

Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową

Komórki nowotworowe oprócz hipometylacji całego genomu charakteryzują się także specyficzną dla danego miejsca hipermetylacją regionów promotorowych wysp CpG. Wzór metylacji DNA jest nie tylko konsekwencją przyłączania grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji. Szlak aktywnej demetylacji DNA jest procesem wieloetapowym, w którym dochodzi do enzymatycznego usunięcia grupy metylowej z 5-metylocytozyny (5-mCyt) przy udziale białek TET, wycięcia i zastąpienia 5-mCyt prawidłową cytozyną na drodze naprawy przez wycinanie zasad, deaminacji 5-mCyt do tyminy czy wycięcia fragmentu oligonukleotydowego zawierającego 5-mCyt. Produkty aktywnej demetylacji 5-mCyt po usunięciu z DNA przez systemy naprawcze, mogą być uwalniane do krwiobiegu i ostatecznie wydalane z moczem.

Celem pracy było opracowanie metody pozwalającej na ilościową analizę poziomu epigenetycznych modyfikacji DNA w moczu i ocena ich przydatności jako potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer) i ostrej białaczki szpikowej (AML, ang. acute myeloid leukemia).

Wykorzystując technikę dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS, ang. two-dimensional ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry), dokonaliśmy optymalizacji warunków rozdzielania i detekcji, co pozwoliło na identyfikację oraz ilościowe oznaczenie w moczu zmodyfikowanych zasad azotowych: 5-hydroksymetylocytozynę (5-hmCyt), 5-formylocytozynę (5-fCyt), 5-karboksycytozynę (5-caCyt) oraz nukleozydów: 5-metylo-2'-deoksycytydynam (5-mdC), 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksycytydynam (5-hmdC), 5-(hydroksymetylo)-2'-deoksyurydynam (5-hmdU) i 8-oksy-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozynę (8-oksydG). Ze względu na to, że dla części analizowanych związków brakuje komercyjnie dostępnych wzorców, zdecydowaliśmy się na ich syntezę w naszym laboratorium.

Pierwszą grupę badaną stanowili pacjenci z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz pacjenci z zespołami mielodysplastycznymi (MDS, ang. myelodysplastic syndromes). W grupie chorych z AML zaobserwowano wyższe stężenia wszystkich zmodyfikowanych zasad azotowych i deoksynukleozydów w porównaniu do osób zdrowych. U pacjentów z MDS zaobserwowano również wyższe poziomy produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu

względem grupy kontrolnej. Stężenia 5-fCyt, 5-hmdC, i 5-hmUra w moczu osiągnęły podobne wartości u pacjentów z AML i MDS. Wydalanie z moczem w przypadku 5-hmCyt, 5-caCyt i 5-hmdU charakteryzowało się stopniowym wzrostem stężenia od grupy kontrolnej do MDS, a najwyższe poziomy zaobserwowano u pacjentów z AML. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu ROC (ang. receiver operating characteristic) pozwoliła na ocenę mocy diagnostycznej i zidentyfikowanie obiecujących biomarkerów rozwoju AML i MDS oraz transformacji MDS do AML. Najbardziej przydatne diagnostycznie do odróżnienia pacjentów AML od grupy kontrolnej okazały się stężenia 5-hmCyt i 5-hmdU w moczu, natomiast w przypadku pacjentów z MDS poziom 5-hmdC w DNA oraz 5-hmCyt w moczu. Wieloczynnikowe modele drzew klasyfikacyjnych pozwoliły na prawidłową klasyfikację pacjentów z AML i MDS w 95,7% i 94,7% przypadków. Największą wartość prognostyczną spośród analizowanych parametrów w przewidywaniu transformacji MDS w AML zaobserwowano dla 5-cadC oraz 5-hmdU w DNA.

Drugą grupę badaną stanowili pacjenci z rakiem jelita grubego (CRC), nieswoistą chorobą zapalną jelit (IBD, ang. inflammatory bowel disease) oraz osoby z polipami (AD, ang. adenoma). W moczu pacjentów z CRC i AD zaobserwowano znacząco niższy poziom 5-fCyt w porównaniu do grupy kontrolnej. Wydalanie z moczem 8-oksydG było istotnie wyższe w przypadku pacjentów z CRC i IBD. Poziom 5-hmCyt był istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej jedynie w grupie osób z CRC.

Słowa kluczowe: aktywna demetylacja DNA, biomarkery, mocz, ostra białaczka szpikowa, rak jelita grubego

Aleksandra Skalska-Bugajca
Rafał Różalski