

Uracyl w DNA i epigenetyczne modyfikacje – nowe biomarkery rozwoju szpiczaka mnogiego? W poszukiwaniu związku między genetycznymi/epigenetycznymi modyfikacjami DNA i ewolucją szpiczaka mnogiego.

DNA zawarte w każdej żywej komórce podlega ciągłym zmianom strukturalnym i chemicznym. Mogą one powstawać w wyniku działania zarówno szkodliwych czynników zewnętrznych, jak i generowanych podczas procesów metabolicznych wewnątrz komórki, a także na drodze błędów w replikacji, z szacowaną częstością około 70 000 uszkodzeń DNA na pojedynczą komórkę każdego dnia. Nienaprawione uszkodzenia DNA mogą być źródłem mutacji, które leżą u podłoża rozwoju różnych chorób, m.in. nowotworowych. Oprócz zmian genetycznych przyczyniających się do transformacji nowotworowej, w patogenezie nowotworów powszechnie obserwowane są zmiany wzoru metylacji DNA. Poziom 5-metylocytozyny (5-mCyt) może zmieniać się w wyniku aktywnej demetylacji DNA z udziałem białek TET, które katalizują utlenianie 5-mCyt do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt), a ta może być dalej utleniana do 5-formylocytozyny (5-fCyt) i 5-karboksytozyny (5-caCyt).

Proponowane w projekcie badania mają na celu określenie roli wyżej wymienionych modyfikacji w rozwoju szpiczaka mnogiego (MM). MM jest drugim co do częstości występowania, nowotworem hematologicznym, który powoduje ponad 100 000 zgonów rocznie na świecie. MM jest chorobą postępującą, prawie zawsze poprzedzoną bezobjawowym stadium - gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS). MGUS dotyka około 3% populacji powyżej 50 roku życia, wrastając do prawie 9% w grupie osób powyżej 85 roku życia. Prawdopodobieństwo progresji MGUS w kierunku szpiczaka mnogiego wzrasta o 1% na rok. Z MGUS często rozwija się bezobjawowy szpiczak tłący (SMM), który jest stanem przejściowym między MGUS a pełnoobjawowym szpiczakiem (FMM) i białaczką plazmatycznokomórkową (PCL).

Szpiczak mnogi to złośliwy nowotwór hematologiczny wywodzący się z plazmocytów, czyli komórek B znajdujących się w końcowym etapie różnicowania. Różnicowanie komórek B w komórki plazmatyczne związane jest z dywersyfikacją genów kodujących immunoglobuliny (*Ig*) (segmentów VDJ) na drodze somatycznych hipermutacji (SHM) i rekombinacji podczas przełączania izotypów przeciwciał (CSR). Hipermutacje somatyczne podczas różnicowania i dojrzewania przeciwciał są wynikiem deaminacji cytozyny do uracylu w genach kodujących *Ig* z udziałem deaminazy cytydyny indukowanej aktywacją limfocytów B (AID).

Nieprawidłowa ekspresja AID może skutkować nadmierną deaminacją cytozyny do uracylu, wprowadzając w ten sposób mutacje do łańcucha DNA, w innych genach niż kodujących *Ig*. To z kolei może przyczynić się do akumulacji mutacji genetycznych, prowadzących w konsekwencji do transformacji nowotworowej. Niedawno opublikowane badania sugerują, że nieprawidłowa aktywacja AID może być związana z progresją szpiczaka tłącego do szpiczaka uogólnionego.

Nasza hipoteza zakłada, że: deregulacja procesów metylacji / demetylacji DNA może być powiązana z zaburzeniami podczas różnicowania plazmocytów oraz z nieprawidłową ekspresją AID, co z kolei może skutkować: i/ nieprawidłowym poziomem 2'-deoksyuridyny (dU), ii/ mutacjami indukowanymi obecnością dU, oraz iii/ zmianami produktów aktywnej demetylacji (5-hydroksymetylo-2'-deoksycytydyny, 5-formylo-2'-deoksycytydyny, 5-karboksy-2'-deoksycytydyny i 5-hydroksymetylo-2'-deoksurydyny).

W celu oznaczenia wyżej wymienionych modyfikacji w DNA i w moczu posłuży opracowana przez nasz zespół, wysoce czuła i specyficzna metoda z wykorzystaniem dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią masową (2D-UPLC-MS/MS). Metodologia ta pozwala na precyzyjną analizę produktów utleniania 5-metylo-2'-deoksycytydyny (5-mdC), ale również na jednoczesne oznaczenie 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) oraz 2'-deoksurydyny (dU) zawartej w DNA. Zmiany mutacyjne będą wykrywane dzięki sekwencjonowaniu genów decydujących o rozwoju MM.

Głównym celem projektu jest analiza czynników związanych z rozwojem MM: i/ niestabilności genomu - odzwierciedlonej obecnością dU w DNA; ii/ zaburzeń epigenetycznych - wyrażonych zmianami w całym spektrum modyfikacji epigenetycznych DNA; iii / dysregulacji naprawy DNA - poprzez ocenę ekspresji kluczowych genów zaangażowanych w naprawę DNA oraz ocenę wydalania produktów naprawy DNA z moczem.

Dodatkowo chcielibyśmy dowiedzieć się: czy stres oksydacyjny indukowany chemioterapeutykami stosowanymi w leczeniu MM może mieć związek z rozwojem oporności na chemioterapię. W tym celu oznaczony zostanie poziom (8-oksydG), uznawanej za biomarker stresu oksydacyjnego w DNA komórkowym oraz wydalanej w moczu.

Założone badania mogą dać odpowiedź na jedno z kluczowych pytań - co jest pierwotnym źródłem niestabilności genomu/zmian epigenetycznych w rozwoju MM. Proponowane w projekcie analizy powinny zatem pozwolić na ocenę ich przydatności jako biomarkerów rozwoju MM i ewentualnej wartości predykcyjnej przebiegu terapii. Znalazienie markerów rozwoju MM może być pomocne we wczesnym wykrywaniu choroby i optymalizacji leczenia.