

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA, polegająca na przyłączeniu grupy metylowej do pierścienia cytozyny. Proces powstawania 5-metylocytozyny (5-metCyt) jest katalizowany przez metylotransferazy DNA. Metylacja reszt cytozynowych odgrywa ważną rolę w kontroli ekspresji genów, w tym związanych z odpowiedzią na leki. Geny aktywne transkrypcyjnie wykazują hipometylację, podczas gdy transkrypcyjnie nieaktywne są zazwyczaj zmetylowane. Od niedawna wiadomo, że poziom 5-metylocytozyny w DNA może ulegać zmianom w wyniku procesu aktywnej demetylacji. Komórki wielu nowotworów (w tym raka piersi) i zmian przednowotworowych charakteryzuje globalna hipometylacja DNA, skutkująca niestabilnością genomu.

U ssaków 5-metCyt może być dalej utleniana do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmCyt) z udziałem białek TET (ang. ten-eleven translocation), a jej zawartość w genomowym DNA ocenia się na około 0,003 – 0,6%. Pochodnymi utlenionej przez rodzinę białek TET 5-hmCyt są 5-formylocytozyna (5-fCyt) i 5-karboksycytozyna (5-caCyt). Na drodze naprawy typu BER (ang. base excision repair), czyli poprzez wycinanie zasad, glikozylaza TDG usuwa 5-fCyt i 5-caCyt i zastępuje cytozyn, czego efektem jest demetylowany DNA. 5-HmCyt może ulegać deaminacji z udziałem białek rodziny AID/APOBEC prowadzącej do powstania 5-hydroksymetylouracylu (5-hmUra). Kofaktorami dla białek TET są jony Fe^{2+} i cząsteczki 2-ketoglutaranu. Aktywność niektórych białek TET jest zależna od obecności witaminy C. Uważa się, że witamina C, poprzez regulację aktywności TET, wzmacnia powstawanie 5-hmCyt. Białka TET jako dioksygenazy wykorzystują do swojej aktywności tlen i 2-ketoglutaran mogą modulować stan metaboliczny i oksydacyjny komórek i w ten sposób zmieniać wzór metylacji DNA. 2-Ketoglutaran, znany intermediat cyklu Krebsa, może zostać przekształcony do 2-hydroksyglutaranu, „onkometabolitu”, który występuje w komórkach nowotworowych w podwyższonym stężeniu i może hamować aktywność białek TET, a to z kolei może zaburzać proces aktywnej demetylacji DNA.

Najważnym celem projektu jest zbadanie czy wyżej wymienione produkty aktywnej demetylacji DNA mogą znaleźć zastosowanie jako nowe czynniki predykcyjne określające odpowiedź na systemowe leczenie przedoperacyjne (chemioterapię neoadjuwantową) pacjentek z rakiem piersi. W proponowanym projekcie badaniami będą objęte kobiety z rozpoznaniem raka piersi, które zakwalifikowano do chemioterapii neoadjuwantowej w schemacie AC-T (doksorubicyna, cyklofosfamid, taksany - paklitaksel). U wszystkich kobiet wykonane będą badania obrazowe: mammografia, ultrasonografia piersi, regionalnych węzłów chłonnych i jamy brzusznej oraz badanie rentgenowskie klatki piersiowej w celu określenia stopnia zaawansowania nowotworu w oparciu o klasyfikację TNM. Materiałem do badań będą próbki krwi i moczu pobrane przed rozpoczęciem chemioterapii (próbka A), po zakończeniu cykli z doksorubicyną i cyklofosfamidem (próbka B), po zakończeniu cykli z taksanami (próbka C) i około miesiąc po zabiegu operacyjnym (próbka D). Materiał badany będzie stanowi również tkanki pobrane w trakcie zabiegu operacyjnego (tkanka zmieniona nowotworowo i marginalna tkanka prawidłowa).

Analiza oksydacyjnych pochodnych 5-metCyt i produktów jej deaminacji w DNA izolowanym z leukocytów próbek krwi ze wszystkich punktów czasowych oraz DNA tkanek nowotworowych i odpowiadających im tkanek prawidłowych wykonana będzie przy użyciu chromatografii cieczowej dwuwymiarowej z detekcją mas (LC-2D/MS/MS). Proponowane badania mogą dostarczyć odpowiedzi na pytanie; czy istnieje związek pomiędzy poziomem metabolitów aktywnej demetylacji DNA, a remisją nowotworu oraz czy istnieje różnica w poziomach pochodnych 5-metCyt w zależności od odpowiedzi na chemioterapię. Ocena prognostyczna jest bardzo przydatna w podejmowaniu decyzji odnośnie dalszego leczenia. W przypadku potwierdzenia roli 5-hmCyt (i/lub jej pochodnych) jako markera predykcyjnego odpowiedzi na systemowe leczenie raka piersi, poziom tej modyfikacji będzie można na analizować już komercyjnie dostępnymi testami (np. przeciwciała – ELISA) i w ten sposób określić grupę podwyższonego ryzyka negatywnej odpowiedzi na zastosowane leczenie. Dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących istnienia związku pomiędzy poziomem witaminy C i 2-ketoglutaranu/2-hydroksyglutaranu we krwi i tkankach a poziomem 5-hmCyt i jej pochodnych u chorych przed i po chemioterapii. W celu wyjaśnienia udziału białek, m.in. AID, TET, TDG w procesie aktywnej demetylacji, w kontekście chemioterapii nowotworów, podejmiemy badania ekspresji tych genów w leukocytach, komórkach tkanek zmienionych nowotworowo i tkanek prawidłowych z wykorzystaniem techniki qRT-PCR. Planujemy wyjaśnić związek pomiędzy poziomem ekspresji tych genów a ilością produktów aktywnej demetylacji w badanym materiale przed i po chemioterapii. Proponowane analizy powinny dostarczyć nowych informacji na temat roli nieprawidłowych szlaków metabolicznych w rozwoju raka piersi i pozwolić na znalezienie markerów przydatnych dla wczesnej diagnozy.

Wielu badaczy uważa, że 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oksyoG) jest najlepszym markerem stresu oksydacyjnego na poziomie całego organizmu. Nasze wcześniejsze badania wykazały istnienie związku pomiędzy chemioterapią z zastosowaniem antracyklin a stresem oksydacyjnym, co uzasadnia podjęcie planowanych w projekcie badań poziomu wydalanej w moczu 8-oksyoG. Chcielibyśmy również sprawdzić, czy istnieje zależność pomiędzy stresem oksydacyjnym a poziomem produktów naprawy DNA związanych z aktywną demetylacją (5-hmCyt i 5-hmUra) wydalanych w moczu. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy istnieje bezpośredni związek między stresem oksydacyjnym indukowanym chemioterapią z procesem aktywnej demetylacji w przypadku pacjentek z rakiem piersi, powyższe analizy planujemy wykonać w próbkach moczu pobranych przed rozpoczęciem, na poszczególnych etapach oraz po zakończeniu chemioterapii.

Zmiany wzoru metylacji DNA są powszechnie obserwowane w patogenezie nowotworów, a także w reakcji na niektóre leki, w tym chemioterapeutyki. Podsumowując, można założyć, że wyniki proponowanych przez nas badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów aktywnej demetylacji DNA oraz związku obserwowanych zmian epigenetycznych z przebiegiem choroby nowotworowej i odpowiedzią na zastosowane leczenie systemowe.