

 Slovenská biologická
spoločnosť SAV

a



Ústav antropologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova Univerzita, Brno

Jaroslav Malina a Igor M. Tomo

BIOMEDICÍNSKE A GENETICKÉ ŠTÚDIE 2012

**Bratislava a Brno
2012**

Biomedicínske a genetické štúdie 2012

Editori: prof. PhDr. Jaroslav Malina, DrSc.
prof. RNDr. Igor M. Tomo, CSc, MPH

Vydala: Slovenská biologická spoločnosť SAV Bratislava
a
Ústav antropologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno

Recenzenti: prof. MUDr. Jozef Zlatoš, DrSc
doc. MUDr. Vojtech Ozorovský, CSc

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

ISBN 978-80-89451-07-4

Obsah

Editoriál	2
K nedožitej storočnici akademika Viliama Thurzu	3
1. Daniel Böhmer, Ján Luha, Tatiana Braxatorisová, Jana Malová: Vývoj priemerného veku matky a priemerného veku embrya/plodu v databáze Abortus	5
2. Petronela Bušíková, Dušan Daniš, Zoltán Szép: Črevná inervácia pri Crohnovej chorobe – imunohistochemické vyšetrenie. Enoláza špecifická pre neuróny	10
3. M. Čižmárová, L. Košťálová, A. Bóday, P. Tavares, L. Kovács, D. Ilenčíková: Charakteristika a genetická diagnostika syndrómov asociovaných s mutáciami v RAS-MAPK signálnej dráhe	14
4. Mária Csöbönyeiová, Štefan Polák, Ľuboš Danišovič: Indukované pluripotentné kmeňové bunky	19
5. Ľuboš Danišovič, Štefan Polák, Ivan Varga, Martin Boháč, Jozef Fedeleš, Marcela Kuniaková, Zuzana Varchulová Nováková, Daniel Böhmer: Izolácia a <i>in vitro</i> expanzia ľudských somatických kmeňových buniek z priečne pruhovaných svalov	23
6. Katarína Jenčíková, Elena Kukurová, Eva Jenčíková, Elena Ferencová: Súčasný stav vedomostí využívania prostriedkov IKT v podmienkach elektronizácie v lekárenskej praxi	28
7. Jana Konkoľová, Robert Petrovič, Mária Fischerová, Ján Chandoga, Daniel Böhmer: Poruchy v biogenéze peroxizómov	31
8. J. Lisyová, J. Chandoga, D. Böhmer, J. Štofko: Deficiencia pyruvát dehydrogenázového komplexu	35
9. Petra Lukáčiková, Daniela Siváková: Vybrané antropometrické charakteristiky žien zo Slovenska a ich asociácia s vekom	39
10. S. Mattošová, J. Chandoga: Fabryho choroba - liečiteľné genetické ochorenie. Molekulárna podstata, diagnostika a terapia	43
11. M. Mikulová, J. Chandoga: Farmakogenetický význam génu SLCO1B1 a jeho polymorfizmov	46
12. M. Ondrejková, I.M. Tomo, D. Böhmer, S. Barteková – Tomo: Frekvencia výskytu siamských dvojčiat vo svete a na Slovensku	50
13. Oliver Poór: Úroveň držania tela a svalovej rovnováhy u detí v predškolskom veku	55
14. Jana Rusnáková, Štefan Polák, Martin Boháč, Ľuboš Danišovič: Somatické kmeňové bunky - biologické vlastnosti a potenciál pre regeneráciu defektov artikulárnej chrupky a kostného tkaniva	58
15. Pavel Sýkora, Lukáč Halčák, Eva Gonçalvesová, Ivan Varga, Viera Ujlakyová, Dagmar Nováková, Helena Gbelcová, Vanda Repiská: Transplantácia srdca a paraoxonáza 1 – možné „pozadie“ koronárnej vaskulopatie	64
16. Jakub Vaňa, Roman Šmidák, Helena Gbelcová, Vanda Repiská: Molekulové prístroje na báze DNA	65
17. Zuzana Varchulová Nováková, Milan Timko, Anežka Hashim, Matúš Molčan, Marcela Kuniaková, Daniel Böhmer, Ľuboš Danišovič: Biologická charakterizácia bakteriálnych magnetických nanočastíc	69
18. S. Vrbová, D. Ilenčíková: Hereditárne rachitídy – historické, biologické a genetické podklady krivice	72
19. Iveta Zmetáková, Ľudovít Danihel, Božena Smolková, Viera Kajabová, Tomáš Krivulčík, Vanda Repiská, Igor Rusňák, Ivana Fridrichová: Využitie pyrosekvenovania pre štúdium potenciálnych epigenetických markerov pri karcinóme prsníka	75
20. A. Zummerová, J. Šidlo, R. Kuruc, D. Valent, D. V. Repiská: Význam prehliadky a pitvy mŕtveho tela	78

Využitie pyrosekvenovania pre štúdium potenciálnych epigenetických markerov pri karcinóme prsníka

Iveta Zmetáková¹, Ľudovít Danihel², Božena Smolková¹, Viera Kajabová¹, Tomáš Krivulčík¹, Vanda Repiská³, Igor Rusňák⁴, Ivana Fridrichová¹

¹Laboratórium genetiky nádorových ochorení, Ústav experimentálnej onkológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava; ²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava; ³Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava; ⁴Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Abstrakt

Expresia mnohých génov je inaktivovaná DNA hypermetyláciou, ktorá by mohla byť využitá pre identifikáciu nových epigenetických faktorov. Na posúdenie vzťahu medzi DNA metyláciou a progresiou karcinómu prsníka sme analyzovali DNA metyláciu pyrosekvenovaním u 11 pacientok s karcinómom prsníka a u 11 zdravých žien. Predbežné výsledky indikujú možný vzťah DNA metylácie v niektorých nami študovaných génoch s invazivitou a metastázovaním.

Kľúčové slová: karcinóm prsníka, DNA metylácia, pyrosekvenovanie, imunohistochemia

Summary

Expression of many genes is inactivated by DNA hypermethylation, which could be utilized for identification of new epigenetic biomarkers. We analysed DNA methylation from 11 breast cancer patients and from 11 controls by pyrosequencing to investigate association between DNA methylation and breast cancer progression. Preliminary results indicate the association of DNA methylation changes in several genes with invasive and metastatic processes.

Key words: breast cancer, DNA methylation, pyrosequencing, immunohistochemistry

Úvod

Karcinóm prsníka je najčastejšie nádorové ochorenie u žien predstavujúce 28,2% zo všetkých malignít, ktoré je zapríčinené akumuláciou nielen genetických, ale aj epigenetických abnormalít. Posledné uvedené zahŕňujú hyper- a hypometylácie DNA, ako aj zmenenú modifikáciu histónov s následnou remodeláciou chromatinu (1). Hypermetylácie DNA v promótorových oblastiach génov zapríčiňujú inhibíciu génovej expzie. Tieto epigenetické zmeny boli objavené v mnohých génoch aj pri nádoroch prsníka (2), preto by mohli byť využité ako nové markery pri vyhľadávaní agresívnych foriem tohto ochorenia. V našej práci sme študovali vzťah medzi hladinou DNA metylácie a progresiou karcinómu prsníka pomocou kvantitatívnej analýzy DNA metylácie v 10 génoch (*APC*, *ADAM23*, *CDH1*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGRB*, *RASSF1A*, *SYK*, *SOCS1* a *TIMP3*) (3-6).

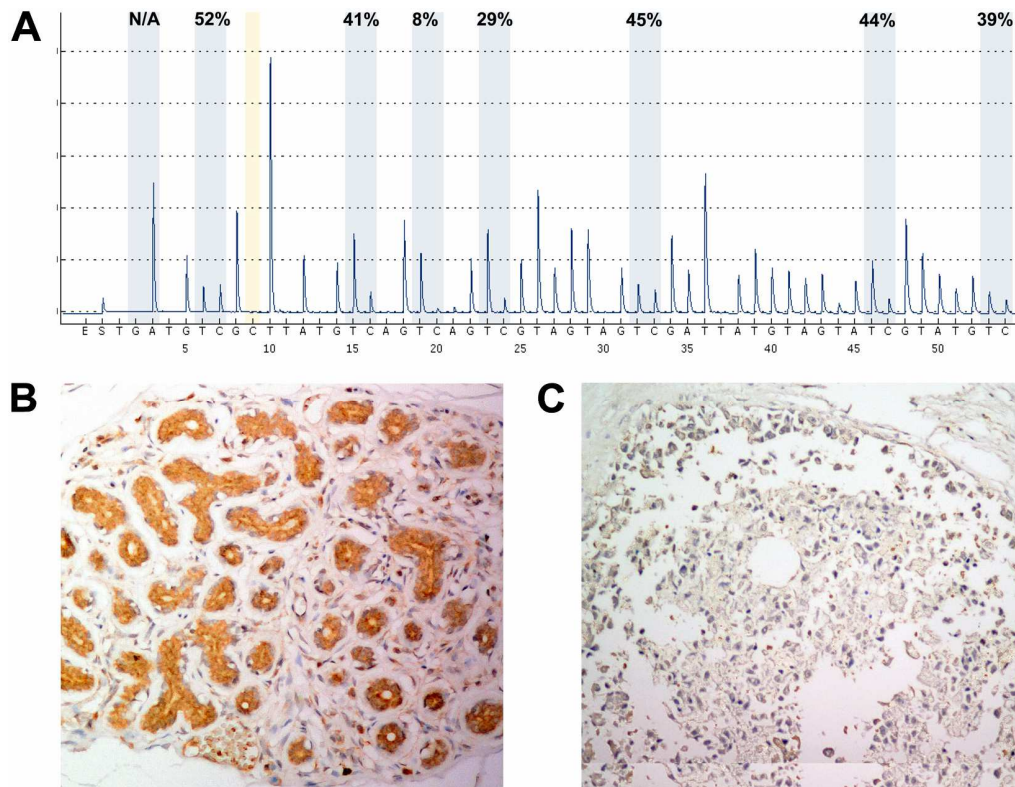
Materiál a metódy

DNA metyláciu v uvedených génoch sme analyzovali u 11 pacientok s karcinómom prsníka a u 11 zdravých žien metódou kvantitatívneho sekvenovania – pyrosekvenovania. DNA sme izolovali z parafínových bločkov tkanív nádoru a lymfatických uzlín, ako aj z lymfocytov periférnej krvi. Vyizolovanú DNA sme modifikovali bisulfidom sodným a hladinu DNA metylácie sme stanovili pyrosekvenovaním. Asociácie medzi metylačnými profilmi a klinicko-patologickými parametrami sme štatisticky vyhodnotili SPSS 15.0 softvérom. Imunohistochemické farbenie sme uskutočnili pomocou EnVision systému (Dako, Glostrup, Denmark).

Výsledky

Z desiatich analyzovaných génov boli najčastejšie hypermetylované gény *RASSF1A* (8/11), *APC* a *ADAM23* (6/11). Zriedkavejšiu metyláciu sme našli v génoch *ESR1* a *CXCL12* (4/11), *TIMP3* (3/11), *SYK*, *SOCS1* a *PGR B* (1/11). Gény pre estrogénový aj progesterónový receptor boli hypermetylované u jednej z troch pacientok s negatívnymi hormonálnymi receptormi. V prípade 56 ročnej ženy s duktálnym invazívnym karcinómom, stupňom diferenciacie nádoru (grading) 3, TNM štádiom IIIC, s negatívnymi hormonálnymi receptormi a s 41 pozitívnymi lymfatickými uzlinami boli

gény *APC*, *ADAM23*, *CXCL12*, *RASSF1A* a *TIMP3* hypermetylované v rozsahu 27-86%. Inhibícia expresie proteínu *CXCL12* u tejto pacientky je potvrdená imunohistochemickým vyšetrením (obr.1). Metylačné “pozadie” v kontrolnej skupine zdravých žien sa v prípade génov *APC*, *ADAM23*, *CXCL12*, *ESR1*, *RASSF1A*, *SYK*, *SOCS1* a *TIMP3* pohybovalo do 3%, a u génov *CDH1* a *PGR B* v rozsahu 7 až 12%. V skupine zdravých kontrol bola zistená štatisticky významná pozitívna korelácia medzi vekom a hladinou metylácie v génoch *CDH1* a *PGR B*. Tieto skutočnosti je potrebné brať do úvahy pri hodnotení výsledkov DNA metylácie.



Obr. 1: Asociácia medzi DNA metyláciou promótorovej oblasti génu *CXCL12* a inhibíciou proteínovej expresie u 56 ročnej pacientky s DIC

A Pyrogram génu *CXCL12*. Priemerná DNA metylácia v nádore - 39%. **B** Zdravé tkanivo prsníka. Imunohistochemické farbenie s protilátkou proti *CXCL12* (Lifespan Biosciences). Zväčšenie 350x. **C** Karcinóm prsníka. Imunohistochemické farbenie s protilátkou proti *CXCL12* (Lifespan Biosciences). Zväčšenie 350x.

Záver

Novozavedená metóda pyrosekvenovania predstavuje vhodnú a reprodukovateľnú metódu na kvantifikáciu DNA metylácie u onkologických pacientov. Predbežné výsledky indikujú možnú asociáciu DNA metylácie v niektorých nami študovaných génoch s invazivitou a metastázovaním. Výsledky sú súčasťou rozsiahlejšej metylačnej štúdie, ktorej cieľom je, na základe korelovania výsledkov pyrosekvenovania, imunohistochemických analýz a klinicko-patologických parametrov, identifikovať nové epigenetické biomarkery vhodné pre identifikáciu nádorov prsníka s metastatickým potenciálom.

Podakovanie

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.

Použitá literatúra

1. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002; 3: 415-28.
2. Hinshelwood RA, Clark SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J Mol Med*, 2008; 86:1315-28.
3. Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S, Huang M, Liu J, Sahin AA, Hunt KK, Bast RC Jr, Shen Y, Issa JP, Yu Y. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res.*, 2007; 9(4): 57-70.
4. Costa FF, Verbisck NV, Salim ACM, Ierardi DF, Pires LC, Sasahara RM, Sogayar MC, Zanata SM, Mackay A, O'Hare M, Soares F, Simpson AJG, Camargo AA. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene*, 2004; 23: 1481–1488.
5. Ramos EAS, Camargo AA, Braun K, Slowik R, Cavalli IJ, Ribeiro EMSF, de O Pedrosa F, de Souza EM, Costa FF, Klassen G. Simultaneous *CXCL12* and *ESR1* CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer*, 2010; 10: 23-36.
6. Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, 2008; 9(12): 1879–1902.