

DNA methylační analýza v plicních nádorech

**Anna Mészárosová¹, Miloš Pešek², Lucie Benešová¹,
Andrea Krajčová¹, Marek Minárik¹**

¹ Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (GEGES) a
Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International,
Praha

² Klinika tuberkulózy a nemocí respiračních, Fakultní nemocnice Plzeň

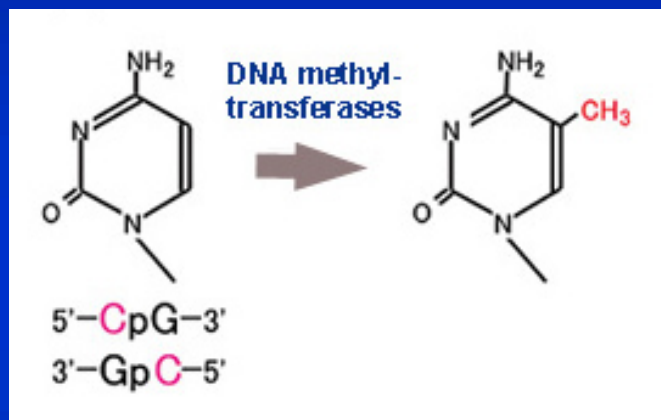
Úvod

Methylace DNA

- epigenetický proces (nemendelovská dědičnost)
- hlavní funkce je kontrola genové exprese pomocí inhibice
- chemická modifikace DNA zejména v 5'-regulačních oblastech genů
- hraje důležitou roli v biologii nádorových onemocnění, virových onemocnění, inaktivaci X chromozomu, aj.

Methylace DNA

- navázání CH_3 skupiny na cytozin, který sousedí s guaninem (CpG dinukleotid) za působení DNA metyltransferáz

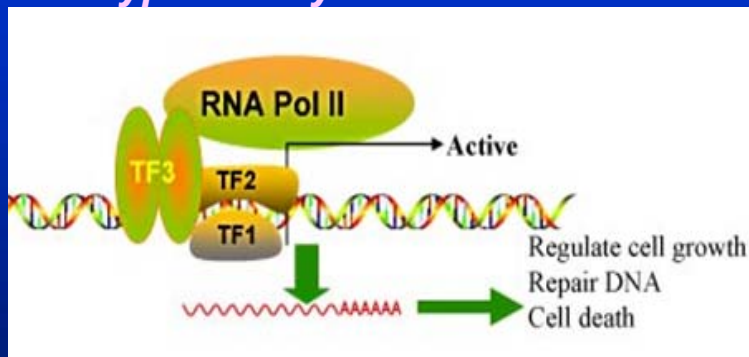


- v lidském genomu je **frekvence CpG nízká**, většina methylována
- výjimkou jsou **CpG ostrůvky** oblasti 300 – 3000 bp, většina z nich nemethylována zahrnují zhruba **1 % genomu**

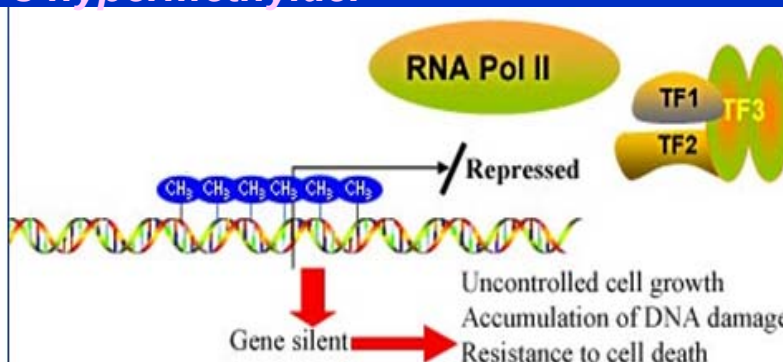
Hypermethylace CpG ostrůvků

- CpG ostrůvky se nacházejí zejména v promotorech genů, tedy oblastech, na které se vážou transkripční faktory (TF) aktivující jejich expresi a následnou syntézu proteinů
- hypermethylace CpG ostrůvků znemožňuje vazbu TF a dochází tak k inhibici exprese příslušného genu

bez hypermethylace



s hypermethylací



Hypermethylace a nádorová onemocnění

- změny v methylaci DNA mohou být rozhodující **pro vznik nádorových onemocnění**
- hypermetylace CpG ostrůvků **v promotorech tumor supresorových genů** → inhibice jejich transkripce → **nekontrolovaný růst a dělení buněk** → nádorové bujení

Hypermethylace a nádorová onemocnění

- hypermethylace promotorů v nádorech pozorována u širokého spektra tumor supresorových genů regulujících

buněčný cyklus – CDKN2A/p16

reparaci DNA – BRCA1, MGMT

apoptózu – DAPK, TMS

a další

- některé geny methylovány v různých nádorových tkáních (RASSF1A, CDKN2A/p16), jiné jsou specifické pro konkrétní nádory

Hypermethylace u nádorů plic

- popsáno více než 40 hypermethylovaných genů, nejčastěji studované jsou:

CDKN2A/p16, RASSF1A, DAPK, RARb, MGMT, FHIT, APC, CDH1 a CDH13

- souvislost s typem nádoru, prognózou, odpovědí na léčbu, kuřáctvím/nekuřáctvím

Hypermethylace u nádorů plic

- využití detekce hypermethylace v periferní krvi jako markeru pro **časný záchyt** karcinomu nebo jeho recidivy
- **odhad prognózy** onemocnění/rizika recidivy
- **zvýšení efektivity chemoterapie** po podávání inhibitorů methylace (Decitabin, Hydralazin)

Detekce methylace

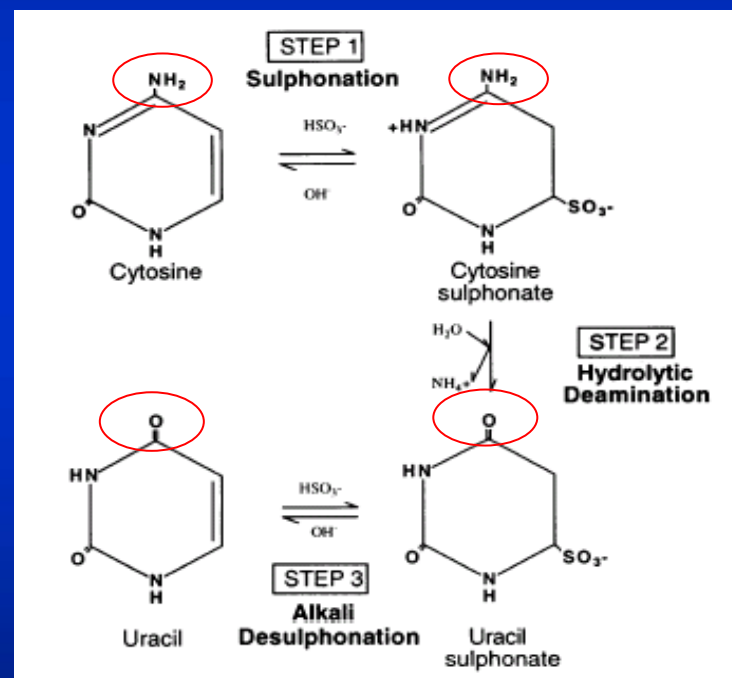
Analýza konvertované DNA



- konverze DNA bisulfitem sodným –
tzv. **bisulfitická reakce** →

→ **deaminace** nemetylovaných
cytozinů na uracily

- metylované cytosiny zůstávají
nezměněny



Detekce methylace

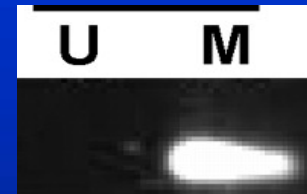
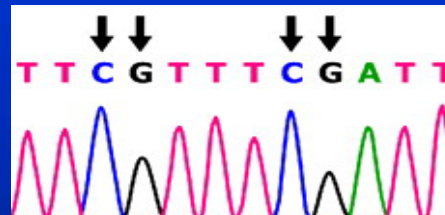
Analýza konvertované DNA

1) Sekvenační analýzou

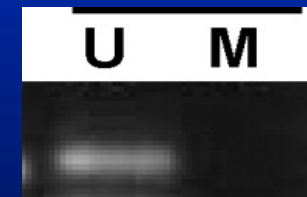
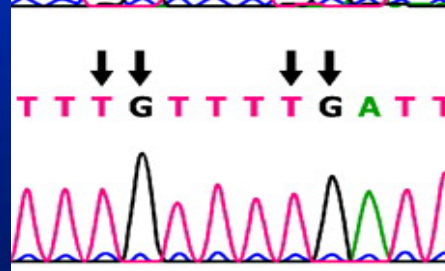
detekce **metylovaných** Cytozinů jako **Cytoziny** / nemetylované Cytoziny jako **Tyminy**

2) Sekvenčně specifickou PCR tzv. MSP (methylačně specifická PCR)

metylovaná DNA



nemetylovaná DNA



Detekce methylace

Analýza konvertované DNA

- **Sekvenační analýza**

přímá detekce, možnost analýzy jednotlivých CpG dinukleotidů v amplifikovaném úseku

vysoké nároky na množství a kvalitu DNA

- **MSP (methylačně specifická PCR)**

dva páry primerů specifických pro methylovanou/nemethylovanou DNA

levná a rychlá metoda

menší nároky na kvalitu a množství DNA

detekce CpG pouze v oblasti primerů

Detekce methylace

Využití methylačně senzitivní restriktázy

- použití enzymu, který **specificky rozeznává sekvence** obsahující CpG dinukleotidy,
- restriktáza rozeznává pouze **nemethylovanou DNA**



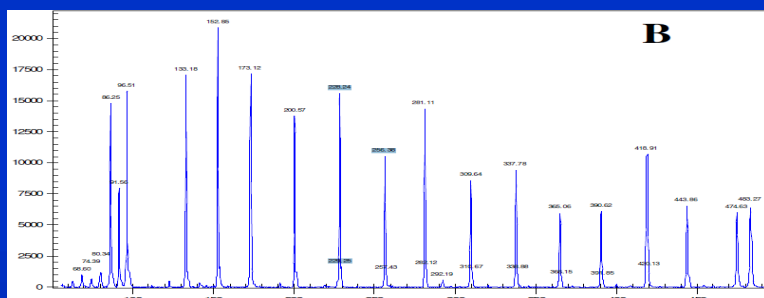
- není nutná konverze DNA

Detekce methylace

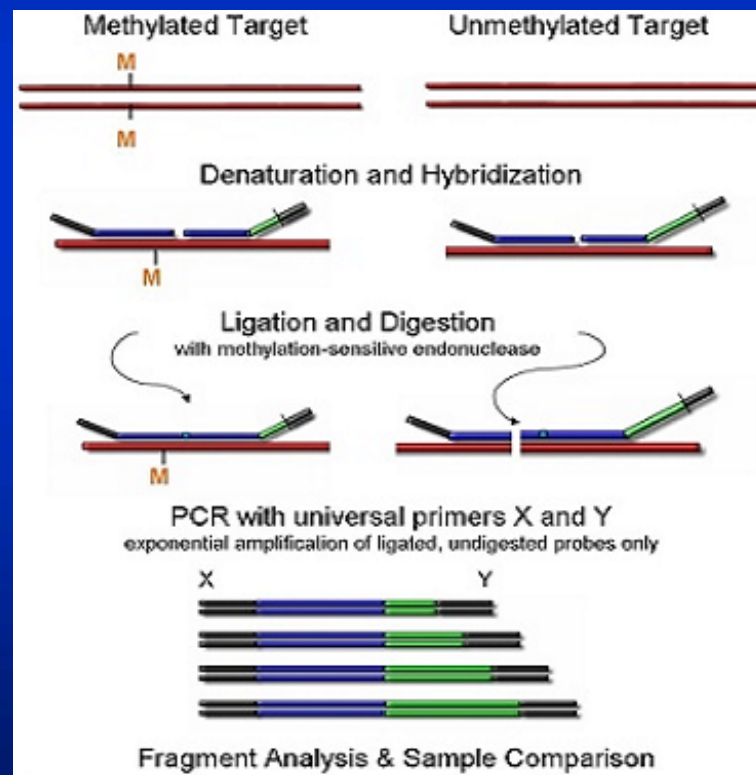
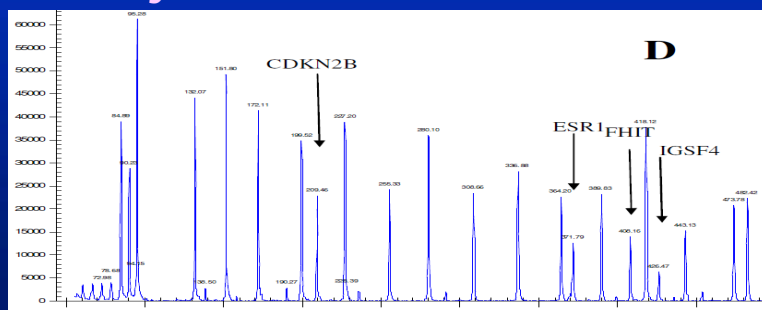
Využití methylačně senzitivní restriktázy

- detekce methylace metodou **MLPA** (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

nemethylovaná DNA



methylovaná DNA



Detekce methylace

Naše zkušenosti s metodikou

- při konverzi DNA dochází k jejím velkým ztrátám a degradaci
↓
- sekvenování často neúspěšné z důvodu vysokých nároků na kvalitu a množství DNA
- MSP je sice poměrně levná, rychlá a nenáročná na množství a kvalitu vstupní DNA, výsledky jsou ale nereprodukovatelné
- analýza metodou MLPA s restričním štěpením je dobře fungující metoda, která není příliš náročná na množství vstupní DNA (≥ 5 ng) a její výsledky jsou zcela reprodukovatelné

Výsledky

Přehled vzorků a genů

- celkem vyšetřených vzorků: 156
- typy vzorků: cytologická sklíčka (126)
parafínové bločky (30)
- úspěšných analýz: 120
- analyzované geny: APC, CDKN2A/p16, RASSF1A,
CDH13, MGMT, CHFR, RARB
- použitá metoda: MLPA

Výsledky

Přehled výsledků

- methylace **v žádném** ze sledovaných genů: **35 vzorků (29 %)**
- methylace **v jednom či více** sledovaných genech: **85 vzorků (71 %)**
 - v jednom: 47 vzorků
 - ve dvou: 21 vzorků
 - ve třech: 17 vzorků

- výskyt methylací:	Gen	Počet vzorků/ % z analyzovaných vzorků
	CDH13	50 (41%)
	RASSF1A	35 (29%)
	APC	32 (26%)
	MGMT	11 (9%)
	CHFR	7 (5%)
	RARB	5 (4%)
	CDKN2A/p16	1 (0,01%)

Výsledky

Přehled výsledků

Methylace v jednom sledovaném genu: celkem 47 vzorků (55 %)

CDH13	21 vzorků
RASSF1A	15
APC	5
CHFR	4
MGMT	2
CDKN2A/p16	1
RARB	1

Methylace ve dvou sledovaných genech: celkem 21 vzorků (25 %)

APC + CDH13	10 vzorků
RASSF1A + CDH13	3
RASSF1A + APC	3

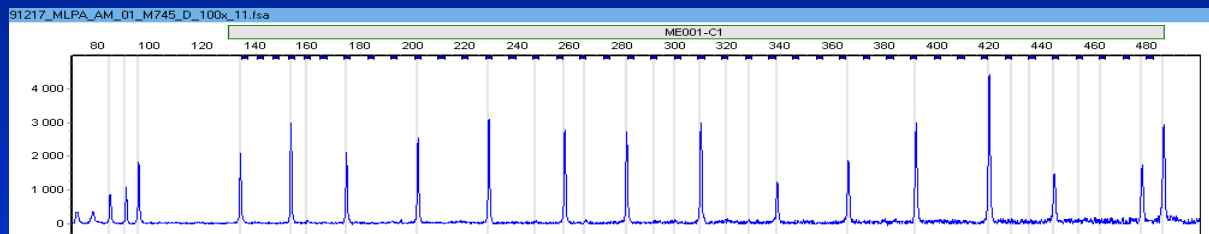
Methylace ve třech sledovaných genech: celkem 17 vzorků (20 %)

APC + RASSF1A + CDH13	7 vzorků
RASSF1A + CDH13 + MGMT	3
Ostatní kombinace	1/žádný

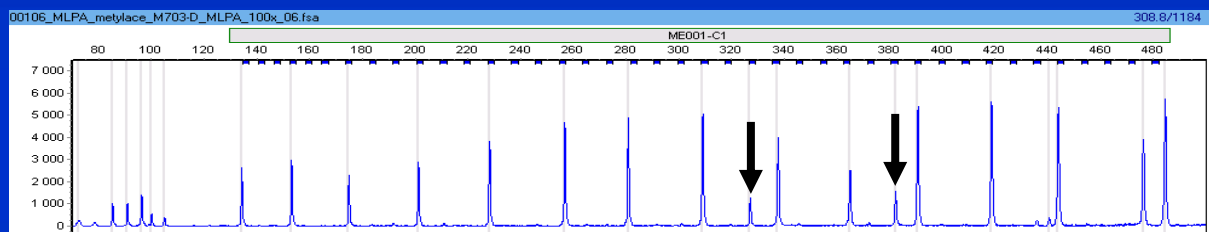
Výsledky

Příklady výsledků analýz

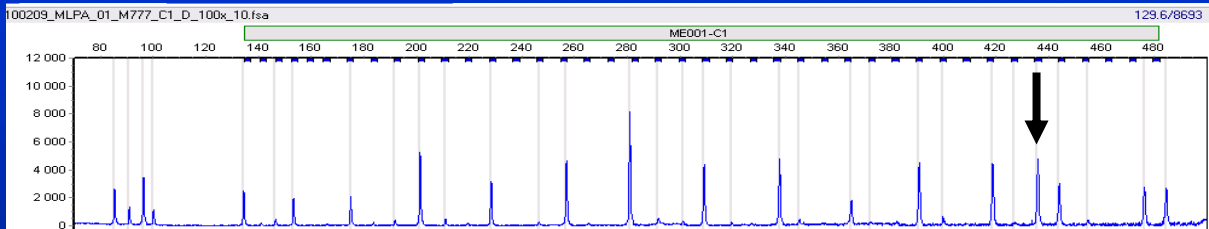
bez methylace



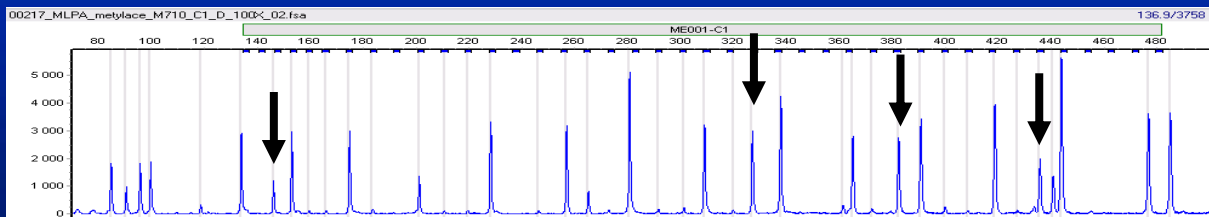
methylace RASSF21A



methylace CDH13



*methylace APC,
RASSF21A, CDH13*



Závěr

- sekvenační i MSP analýza methylací DNA je náročnější na zpracování, množství a kvalitu DNA, **nereprodukovatelné** výsledky
- použití methylačně senzitivní restriktázy s následnou MLPA časově úspornější, nízké nároky na množství a kvalitu DNA, **reprodukovatelné** výsledky
- u vzorků plicních nádorů **v 71 % nalezena methylace** v některém ze sledovaných genů
- u **45 %** methylovaných vzorků dokonce **ve více než jednom genu**
- nejčastěji byla methylace nalezena u genu **CDH13, RASSF1A a APC**

Poděkování

Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o.

Andrea Krajčová

Patrik Sekerka

Klinika tuberkulózy a nemocí respiračních, Fakultní nemocnice Plzeň

MUDr. Ondřej Fiala

Prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.

Děkuji za pozornost