

Streszczenie

Wstęp

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem zarówno w Polsce, jak i na świecie. W ostatnich latach co roku diagnozuje się ponad 2 mln nowych przypadków, a śmiertelność wśród kobiet z rakiem piersi jest wciąż bardzo wysoka. Nowotwór ten jest mocno zróżnicowaną jednostką chorobową, stąd też stosuje się różne klasyfikacje opierające się głównie na diagnostyce kliniczno-patologicznej, profilu molekularnym czy zróżnicowaniu histologicznym. Etiologia nowotworu może być wielokierunkowa, jednakże onkogeneza ostatecznie zależy od zmienności genetycznej oraz epigenetycznej. Powszechnie wiadomo, że uwarunkowania genetyczne modulują odpowiedź na określone terapie, dlatego też przy jej opracowywaniu wskazana jest diagnostyka wybranych zaburzeń genetycznych. Mimo, iż obecnie prym w tym zakresie wiodą mutacje wyselekcjonowanych genów, to zasadne jest, że skoro hipermetylacja, czy inne modyfikacje epigenetyczne mogą mieć wpływ na regulację ekspresji, to przy tym również na lekooporność lub wrażliwość na terapeutyki. Wśród badaczy często podejmowanym tematem jest metylacja genów i obszarów je regulujących, a której wpływ na patogenezę nowotworu ma mocne udokumentowanie w literaturze. Zmienność ta opiera się na reakcji, w której produktem jest 5-metylocytosyna, zazwyczaj hamując przy tym aktywność transkrypcyjną, jeżeli metylacja obejmuje region promotorowy. Kluczowa jest tutaj obniżona aktywność białek kodowanych przez geny supresorowe, a skutkiem jest deregulacja krytycznych w onkogenezie mechanizmów molekularnych, z których najważniejszymi jest kontrola replikacji, proliferacja, naprawa uszkodzonego DNA czy śmierć komórkowa. Coraz więcej doniesień potwierdza wartość prognostyczną długich niekodujących RNA (ang. long non-coding RNA, lncRNA) w raku piersi, które są cząsteczkami regulatorowymi na różnych poziomach. Ponadto rozwój i progresja nowotworów może być regulowana poprzez aktywność genów kodujących białka adhezyjne.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu metylacji regionów promotorowych pięciu genów na rozwój raka piersi oraz wpływu metylacji genów i poziomu ekspresji jednego z nich na określone uwarunkowania kliniczno-patologiczne. Dodatkowo podjęto się oceny korelacji pomiędzy badanymi doświadczalnie czynnikami.

Materialy i metody

Badania zostały przeprowadzone na grupie 106 pacjentek z rakiem piersi, w tym z potrójnie negatywnym rakiem piersi (ang. triple negative breast cancer, TNBC) (N=59) oraz pozostałymi grupami molekularnymi nowotworu (non triple negative breast cancer, NTNBC) (N=47). Grupa kontrolna obejmowała kobiety, u których nie zaobserwowano żadnych zmian patologicznych, bądź jedynie zmiany łagodne. Materiał badawczy stanowiła tkanka mrożona lub tkanka utrwalona oraz zatopiona w parafinie (ang. formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE). Pacjentki w większości zostały scharakteryzowane pod kątem parametrów kliniczno-patologicznych. Analiza metylacji regionów promotorowych obejmowała wyselekcjonowane na podstawie piśmiennictwa geny *MGMT*, *BRCA1*, *CDH1*, *ITGA4* oraz *MEG3*, z których każdy zdaje się mieć istotne znaczenie w nowotworzeniu czy jego progresji. Dodatkowo oceniono poziom ekspresji *MEG3* u 36 pacjentek. Metodą stosowaną do oceny statusu metylacji była odmiana klasycznej metody reakcji łańcuchowej polimerazy PCR (ang. polymerase chain reaction), metylo-specyficzny PCR (ang. methyl-specific PCR, MSP). Do analizy ekspresji natomiast zastosowano ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją (ang. quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR).

Wyniki

Przeprowadzone badania wykazały kilka korelacji, z czego większość pozostaje w zgodzie z dostępnym piśmiennictwem. Zaobserwowano znacznie częstszą metylację genu *BRCA1* w grupie TNBC ($p=0.02509$), genu *ITGA4* w całej grupie raka piersi ($p=0.00321$) oraz genu *MEG3* w grupie NTNBC ($p=0.05341$). Ponadto metylacja genów *MGMT*, *ITGA4* oraz *MEG3* była częstsza u osób z rakiem piersi w starszym wieku, przy czym dla dwóch ostatnich spośród wymienionych genów wynik był granicznie istotny (odpowiednio $p=0.0269$, $p=0.0594$, $p=0.0530$). Rozpatrując natomiast korelację w podgrupach indywidualnie, w grupie NTNBC pacjentki z obecną metylacją *ITGA4* miały wyższą medianę wieku ($p=0.0362$). Różnica wieku obserwowana była pomiędzy grupą raka piersi a kontrolną, pierwsza z nich również wykazywała wyższą medianę wieku ($p=0.0316$). Nie stwierdzono natomiast wpływu metylacji na określone uwarunkowania kliniczno-patologiczne (stopień złośliwości histologicznej, rozmiar guza, stopień zajęcia węzłów chłonnych, obecność komponentu DCIS), jednakże brak metylacji *MGMT* obserwowano częściej u pacjentek z najwyższym stopniem złośliwości ($p=0.02555$). Analiza porównawcza dla podtypów nowotworu TNBC i NTNBC, również nie wykazała różnic pod względem wyżej wspomnianych czynników kliniczno-patologicznych. Z kolei na podstawie wyników analiz ekspresji, stwierdzono zależność zajęcia regionalnych

węzłów chłonnych od obniżonego poziomu ekspresji, przy czym korelacja ta była granicznie istotna ($p=0,05704$). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w poziomie ekspresji względem metylacji genu, wieku, parametrów klinicznych, czy podtypu molekularnego. Podczas doświadczalnego doboru genu referencyjnego do analiz ekspresji *MEG3*, stwierdzono, że gen podstawowego metabolizmu *GAPDH* jest znacząco obniżony w grupie TNBC ($p=0,0001$), został więc odrzucony jako gen referencyjny. Zatem względną ekspresję *MEG3* oceniano wobec *ACTB*.

Wnioski

Na podstawie wykonanych analiz można stwierdzić, że metylacja promotorów genów *BRCA1*, *ITGA4* oraz *MEG3* jest czynnikiem ryzyka raka piersi lub określonych jego podtypów. Ponadto wyższy wiek jest również czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju nowotworu oraz wpływającym dodatnio na pojawienie się metylacji genów *MGMT*, *ITGA4* oraz *MEG3*. Co więcej, analizy ekspresji ujawniły, że obniżona ekspresja *MEG3* wpływa na obecność przerzutów do węzłów chłonnych, a obniżona ekspresja *GAPDH* jest obserwowana w potrójnie ujemnym raku piersi.