

W POSZUKIWANIU ABERRACJI METYLACJI DNA ZWIĄZANYCH Z PODATNOŚCIĄ NA RAKA JAJNIKA

Rak jajnika (RJ) jest jedną z najbardziej śmiertelnych chorób nowotworowych kobiet. Rokowanie dotyczące RJ zależy głównie od jego wczesnego wykrycia (wskaźnik 5-letniego przeżycia spada z ~90% do 30% wraz z późnym wykryciem). Jednak, ze względu na bezobjawowy charakter RJ i brak skutecznych badań pozwalających wykryć wczesną fazę choroby, około 70% kobiet diagnozuje się w zaawansowanym stadium, gdy guz rozprzestrzenił się poza miednicę i do odległych miejsc przerzutowych, których nie da się całkowicie usunąć operacyjnie. Identyfikacja kobiet z grupy wysokiego ryzyka RJ i następnie odpowiednie strategie dotyczące stylu życia i badań kontrolnych, mogą wpłynąć na wczesną diagnozę i tym samym zmniejszyć liczbę zgonów.

RJ charakteryzuje się znaczącą ilością tzw. dziedzicznych przypadków. Mutacje germinalne (obecne we wszystkich komórkach ciała, w tym w komórkach rozrodczych, przekazywane w rodzinie z pokolenia na pokolenie) w już poznanych genach związanych z nowotworami, wykrywa się u ponad 20% pacjentek. Biorąc powyższe pod uwagę, RJ stanowi jeden z najlepszych modeli do badania potencjalnego wpływu alternatywnego mechanizmu, tj. nieprawidłowej metylacji DNA, na ryzyko choroby. Rozpatrywana w tym projekcie hipoteza zakłada, że nieprawidłowa metylacja DNA normalnej tkanki jest jednym z czynników przyczyniających się, przynajmniej w niektórych przypadkach, do ryzyka RJ.

Metylacja DNA to modyfikacja epigenetyczna, w której grupa metylowa jest przyłączona do węgla 5 cytozyn (5mC), zwykle w kontekście cytozyny, po której następuje guanina (miejsce CpG). Od 60% do 90% wszystkich miejsc CpG jest metylowanych u ludzi, regulując tkankowo-specyficzną ekspresję genów, wyciszenie transpozycyjnych elementów DNA i wiele innych procesów. W DNA wielu nowotworów obserwuje się nieprawidłowy wzór metylacji, obejmujący hipometylację całego genomu, jak również hipermetylację zwykle niemetylowanych wysp CpG w regionach promotorowych genów supresorowych nowotworu. Taka hipermetylacja, prowadząca do wyciszenia ekspresji genów, może działać jako alternatywny mechanizm ich inaktywacji (obok mutacji) i stanowić jedno z „dwóch zdarzeń” hipotezy Knudsona o transformacji onkogennej. Dlatego jednym z celów badawczych projektu jest ocena częstości występowania nieprawidłowej metylacji w regionach promotorowych kilku genów związanych z RJ w normalnej tkance (tj. krwi) w grupie pacjentów z RJ i dopasowanej grupie kontrolnej, w celu ustalenia potencjału tych nieprawidłowości jako nowych czynników ryzyka RJ. Do profilowania nieprawidłowej metylacji DNA opracowałam wysokowydajny i ultraczuły test panelowy metylacji (OVCA MethPanel) obejmujący regiony promotorowe dziewięciu genów związanych z RJ, który jest oparty na głębokim bisulfitymowym sekwencjonowaniu ampliconów. Dzięki dużemu pokryciu (>>1000x) OVCA MethPanel precyzyjnie określa nawet bardzo niski poziom metylacji w całym analizowanym regionie, a także w poszczególnych miejscach CpG. Jest to niezwykle ważne, ponieważ zdecydowana większość nieprawidłowej metylacji DNA w normalnej tkance ma charakter mozaikowy, czyli występuje w małej frakcji komórek. Równocześnie, w poszukiwaniu nowych nieprawidłowości metylacji DNA potencjalnie związanych z RJ, przeprowadzimy analizę całego metylomu. Skala tego podejścia umożliwi analizę dodatkowych 98% miejsc CpG w genomie, które nie były wcześniej analizowane pod kątem ich związku z podatnością na RJ. Jednoczesna identyfikacja wszystkich zasad azotowych DNA i statusu metylacji w każdej pozycji umożliwi także identyfikację związanych z RJ metylacyjnych *loci* cech ilościowych (meQTLs), czyli genetycznych *loci*, w których zmienność genetyczna jest powiązana ze zmianami w poziomie metylacji DNA w określonym miejscu CpG. Nowo zaprojektowany ultraczuły test panelowy metylacji, wykorzystujący głębokie sekwencjonowanie, zweryfikuje miejsca nieprawidłowej metylacji (zidentyfikowane w analizie całego metylomu) w większej grupie walidacyjnej. Wreszcie, korzystając z zastosowanych podejść metodologicznych, scharakteryzujemy zidentyfikowane nieprawidłowości metylacji, oceniając gęstość metylacji miejsc CpG, homo/heterogeniczność metylacji (na poziomie odczytów/komórek), rozmiar metylacji (miejsca początkowe/końcowe), współwystępowanie z wariantem genetycznym, specyficzność alleliczną oraz inne aspekty. Aspekty te są ważne np. w przewidywaniu możliwego wpływu nieprawidłowej metylacji na ekspresję genów (gęstość metylacji miejsc CpG) lub w przewidywaniu wczesnego charakteru rozwojowego tych nieprawidłowości (specyficzność alleliczna metylacji).

Podsumowując, projekt przyczyni się do istotnego poszerzenia wiedzy z zakresu wpływu nieprawidłowej metylacji DNA w prawidłowej tkance na ryzyko RJ i dostarczy nowych potencjalnych czynników ryzyka RJ związanych z metylacją.