianami aktywności enzymów cyklu Krebsa: dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH1, IDH2) oraz wystąpieniem stanu hipoksji w komórce, który aktywuje czynniki indukowane hipoksją (HIF1- α , HIF2- α). Wszystkie powyższe procesy mogą przyczyniać się do zakłócenia równowagi pomiędzy metylacją i demetylacją DNA. Głównym celem pracy była zbadanie czy w leukocytach kobiet z rakiem piersi występują zmiany w poziomie ekspresji genów i kluczowych metabolitów związanych z aktywną demetylacją DNA w porównaniu do kobiet zdrowych. Podtypy biologiczne raka piersi warunkują dalszy schemat postępowania terapeutycznego. Stwierdzono, że w poszczególnych podtypach występują specyficzne profile metylacji. Procesy epigenetyczne mogą potencjalnie regulować skuteczność terapii, dlatego kolejnym celem w przedstawionej pracy było zbadanie czy leczenie neoadjuwantowe może powodować zmiany w poziomie ekspresji genów i produktów aktywnej demetylacji DNA. Zaburzenie wzoru metylacji DNA kluczowych genów powiązanych z występowaniem raka piersi może mieć wpływ na progresję choroby. Ostatnim celem niniejszej pracy była ocena czy poziom ekspresji genów związanych z aktywną demetylacją DNA oraz kluczowych molekuł zaangażowanych w ten proces może mieć zastosowanie jako potencjalny czynnik prognostyczny raka piersi. Badaniami objęto grupę 60 kobiet z rakiem piersi i 33 kobiet zdrowych. Od kobiet chorujących na raka piersi pobrano krew po zdiagnozowaniu nowotworu (punkt A), po terapii doksorubicyną i cyklofosfamidem (punkt B), po leczeniu taksanami (punkt C) oraz miesiąc po zabiegu operacyjnym (punkt D). Od 22 pacjentek z rakiem piersi pobrano również materiał z tkanki guza i jego obrzeży. W celu określenia poziomu transkryptu genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *AID*, *IDH1*, *IDH2*, *HIF1- α* , *HIF2- α* wykorzystano technikę qRT-PCR opartą na sondach hydrolizujących UPL. Ilościowy poziom 5-mC i jej pochodnych określono z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową detekcją mas 2D-UPLC-MS/MS. Niski poziom ekspresji genu *TET1* i obniżony poziom 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC) w leukocytach i tkankach kobiet z rakiem piersi oraz ich korelacja z indeksem proliferacyjnym Ki-67 w leukocytach świadczą o ich możliwym zastosowaniu jako potencjalny marker prognostyczny. Obniżony poziom ekspresji genu *AID* z równoczesnym wzrostem 5-hydroksymetylouracylu (5-hmU) może świadczyć o marginalnym udziale tej deaminazy w przemianach 5-mC i jej pochodnych u kobiet z rakiem piersi. Wysoki poziom ekspresji genu *TET3* oraz wysokie poziomy 5-fomycytozyny (5-fC) oraz 5-karboksycytozyny (5-caC) mogą sugerować preferencyjną dalszą hydroksylację 5-hmC przez białka *TET3*. Wysoki poziom ekspresji genu *IDH1* w leukocytach kobiet z rakiem piersi oraz niższy poziom ekspresji u pacjentek, u których w wyniku leczenia uzyskano dużą lub całkowitą remisję, pozwala typować ten parametr jako marker skuteczności leczenia. Zmiany w procesie aktywnej demetylacji po leczeniu doksorubicyną przejawiające się niższym poziomem ekspresji genów *TET* i *TDG* oraz niższym poziomem pochodnych 5-mC, mogą sugerować alternatywny, możliwy mechanizm oddziaływania tego leku na komórki docelowe. Obserwowane łagodne tendencje zmian w poziomie ekspresji genów oraz produktów związanych z aktywną demetylacją DNA u kobiet z różnymi podtypami biologicznymi raka piersi mogą świadczyć o potencjalnym wykorzystaniu ich jako narzędzie do planowania leczenia i rozwoju nowych terapii raka piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi, epigenetyka, aktywna demetylacja DNA, terapia neoadjuwantowa, RT-qPCR.

Kinga Linowiecka