

Rola czynników epigenetycznych w etiopatogenezie atrezji przełyku.

WSTĘP: Wrodzone zarośnięcie przełyku (EA) jest najczęstszą malformacją górnego odcinka przewodu pokarmowego. EA powstaje na skutek zaburzenia różnicowania tchawicy i przełyku z jelita przedniego na wczesnym etapie embriogenezy. Częstość występowania wady szacuje się na 1:3000-4100 urodzeń. EA częściej obserwuje się u chłopców oraz w ciążyach bliźniaczych. Przyczyna izolowanej postaci EA pozostaje nieznana, pod uwagę jest brana etiologia wieloczynnikowa, w tym epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów.

CEL PRACY: Celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat czynników epigenetycznych pod postacią zmienności wzoru metylacji jako przyczyny występowania wad wrodzonych na przykładzie EA, jako izolowanej wady o nieustalonej dotąd etiologii.

MATERIAŁ I METODY: Badaniem objęto 6 par bliźniąt (3 pary homozygotyczne, 3 pary heterozygotyczne), wśród których jedno z dzieci było urodzone z EA jako wadą izolowaną, drugi bliźniak był dzieckiem zdrowym. Za materiał posłużyły próbki DNA wyizolowane z krwi oraz wycinka tkanki przełyku dziecka z EA, oraz krwi bliźnięcia zdrowego. W toku badań molekularnych wykonano badanie metodą aCGH (badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy) wykluczając aberracje liczbowe oraz strukturalne jako przyczynę występowania wady. Do analizy metylomu w skali całogenomowej wykorzystano technikę RRBS (ang. Reduced-representation bisulfite sequencing). Przeprowadzono analizy biostatystyczne uzyskanych wyników.

WYNIKI: Do znalezienia znamienych różnic w metylomie użyto danych opartych ok. 950 000 dinukleotydów CpG zlokalizowanych w ok. 60 000 wysp CpG. Analizy były skupione na porównaniu profili metylacji wysp CpG pomiędzy pacjentami z EA, a ich zdrowym rodzeństwem. Stwierdzono hipermetylację 249 wysp CpG w promotorach 227 genów oraz hipometylację 81 wysp CpG w promotorach 79 genów. W przeanalizowanym materiale nie stwierdzono znaczących różnic w hipermetylacji i hipometylacji w obrębie promotorów genów opisywanych w literaturze jako mogące brać udział w patogenezie atrezji przełyku. Analiza wzbogaceń ścieżek wykazała statystycznie znaczący udział 10 hipermetylowanych genów w ścieżce Rho GTPase, dotychczas nieopisywanych w patogenezie EA (*ARHGAP36*, *ARHGAP4*, *ARHGAP6*, *ARHGEF6*, *ARHGEF9*, *FGD1*, *GDII*, *MCF2*, *OCRL* i *STARD8*).

WNIOSKI: Technika RRBS przy użyciu dobrych jakościowo próbek DNA dostarcza dużej ilości danych, w postaci dokładnej charakterystyki metylomu badanej tkanki, których analiza może być użyteczna w poszukiwaniu epigenetycznych przyczyn wad wrodzonych o dotychczas nieustalonej etiologii. Hipermetylacja genów biorących udział w ścieżce Rho GTPase może wskazywać na jej znaczenie w patofizjologii powstawania EA.

Role of epigenetic factors in etiopathogenesis of esophageal atresia.

Congenital esophageal atresia (EA) is the most common malformation of the upper gastrointestinal tract. EA occurs due to the disruption of foregut differentiation in the early stages of embryogenesis. The estimated incidence of this condition is 1 in 3000-4100 births. EA is more frequently observed in boys and in twin pregnancies. The exact cause of isolated EA remains unknown, although a multifactorial etiology, including epigenetic gene expression modifications, is considered.

AIM OF THE STUDY: The aim of this study was to expand knowledge about epigenetic factors, specifically methylation pattern variations, as a cause of congenital malformations using EA as an example an isolated defect with an undetermined etiology to date.

MATERIALS AND METHODS: The study included 6 pairs of twins (3 pairs of monozygotic twins, 3 pairs of dizygotic twins) in which one child was born with EA as an isolated defect, while the other twin was healthy. DNA samples were obtained from the blood and esophageal tissue biopsy of the child with EA, as well as from the blood of the healthy twin. Molecular analysis included aCGH (array comparative genomic hybridization) to exclude numerical and structural aberrations as a cause of the defect. The RRBS technique (Reduced-Representation Bisulfite Sequencing) was employed for Whole-Genome methylation analysis. Biostatistical analyses were performed on the obtained results.

RESULTS: To identify significant differences in methylation, data based on 950 000 CpG dinucleotides located in 60 000 CpG islands were used. The analyses focused on comparing CpG island methylation profiles between patients with EA and their healthy siblings. Hypermethylation of 249 CpG islands in the promoters of 227 genes and hypomethylation of 81 islands in the promoters of 79 genes were observed. No significant differences in hypermethylation and hypomethylation were found within the promoters of genes described in the literature as potentially involved in the pathogenesis of esophageal atresia. Pathway enrichment analysis revealed the statistically significant involvement of 10 hypermethylated genes in the Rho GTPase pathway, previously undescribed in the pathogenesis of EA (*ARHGAP36*, *ARHGAP4*, *ARHGAP6*, *ARHGEF6*, *ARHGEF9*, *FGD1*, *GDII*, *MCF2*, *OCRL*, and *STARD8*).

CONCLUSIONS: RRBS technique, using high-quality DNA samples, provides a substantial amount of data representing the majority of the methylation profile of the examined tissue. The analysis of these data may be useful in searching for epigenetic causes of congenital malformations with previously undetermined etiology. Hypermethylation of genes involved in the Rho GTPase pathway may indicate its significance in the pathophysiology of EA.