



NADÁCIA VÝSKUM RAKOVINY
A ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ
ONKOLÓGIE SAV BRATISLAVA



SÚŤAŽ MLADÝCH ONKOLÓGOV

6.–7. MAREC 2012

ZBORNÍK PREDNÁŠOK



NADÁCIA VÝSKUM RAKOVINY
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLÓGIE SAV
VLÁRSKA 7, 833 91 BRATISLAVA

Zborník tvoria rozšírené abstrakty a abstrakty prác prezentovaných na Súťaži mladých onkológov 2012. Súťaž organizovala Nadácia Výskum rakoviny v spolupráci s Ústavom experimentálnej onkológie SAV pri príležitosti 6. Dňa výskumu rakoviny.

Názov: Zborník prednášok zo Súťaže mladých onkológov

Autori:

Baccarini Manuela, Bánovská Lucia, Catalanotti Federica, Dóč Otto, Ďuriníková Erika, Fedoročko Peter, Fridrichová Ivana, Halašová Erika, Hatok Jozef, Chandoga Ján, Imrich Ján, Janovec Ladislav, Jendželovský Rastislav, Jesenberger Veronika, Jurečeková Jana, Kajabová Viera, Kajo Karol, Kapinová Andrea, Kliková Katarína, Kovaľ Ján, Kozičs Katarína, Kožurková Mária, Krajčiová Ľubica, Kristian Pavol, Kriška Ján, Krivulčík Tomáš, Kubatka Peter, Kučerová Lucia, Lackovičová Ľubica, Matúšková Miroslava, Mikeš Jaromír, Mikešová Lucia, Mravec Boris, Papčová Zuzana, Pastoráková Andrea, Péč Martin, Petrovič Robert, Pivovarčíková Martina, Plšíková Jana, Račay Peter, Reyes Gloria X., Slováková Petra, Solár Peter, Srančíková Annamária, Stollárová Nadežda, Svoboda Filip, Šarlinová Miroslava, Šebová Katarína, Školeková Svetlana, Štefániková Andrea, Turčáni Peter, Ungvarský Ján, Valeková Barbora, Vargová Jana, Zmajkovičová Katarína, Zmetáková Iveta, Žihlavníková Katarína

Vydavateľ: Nadácia Výskum rakoviny
Vlárska 7
833 91 Bratislava
tel. 02/59327 216
www.nvr.sk

Zostavili: RNDr. Margita Klobušická, CSc., Ing. Jela Brozmanová, DrSc.,
RNDr. Soňa Čierniková, PhD., Mgr. Veronika Zahradníková

Recenzenti: RNDr. Jozef Bizík, DrSc., RNDr. Soňa Čierniková, PhD.,
Ing. Jela Brozmanová, DrSc.

Tlač: Tribun EU, s.r.o.
Cejl 892/32
602 00 Brno
Česká republika
www.librix.eu

© Nadácia Výskum rakoviny a Ústav experimentálnej onkológie SAV
Bratislava 2012

ISBN 978-80-970926-5-8



Potenciálne epigenetické markery pri rakovine prsníka

Viera Kajabová, Tomáš Krivulčík, Katarína Šebová, Iveta Zmetáková, Ivana Fridrichová

Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Úvod

Karcinóm prsníka je najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenie u žien. Podľa Národného centra zdravotníckych informácií, v poslednom štatisticky spracovanom roku 2006, bolo v Slovenskej republike diagnostikovaných 2264 prípadov rakoviny prsníka u žien [1]. V nádoroch prsníka boli identifikované rôzne mutácie v tumor supresorových génoch, onkogénoch, ako aj chromozómové abnormality. V súčasnosti už vieme, že pri vzniku nádorov zohrávajú dôležitú úlohu okrem genetických aj epigenetické zmeny. Epigenetické mechanizmy, ktoré zahŕňajú DNA metyláciu, modifikáciu histónov, a s tým súvisiacu prestavbu chromatínu, regulujú expresiu génov v bunke za fyziologických podmienok. Pri tumorigenéze je funkcia týchto mechanizmov narušená. Medzi dobre preštudované epigenetické zmeny patrí zvýšená metylácia promótorových oblastí, ktorá často zapríčiňuje utlmenie alebo inaktiváciu expresie daných génov. V doterajších štúdiách boli pri karcinóme prsníka objavené desiatky hypermetylovaných génov, ktoré sú zahrnuté v oprave DNA, v raste, proliferácii, adhézii, apoptóze buniek a kontrole bunkového cyklu [2]. V našej práci sa zameriavame na často metylované gény, ktoré môžu po epigenetickej inaktivácii zapríčiniť alebo stimulovať vznik agresívnych foriem karcinómov prsníka.

Zo štyroch analyzovaných génov sú gény *RASSF1A*, *CDH1* a *TIMP3* zodpovedné za adhéziu buniek a interakciu buniek s matrixom [3,4,5]. Inaktivácia týchto génov umožní uvoľnenie buniek, a tým podporuje invazivitu nádorových buniek a metastázovanie. Strata funkcie štvrtého študovaného génu *ESR1* môže podporiť neregulovanú proliferáciu buniek. Status estrogénového receptora má taktiež veľký význam pre určenie stratégie liečby karcinómu prsníka [6].

V prvej štúdii sme kvantifikovali metyláciu promótorových oblastí génov *RASSF1A* a *CDH1* v nádorovom tkanive pacientok s karcinómom prsníka a v periférnej krvi zdravých kontrol. V druhej rozpracovanej štúdii kvantifikujeme metyláciu v génoch *RASSF1A*, *CDH1*, *TIMP3* a *ESR1* nielen vo vzorkách nádorového tkaniva pacientok s karcinómom prsníka, ale aj v krvnej

plazme, v ktorej sa nachádza voľná DNA. Podľa výsledkov mnohých štúdií bolo potvrdené, že v plazme sú prítomné fragmenty DNA nádorového pôvodu, čo dokumentuje aj nález rovnakých metylačných profilov v nádorovej a voľnej DNA z plazmy. Hypermetylácia špecifických génov prítomná u onkologických pacientov sa u zdravých jedincov nevyskytuje, alebo len v nízkej frekvencii, preto sa javí štúdium metylácie génov v krvnej plazme ako sľubná metóda na identifikáciu nových epigenetických markerov [7].

Na základe výsledkov metylačných analýz v oboch uskutočnených štúdiách hľadáme korelácie s klinicko-patologickými parametrami. V druhej štúdií chceme preštudovať asociácie medzi metylačnými profilmi v nádorovej DNA a voľnej DNA z plazmy. Očakávame, že ak sa objaví metylácia v nádorovom tkanive v danom gène, vo väčšine prípadov zistíme metyláciu DNA aj plazme. Podľa získaných výsledkov chceme vybrať gény, ktoré môžu byť využité ako nové epigenetické markery pre identifikáciu nádorov prsníka s metastatickým potenciálom.

Materiál a metódy

Pacienti

V prvej štúdií sme analyzovali vzorky nádorového tkaniva v parafínových bločkoch od 92 pacientok s karcinómom prsníka zo slovenských zdravotníckych zariadení a vzorky periférnej krvi od 50 zdravých kontrol. V druhej štúdií máme k dispozícii nádorové tkanivo a krv od 150 pacientok a krv od 50 zdravých kontrol. Do analýz boli zahrnuté pacientky bez hereditárnej predispozície.

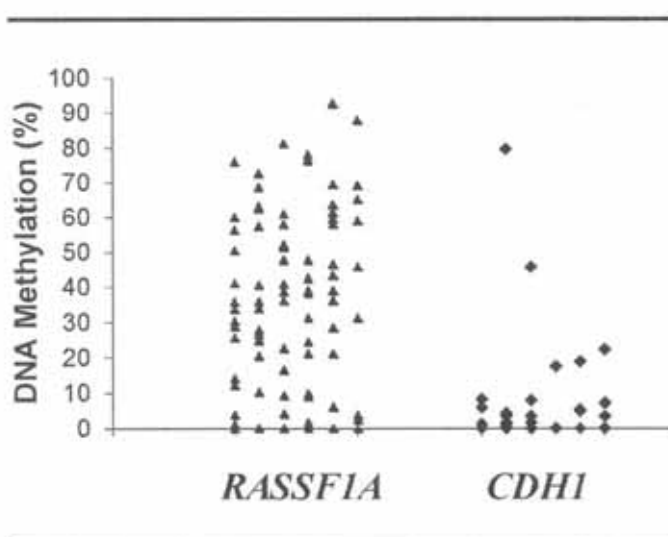
Metódy

Po odobratí periférnej krvi, je opakovanou centrifugáciou oddelená plazma od ostatných bunkových komponentov krvi. Následne izolujeme genomickú a plazmovú DNA. Z rezov parafínového bločku izolujeme nádorovú DNA. Pre metylačné analýzy je nevyhnutná modifikácia DNA bisulfidom sodným, pri ktorej sa špecificky modifikuje nemetylovaný cytozín na uracil, ktorý sa následne počas PCR amplifikácie mení na tymín, pričom metylovaný cytozín ostáva zachovaný. Na analýzu metylácie využívame v oboch štúdiách metódu kvantitatívnej multiplexnej metylačne špecifickej PCR (QM-MSP) [8]. V prvom kroku tejto reakcie uskutočňujeme multiplexnú ko-amplifikáciu viacerých génov v jednej PCR reakcii, pričom primery boli navrhnuté tak, aby komplementárne sekvencie pre primery neobsahovali CpG dinukleotidy, teda aby sa amplifikovali potrebné úseky DNA bez ohľadu na metylačný status templátu. Produkty prvej reakcie overujeme pomocou agarózovej elektroforézy. Ak je to potrebné, produkty riedime tak, aby vstupné množstvo DNA do ďalšej

reakcie neprevyšovalo 6 ng. V druhom kroku uskutočňujeme real-time PCR pre každý gén separátne, používame dve sady primerov a dva typy TaqMan prób, ktoré boli navrhnuté tak, aby boli komplementárne buď, k metylovanému alebo k nemetylovanému substrátu. Vzorky v QM-MSP reakcii vyhodnocujeme na základe štandardnej krivky, ktorú vytvoríme zmiešaním produktov prvej PCR reakcie komerčnej univerzálne metylovanej a nemetylovanej DNA so známou koncentráciou v pomere 1:1, a sériou šiestich riedení až do 1:10⁶. Percento metylácie jednotlivých patientských vzoriek pre každý gén potom vypočítame na základe vzorca $[M/(U+M)] \times 100$, použitím štandardnej krivky. U je množstvo nemetylovaného substrátu v bode treshold-u a M je množstvo metylovaného substrátu v bode treshold-u. Treshold predstavuje hranicu citlivosti použitej metodiky, prahový cyklus, v ktorom signifikantné zvýšenie intenzity signálu substrátu je už prístroj schopný zaznamenať a prevyšuje intenzitu fluorescenčného pozadia.

Výsledky a diskusia

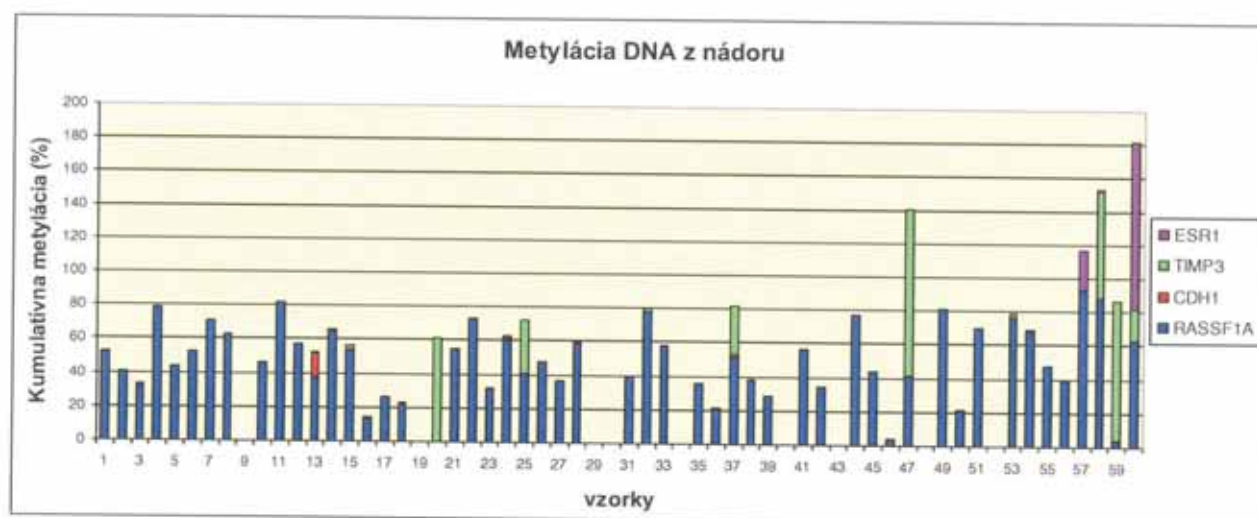
V prvej štúdii sme analyzovali hladinu metylácie promótorových oblastí génov *RASSF1* a *CDH1* v nádorovom tkanive 92 pacientiek a v periférnej krvi 50 zdravých kontrol. Metyláciu *RASSF1A* génu sme objavili u 76 (82,6%) pacientok v rozsahu 1,20 až 92,63%. Metylácia *CDH1* génu sa vyskytla u 20 (21,7%) pacientok v rozsahu 1,20 až 79,62%. Frekvencia metylácie génov *RASSF1A* a *CDH1* v nádorovom tkanive je graficky znázornená na obrázku č.1.



Obr. č. 1: Hladiny metylácie promótorov génov *RASSF1A* a *CDH1* u 76 a 20 pacientok s karcinómom prsníka

Po korelácii výsledkov s klinicko-patologickými parametrami, sme zaznamenali zvyšujúci sa trend metylácie *RASSF1A* génu pri veľkosti nádoru, statuse lymfatických uzlín a TNM klasifikácii nádoru. Pri *CDH1* géne sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi podskupinami pacientov s rôznym počtom pozitívnych lymfatických uzlín a v imunohistochemických subtypoch ($p\text{-value} < 0,1$). Tak ako sme očakávali, u kontrolnej skupiny sa metylácia daných génov neobjavila, alebo len na veľmi nízkej úrovni, maximálne do 0,35%. Relatívne stabilne vysoká metylácia *RASSF1A* génu sa vyskytovala v rôznych štádiách ochorenia bez ohľadu na sledované klinické parametre, preto ju môžeme považovať za univerzálny marker pri tomto type rakoviny. Zistený štatisticky významný rozdiel pri metylácii *CDH1* génu, medzi podskupinami pacientiek s rôznym počtom pozitívnych lymfatických uzlín, naznačuje využitie takejto špecifickej metylácie na identifikáciu potenciálne metastazujúcich nádorov prsníka [9].

V druhej rozpracovanej štúdii skúmame frekvenciu metylácie promótorových oblastí vybraných 4 génov *RASSF1A*, *CDH1*, *TIMP3* a *ESR1*. Na rozdiel od prvej štúdie analyzujeme okrem nádorovej DNA aj genomickú a plazmovú DNA pacientok. Dosiaľ sme spracovali vzorky od 60 pacientok. Metyláciu v uvedených génoch sme zaznamenali v nádorovom tkanive u 50, 3, 10 a 4 pacientok. Najčastejšie sa vyskytovala metylácia génu *RASSF1A*. U niektorých pacientok sa vyskytla metylácia viacerých analyzovaných génov, čo možno vidieť na grafe kumulatívnej metylácie (obr. č. 2). Asociáciu identifikovaných metylačných profilov so štádiom ochorenia posúdime po štatistickom spracovaní ich korelácií s klinicko patologickými parametrami.



Obr. č. 2: Kumulatívna metylácia génov *RASSF1A*, *CDH1*, *TIMP3* a *ESR1* v 60 analyzovaných vzorkách nádorovej DNA od pacientok s karcinómom prsníka.

Predmetom ďalšieho štúdia je zistiť, u akého množstva pacientok, ktoré nesú metyláciu jednotlivých génov v nádorovom tkanive, objavíme metyláciu aj vo voľnej DNA z plazmy. Na základe parciálnych výsledkov sme zistili, že z 50 pacientok, ktoré niesli metyláciu *RASSF1A* génu v nádore, 23 vykazovalo metyláciu aj vo voľnej DNA z plazmy. Pri metylácii *TIMP3* génu to boli štyri pacientky z desiatich.

Po spracovaní celého súboru 150 pacientok budeme získané výsledky korelovať s klinicko-patologickými parametrami ochorenia. Na základe analýz chceme identifikovať gény, ktoré by mohli byť využité ako epigenetické markery pre identifikáciu agresívnych typov karcinómu prsníka a mohli by byť testované vo vzorkách krvnej plazmy. Objavenie vhodných markerov by mohlo pomôcť k presnejšej diagnóze a prognóze ochorenia, následne k zlepšeniu kvality života pacientov a taktiež aj k zníženiu finančných nákladov na liečbu.

Táto štúdia je výsledkom implementácie projektu č. APVV-0076-10 financovanom Agentúrou na podporu výskumu a vývoja, projektu č. 26240220058 (ITMS kód) na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, ktorý je financovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu č. 2/0065/10 podporenom Agentúrou VEGA.

Literárne zdroje

- [1] Diba CHS, Pleško I, Hlava P. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2006. Národné centrum zdravotníckych informácií. Vydavateľstvo NCZI, Bratislava 2010.
- [2] Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Ropero S, Fraga MF et al. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2006; 27(8): 1661-1669.
- [3] Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 3497-508.
- [4] Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001; 3(5): 289-293.
- [5] Chambers AF, Matrisian LM, Ambers A.F. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1260-1270.
- [6] Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 2012; 481(7381): 389-393.

- [7] Gormally E, Carbox E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 2007; 635(2-3): 105-117.
- [8] Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4442-4452.
- [9] Šebová K, Zmetaková I, Bella V, Kajo K, Stankovičová I. RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer. *Cancer Biomark* 2012, 10(1): 13-26.