

Zmiany wzoru metylacji wysp CpG promotorów genów kodujących proteazy z rodziny ADAM(TS) w sporadycznym raku jelita grubego.

Streszczenie

Prowadzone już od dekad badania nad etiopatogenezą nowotworów jelita grubego (RJG) wskazują na coraz to inne mechanizmy molekularne mogące leżeć u podstaw kancerogenezy. Badania przypadków sporadycznego RJG wykazały wpływ dużych mutacji, takich jak utrata heterozygotyczności lub niestabilność mikrosatelitarna oraz mutacji punktowych wielu genów pełniących funkcję supresorową lub będących onkogenami. Obok zjawisk zmieniających kod genetyczny raportowane są również zmiany mogące wpływać na jego ekspresję, takie jak zmiany upakowania chromatyny oraz zmiany wzoru metylacji wysp CpG w obrębie sekwencji promotorowych wielu genów w tym kodujących metaloproteiny z rodziny ADAM i ADAMTS, zwane również adamalizinami, należące do ważnej grupy białek macierzy. Jak wykazano, na aktywność adamalizyn mogą wpływać zarówno zmiany genetyczne, jak i epigenetyczne.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań statusu metylacyjnego promotorów czterech genów z rodziny ADAMTS: *ADAMTS1*, *ADAMTS2*, *ADAMTS5*, *ADAMTS18* i jednego promotora genów z rodziny ADAM: *ADAM12*, które zostały wyselekcjonowane z użyciem techniki mikromacierzy metylacyjnej u pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita grubego. Analizy przeprowadzono na 136 próbkach tkanek pierwotnego sporadycznego RJG i 110 próbkach tkanki zdrowej uzyskanych od pacjentów ze sporadycznym RJG.

Do oceny statusu metylacyjnego pięciu wybranych adamalizyn, wykorzystano metodą PCR specyficzną dla sekwencji metylowanych (MSP), a uzyskane wyniki zostały przeanalizowane pod kontem częstości występowania zjawiska hipermetylacji w poszczególnych epigenotypach CIMP oraz korelacji ze znanymi markerami molekularnymi (mutacje *BRAF* i *KRAS*, utrata heterozygotyczności i niestabilność mikrosatelitarna) oraz dane kliniczne (płeć i lokalizacja guza).

Analiza wyników badań MSP wykazała, iż częstotliwość metylacji promotora *ADAMT1*, *ADAMTS2* i *ADAM12* była wyższa w komórkach nowotworowych w porównaniu z tkanką zdrową pobraną od tych samych pacjentów. Analiza statystyczna wykazała również korelację między metylacją promotorów wybranych genów, a wybranymi markerami molekularnymi i cechami klinicznymi. Wykazano, iż zmiana wzoru metylacji *ADAMTS2* koreluje z proksymalną lokalizacją guza, częstością mutacji *KRAS* i epigenotypem IME. Natomiast zmiana wzoru metylacji *ADAMTS5* koreluje z epigenotypem IME oraz częściej występuje u kobiet, *ADAM12* występuje częściej u pacjentów z epigenotypem CIMP+ oraz pacjentów z mutacją w genie *BRAF*.

Podsumowując, badania wykazały statystycznie istotną różnicę między częstością występowania metylacji promotorów wybranych genów w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką zdrową oraz korelację z metylacją promotorów wybranych genów ze znanymi markerami molekularnymi oraz danymi klinicznymi. Wyniki te mogą sugerować, iż adamalizyny odgrywają ważną rolę w etiopatogenezie RJG.

Abstract

Carried out for decades research on the colorectal cancer (CRC) etiopathogenesis indicates more and more new molecular mechanisms that may underlie CRC carcinogenesis. Studies of sporadic CRC have shown the effect of large mutations, such as loss of heterozygosity or microsatellite instability, point mutations in many suppressor or oncogenous genes. In addition to the genetic code changing phenomena, changes that may effect on gene expression were also reported. Phenomenes such as changes in chromatin structure and the CpG island methylation pattern within the promoter sequences of many genes were found, including those encoding proteins from the ADAM and ADAMTS family. Mentioned proteins also called adamalysins belonging to an important group of matrix proteins. Both genetic and epigenetic changes can influence the activity of adamalysins.

This dissertation presents the results of studies on methylation status of four *ADAMTS*: *ADAMTS1*, *ADAMTS2*, *ADAMTS5*, *ADAMTS18* and one ADAM: *ADAM12* genes promoter, which were pre-selected using microarray techniques in sporadic colorectal cancer. The analyzes were performed on 136 primary sporadic CRC tissue samples and 110 healthy tissue samples obtained from patients with sporadic CRC.

To assess the methylation status of five selected adamalysins, the methylation-specific PCR (MSP) technique was used, and the obtained results were analyzed for the frequency of hypermethylation in individual CIMP epigenotypes and correlation with known molecular markers (BRAF and KRAS mutations, loss of heterozygosity, instability microsatellite) and clinical data (sex, tumor location).

MSP analysis shows that the frequency of promoter methylation of ADAMT1, ADAMTS2 and ADAM12 was significantly higher in tumor cells compared with matching normal tissue. We also show an association between methylation status of chosen genes and molecular and clinical features as follow: ADAMTS2 (proximal tumor localization, KRAS mutation and IME epigenotype), ADAMTS5 (IME epigenotype and is more common in female), ADAM12 (BRAF mutation and CIMP+ epigenotype).

In conclusion, the results of our study show a statistically significant difference between promoter methylation in cancerous and healthy tissue and a correlation of the selected genes promoters methylation with known molecular markers and clinical data. These results support the hypothesis that the adamalysins' family has an important role in the CRC etiopathogenesis.