

Niestabilność genetyczna – jej znaczenie w procesie powstawania nowotworów oraz diagnostyka laboratoryjna

Joanna Kozłowska, Izabela Łaczmańska

Jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych jest niestabilność genetyczna, która może się ujawniać jako zmiany: 1) cytogenetyczne – w postaci zwiększonej liczby złamań oraz aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów (niestabilność chromosomowa, CIN); 2) molekularne – jako niestabilność mikrosatelitarna (MSI), czyli zmiana długości alleli powstała w wyniku zwiększenia lub zmniejszenia liczby powtórzeń nukleotydowych i/lub niestabilność alleliczna – utrata heterozygotyczności (LOH), czyli delekcja jednego z dwóch badanych alleli; lub/i 3) epigenetyczne – jako niestabilność epigenetyczna wynikająca z nieprawidłowej metylacji DNA, rearanżacji struktury chromatyny oraz zmian w budowie białek histonowych. Niestabilność genetyczna może być badana za pomocą różnorodnych technik, począwszy od cytogenetyki klasycznej (np. barwienie prążków G), poprzez cytogenetykę molekularną (FISH, m-FISH, SKY, M-banding-FISH, CGH), a także metody biologii molekularnej.

Liczne badania przeprowadzone w ostatnich latach potwierdzają związek pomiędzy niestabilnością genetyczną i epigenetyczną, a rozwojem choroby nowotworowej. Wiedza ta pozwala na poznanie i zrozumienie podstaw genetycznych transformacji nowotworowej, a także wykorzystana jest w diagnostyce i leczeniu nowotworów.

Genetic instability – its significance in cancer development and laboratory diagnostics

Genetic instability is one of the characteristic features of cancer cells and it can be observed as (i) chromosomal instability (CIN) with high number of breaks and/or numerical and structural chromosome aberrations (ii) molecular instability with microsatellite instability (MSI) – as an alteration of allele length due to change of the number of nucleotide repeats and/or allelic instability as loss of heterozygosity (LOH) – loss of one of two examined alleles and/or (iii) epigenetic instability due to DNA methylation pattern abnormalities, chromatin structure alterations or histone proteins modifications. Genetic instability can be examined using a variety of laboratory techniques such as classical cytogenetics (G-banding), molecular cytogenetics (FISH, m-FISH, SKY, M-banding-FISH, CGH) and biology molecular methods.

In recent years a number of studies have shown a correlation between genetic and epigenetic instabilities and cancer development and progression. The results of these studies allow for a better understanding of the genetic basis of cancer development and are helpful in cancer diagnostics and treatment.

Słowa kluczowe: niestabilność chromosomowa, niestabilność molekularna, niestabilność epigenetyczna, nowotwór
Key words: chromosomal instability, molecular instability, epigenetic instability, cancer

Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią drugą, po chorobach serca, przyczynę zachorowań i zgonów na całym świecie. Dane opracowane przez Polską Unię Onkologii (www.puo.pl) wykazują stałą tendencję wzrostową liczby zachorowań na nowotwory i prognozują utrzymanie się tego trendu co najmniej do 2020 r. (liczba zachorowań na świecie w 2000 r. wynosiła 10 000 000, a prognozowana na 2020 rok wynosi 20 000 000).

Nowotwory powstają w wyniku kumulacji genetycznych i epigenetycznych zmian w komórce. Proces ten nazywany jest kancerogenezą i biorą w nim udział następujące główne grupy genów:

- protoonkogeny – kodują m.in. białka kontrolujące prawidłowy przebieg replikacji DNA, proliferacji i różnicowanie komórek. Do aktywacji protoonkogenów (i powstania onkogenów) dochodzi na skutek mutacji punktowych, translokacji chromosomowych lub amplifikacji. Onkogeny na poziomie komórkowym mają charakter dominujący;
- geny supresorowe – zwane „strażnikami genomu” (*gatekeepers*). Są odpowiedzialne za kontrolę replikacji i stabilności genetycznej komórki. Kodują m.in. białka,

które biorące udział w kontroli cyklu komórkowego, apoptozie;

- geny mutatorowe – zwane „opiekunami genomu” (*caretakers*). Kodują białka, które biorą udział w procesach usuwania źle sparowanych zasad, a ich inaktywacja prowadzi do niestabilności mikrosatelitarnej (Microsatellite Instability, MSI).

Geny supresorowe i mutatorowe działają na poziomie komórkowym, jak geny recesywne, czyli dla utraty ich funkcji konieczna jest inaktywacja obu alleli danego genu. Utrata funkcji pojedynczo allelu (tzw. pierwsze zdarzenie wg hipotezy Knudsona) genów supresorowych i mutatorowych w komórkach germinalnych może być przyczyną dziedzicznych zespołów predyspozycji do rozwoju nowotworów.

Zmiany genetyczne w zdrowej komórce zachodzą pod wpływem działania różnych czynników mutagennych, egzo- lub/i endogennych, do których zalicza się:

- czynniki fizyczne – wszelkiego rodzaju promieniowania, np. UV, kosmiczne;
- czynniki chemiczne – substancje zawarte np. w dymie papierosowym, w spalinach samochodowych, azbest oraz niektóre metale ciężkie (nikiel, kadm, kobalt);
- czynniki biologiczne – zewnętrzne np. wirusy, toksyny bakteryjne i pasożytnicze oraz wewnętrzne, np. błędy replikacji, pośrednie produkty przemiany materii, jak np. wolne rodniki i hormony.

Kancerogeneza to proces ciągły, w którym można wyróżnić cztery podstawowe etapy:

- preinicjację – etap narażenia na czynniki kancerogenne, może trwać całe życie;
- inicjację – zachodzi w momencie wystąpienia pierwszej mutacji, która jest nieodwracalna i przekazywana następnym komórkom;
- promocję – może trwać kilka lat, charakteryzuje się nagromadzeniem licznych zmian genetycznych, np. chromosomowych, takich jak: *i*) aberracje strukturalne (np. delecje, duplikacje, translokacje, inwersje) i liczbowe (poliploidie, aneuploidie), molekularnych (mutacje w licznych genach o wysokiej i niskiej penetracji) oraz epigenetycznych (zmiana ekspresji różnych genów);
- progresję – trwa od kilku miesięcy do kilku lat i jest to etap, w którym dochodzi do progresji w rozwoju nowotworu, który nabiera charakteru zmiany złośliwej oraz zdolności do przerzutowania [1-3].

Niestabilność chromosomowa

Niestabilność chromosomowa (CIN – *Chromosomal Instability*, CA – *Chromosomal Aberration*) to zjawisko występowania zwiększonej liczby złamań chromosomów, aberracji strukturalnych (np. translokacji, inwersji, delecji, duplikacji) lub/i liczbowych (aneuploidii, poliploidii). Niestabilność chromosomowa może być obserwowana w limfocytach krwi obwodowej (spontaniczna, charakterystyczna dla zespołów niestabilności chromosomowej, jak np. zespół Blooma, lub jako tzw. ukryta niestabilność chromosomowa, która ujawnia się po zastosowaniu *in*

vitro związków klastogennych, np. bleomycyny), lub w komórkach nowotworowych, dla których jest jedną z charakterystycznych biologicznych cech. Aberracje chromosomowe, występujące w komórkach nowotworowych, mogą stanowić zmiany pierwotne, specyficzne dla danego nowotworu (zwykle translokacje zrównoważone) oraz zmiany wtórne, niespecyficzne (zwykle aberracje niezrównoważone), które powstają w wyniku niestabilności chromosomowej w trakcie rozwoju choroby nowotworowej.

Obecnie wykrywanie charakterystycznych zmian chromosomowych (aberracji liczbowych i strukturalnych oraz analiza liczby złamań) wykorzystywane jest w celu postawienia rozpoznania, ustalenia rokowania oraz monitorowania przebiegu choroby i leczenia, głównie w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego [4-6].

Techniki wykorzystywane do badania niestabilności chromosomowej

Techniki cytogenetyki klasycznej

Podstawowym badaniem, stosowanym w analizie niestabilności chromosomowej, jest badanie cytogenetyczne, polegające na ocenie chromosomów w stadium metafazy. Chromosomy uzyskujemy po założeniu hodowli z krwi obwodowej, szpiku lub fragmentu tkanki nowotworowej w płynnym podłożu, która jest następnie inkubowana w cieplarni, z przepływem CO₂, w temperaturze 37°C. Założenie hodowli z komórek guzów litych możliwe jest po wcześniejszym poddaniu tkanki nowotworowej działaniu kolagenazy, w celu uzyskania pojedynczych komórek z tkanki. Hodowle komórek krwi obwodowej (limfocytów) standardowo trwają 72, szpiku – 24, 48 lub 72 godziny, a komórek guzów litych od 10 dni do paru tygodni. Po tym czasie do hodowli dodawany jest kolcemid w celu zahamowania podziałów komórkowych w stadium metafazy.

Z otrzymanego materiału biologicznego sporządzany jest preparat chromosomowy, który następnie jest barwiony i analizowany w mikroskopie świetlnym lub fluorescencyjnym (w zależności od zastosowanej metody barwienia chromosomów).

Do najczęściej stosowanych technik barwienia chromosomów należą: GTG (*G bands by trypsin using Giemsa*) – prążki G, powstałe w wyniku trawienia trypsyną i barwienia barwnikiem Giemsa. Ta metoda barwienia pozwala na uzyskanie obrazu naprzemiennie ułożonych ciemnych i jasnych prążków, układających się we wzór charakterystyczny dla każdego chromosomu. Wzorce układu prążków G są opisane w Międzynarodowym Systemie Nazewnictwa Cytogenetycznego (ISCN *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* 2009) [5, 7]. Jest to standardowa technika barwienia chromosomów.

Techniki cytogenetyki molekularnej

Metody cytogenetyczne pozwalają na wykrywanie liczbowych aberracji strukturalnych chromosomów, obejmują-

cych regiony o wielkości od 5 do 10 Mpz. Diagnostyka małych aberracji strukturalnych możliwa jest po zastosowaniu technik, które łączą metody cytogenetyki klasycznej z metodami biologii molekularnej. Są to: FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), M-FISH (*Multicolor FISH*), SKY (*Spectral Karyotyping*), M-banding FISH (*Multicolor-banding FISH*). W metodzie FISH stosowane są sondy genetyczne, czyli fragmenty DNA o znanej sekwencji, wyznakowane barwnikiem fluoroscencyjnym, które w odpowiednich warunkach łączą się (hybrydują) z komplementarnym fragmentem DNA badanego genomu. Tak wyznakowane preparaty analizowane są w mikroskopie fluoroscencyjnym, wyposażonym w filtry optyczne: *green, orange, aqua*, DAPI. System komputerowej analizy obrazu, połączony z mikroskopem, pozwala na zoptymalizowanie oglądanego obrazu poprzez wzmocnienie słabych sygnałów oraz usuwanie tła. Metoda FISH pozwala na wykrywanie zmian chromosomowych w granicach od 3 do 10 Mpz (analiza metafaz), oraz od 40 do 250 kpz w przypadku zastosowania sond specyficznych (analiza metafaz i interfaz) [8, 9].

Zastosowanie metod cytogenetyki molekularnej pozwala na identyfikację np. małych markerów chromosomowych (czyli małych chromosomów niewiadomego pochodzenia), naddatków i delecji, a także badanie fuzji chromosomowych, a w przypadku kariotypu mozaikowego na szybką i dokładną ocenę ilościową występowania różnych linii komórkowych [10].

W przypadku analizy komórek nowotworowych, które charakteryzują się nagromadzeniem licznych i nierzadko skomplikowanych aberracji strukturalnych chromosomów (*complex chromosomal rearrangements*), często występują trudności w rozpoznaniu i zdefiniowaniu markerów chromosomowych, powstałych w wyniku rearanzacji chromosomów. W tych przypadkach bardzo pomocne są techniki wywodzące się od FISH: SKY, M-FISH, M-banding FISH. Metody te, dzięki hybrydyzacji pomiędzy sondami wyznakowanymi pięcioma różnymi fluorochromami a ocenianymi chromosomami umożliwiają jednoczesne wyznakowanie i analizę wszystkich chromosomów metafazowych. W wyniku różnic w widmie emitowanego światła każda para chromosomów autosomalnych oraz płci wybarwia się w specyficzny sposób a przypadku M-banding FISH chromosomy wybarwiają się w charakterystyczne prążki. Preparaty analizowane są w mikroskopie fluoroscencyjnym wyposażonym w filtry optyczne: *green, red, aqua, blue, yellow*, DAPI. Rozdzielczość tych metod mieści się w granicach od 3 do 10 Mpz [11]. We wszystkich tych metodach, dla otrzymania dobrych wyników analizy konieczne jest jednak uzyskanie dobrego preparatu chromosomowego, co często jest trudne w przypadku komórek nowotworowych.

Wprowadzenie w 1991 r. przez Kalionen'a i wsp. techniki CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) pozwoliło na ominięcie etapu zakładania hodowli i izolacji chromosomów z komórek nowotworowych. W tej technice DNA pacjenta (wyznakowane zwykle kolorem zielonym) mieszane jest z referencyjnym DNA (wyznakowanym zwykle kolorem czerwonym), a następnie prze-

prowadzana jest hybrydyzacja tej mieszaniny DNA do prawidłowych metafaz o kariotypie męskim. Preparaty analizowane są w mikroskopie fluoroscencyjnym, a specjalistyczny komputerowy program umożliwia ilościową analizę wzajemnej intensywności obu sygnałów fluoroscencyjnych wzdłuż każdego chromosomu. Otrzymane wyniki to profile wysycenia użytych barwników. Profil o wartości od 0,75-1,25 uznawany jest za prawidłowy, powyżej 1,25 oznacza amplifikację (duplikację), wartość poniżej 0,75 oznacza delecję danego regionu. Dzięki temu metoda CGH umożliwia badanie niezrównoważonych aberracji, czyli takich, które prowadzą do utraty lub zwiększenia ilości materiału genetycznego, ale nie pozwala na wykrycie aberracji zrównoważonych, czyli np. inwersji, translokacji. Dokładność metody wynosi około 5-10 Mpz. Zalety CGH umożliwiły wykorzystanie jej do badania niestabilności chromosomowej w tkankach nowotworowych [12].

W 1996 r. wprowadzono do diagnostyki mikromacierze DNA. Stosowane są one między innymi do wykrywania zmian w genomie (CGH do mikromacierzy, ang. *array-CGH*), oceny ekspresji genów (czyli poziomu ich aktywności w stosunku do prawidłowej tkanki), poszukiwania wariantów polimorficznych (SNP) oraz mutacji, a także do określania kolejności zasad w niezsekwencjonowanych fragmentach DNA. Mikromacierze są to najczęściej szklane lub nylonowe płytki podzielone na komórki, w których umieszczone są jednoniciowe odcinki DNA (sondy). Pomiędzy DNA badanym a sondą dochodzi do hybrydyzacji. Do odczytu wykorzystywany jest odpowiedni detektor, a otrzymane w ten sposób dane przekształcane są przez odpowiedni program w barwny obraz. Dzięki mikromacierzom można wykonać równocześnie setki, a nawet tysiące oznaczeń [13, 14].

Ukryta, konstytutywna niestabilność chromosomowa

Wrodzona niestabilność chromosomowa charakterystyczna jest dla rzadko występujących, dziedzicznych autosomalnie recesywnie, zespołów takich jak np.: *ataxia teleangiectasia*, zespół Blooma, *Xeroderma pigmentosum* i anemia Fanconiego. W zespołach tych obserwuje się wyższą niż populacyjna częstość występowania nowotworów (wyjątkiem jest zespół Cockayne'a) [6], związaną z uszkodzeniami systemów naprawy DNA, które powodują wzrost częstości aberracji chromosomowych [15].

Ukryta niestabilność chromosomów jest wykrywana *in vitro*, po dodaniu do hodowli badanych komórek (limfocytów krwi obwodowej, fibroblastów, komórek guza) związków indukujących aberracje chromosomowe (tzw. związków klastogennych). Ten typ niestabilności jest uważany za marker indywidualnej podatności na środowiskowe czynniki mutagenne i jest charakterystyczną cechą dla osób chorujących na nowotwory indukowane czynnikami mutagennymi, jak np. rak krtani. Wyniki tych testów mogą być jednak analizowane jedynie w odniesieniu do grupy badanej, a nie mogą być wykorzystywane dla indywidualnego poradnictwa. Dane epidemiologiczne, przeprowadzane w latach 1965-2008 w laboratoriach

wielu krajów, potwierdzają ścisły związek pomiędzy niestabilnością chromosomową, a wzrostem ryzyka rozwoju choroby nowotworowej [16, 17].

Techniki wykorzystywane dla badania ukrytej niestabilności chromosomowej

W 1983 r. Hsu T.C. i wsp. opracowali test bleomycynowy jako metodę oceny indywidualnej podatności na działanie mutagenów. Polega on na dodaniu do standardowej hodowli komórek (na trzy godziny przed zakończeniem hodowli, w fazie G2 cyklu komórkowego) roztworu bleomycyny o stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$. Następnie sporządzany jest preparat chromosomowy, który w klasycznej odmianie testu barwiony jest barwnikiem Giemsy, a następnie poddany analizie w mikroskopie świetlnym. Oceniana jest liczba złamań chromatyd oraz procent komórek zawierających złamanie. Zakres poniżej 0,8 złamań na komórkę jest charakterystyczny dla stabilności chromosomowej, 0,8-1,0 odpowiada niestabilności chromosomowej, powyżej 1,0 – podwyższonej niestabilności chromosomowej oraz zwiększonemu ryzyku wystąpienia choroby nowotworowej [18].

Testami diagnostycznymi są natomiast test diepoksybutanowy (DEB) i mitomycynowy (MMC), stosowane w diagnostyce anemii Fanconiego. W obu przypadkach pierwszym etapem jest założenie 72 godzinnej hodowli z limfocytów krwi obwodowej, na płynnym podłożu, z dodatkiem mitogenu, w temperaturze 37°C. Po 24 godzinach dodawany jest DEB w stężeniu 0,1 $\mu\text{M/ml}$ lub mitomycyna w stężeniu 50 ng/ml. Po izolacji limfocytów oraz zabarwieniu preparatów barwnikiem Giemzy oceniany jest procent uszkodzonych komórek, liczba aberracji na komórkę oraz procent figur radialnych.

Inną metodą, wykorzystywaną do badania niestabilności chromosomowej oraz w diagnostyce zespołu Blooma, jest analiza częstości wymian siostrzanych chromatyd (SCE – Sister Chromatid Exchange). Do standardowej hodowli dodawana jest BrdU (5'-bromodezoksyurydina) w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Otrzymane po izolacji preparaty barwione są barwnikiem Hoechst'a, a następnie naświetlane promieniowaniem UV. Po 2-godzinnej inkubacji w roztworze 2xSSC barwione są barwnikiem Giemzy. Preparat poddawany jest analizie w mikroskopie świetlnym, która polega na określeniu częstości wymiany siostrzanych chromatyd. U osób zdrowych częstość SCE waha się od 4 do 10 wymian na komórkę, natomiast u osób z zespołem Blooma SCE występuje z częstością 60-100 lub więcej [19].

Niestabilność mikrosatelitarna

Mikrosatelity to sekwencje tandemowe, czyli zblokowane seryjne powtórzenia sekwencji DNA, złożone z 1 do 300 nukleotydów, rozłożone równomiernie w genomie, co 6-10 kbp, powtarzające się w pojedynczym *locus* od 2 do 100 razy. W genach znajdują się w sekwencjach flankujących i niekodujących DNA, bardzo rzadko w sekwencjach kodujących. W materiale genetycznym człowieka

występuje około 100 tysięcy loci z mikrosatelitami, które są cechą osobniczo zmienną.

Badania ostatnich lat dowodzą, że zostały zaobserwowane zmiany w długości alleli mikrosatelitarnych w DNA wyizolowanym z tkanek nowotworowych, w porównaniu do DNA pochodzącego z krwi obwodowej lub zdrowej tkanki pacjenta. Zmiany te zostały określone jako niestabilność mikrosatelitarna MSI (*Microsatellite Instability*), a powstają one w wyniku mutacji w czasie replikacji DNA lub w poreplikacyjnej naprawie DNA. Niestabilność mikrosatelitarna jest markerem fenotypu mutatorowego RER+ (*Replication Error phenotype*), a nowotwory, w których stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną, określane są jako RER+. MSI po raz pierwszy została opisana w 1993 r., jako swoista cecha w dziedzicznych, niepolipowatych rakach jelita grubego HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). U pacjentów z HNPCC fenotyp RER+ obserwowany jest w prawie 90% przypadków. W innych nowotworach (np. sporadyczne raki jelita grubego, raki endometrium, piersi, żołądka, trzustki, prostaty, płuc, jajnika, miedniczek nerkowych i moczowodu, pęcherza moczowego, głowy, szyi, skóry) niestabilność mikrosatelitarna stwierdzana jest z mniejszą częstością [20-22].

Utrata heterozygotyczności, czyli LOH (*Loss Of Heterozygosity*,) jest zjawiskiem obserwowanym we wczesnych i zaawansowanych stadiach procesu nowotworowego. LOH to niestabilność alleliczna, która przejawia się częściową utratą (przynajmniej 20%) jednego z alleli w DNA tkanki nowotworowej, w porównaniu z DNA z krwi obwodowej tego samego pacjenta. Można ją oznaczyć poprzez analizę wybranych sekwencji mikrosatelitarnych. Analiza taka jest możliwa jedynie w odniesieniu do markerów informatywnych, czyli takich, które charakteryzują się heterozygotycznością (różnią się długością sekwencji powtórzonej allelu matczynego i ojcowskiego) [23].

Techniki wykorzystywane do badania niestabilności mikrosatelitarnej

Niestabilność mikrosatelitarna badana jest przy użyciu reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*), w procesie amplifikacji badanego DNA, przy zastosowaniu swoistych dla wybranych markerów starterów, z których jeden jest znakowany fluorescencyjnie. Następnie tak powielone fragmenty DNA są rozdzielane w elektroforezie kapilarnej (np. z użyciem sekwenatora). Porównanie wielkości markerów mikrosatelitarnych tkanki nowotworowej i tkanki zdrowej od tego samego pacjenta umożliwia obserwację każdej zmiany długości allelu, a co za tym idzie, rozpoznanie niestabilności mikrosatelitarnej w badanej tkance nowotworowej.

Do analizy LOH niezbędne jest DNA wyizolowane z guza nowotworowego oraz DNA wyizolowane z krwi obwodowej tego samego pacjenta. Pierwszym etapem jest amplifikacja DNA markerów mikrosatelitarnych w regionach polimorficznych. Jeden ze starterów znakowany jest fluorescencyjnie. Po dodaniu odpowiednich standardów

wielkości produkty PCR są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskane wyniki analizowane są przy udziale odpowiedniego programu komputerowego. Porównuje się wysokość pików uzyskanych dla DNA guza z wysokością pików dla prawidłowego DNA. Tkanka nowotworowa charakteryzuje się dużą heterogennością i może zawierać komórki na różnym etapie rozwoju nowotworu, dlatego całkowita utrata allelu w heterozygotycznym *locus* występuje bardzo rzadko; najczęściej obserwowana jest utrata heterozygotyczności w zakresie 0-80% [24].

Niestabilność epigenetyczna

Termin epigenetyka, czyli badanie dziedziczności pozagenowej, został wprowadzony przez C.H. Waddingtona w 1942 r. Wyróżniane są dwa różne procesy epigenetyczne: nieprawidłowa metylacja DNA (hypo- lub hypermetylacja) oraz przebudowa struktury chromatyny, polegająca na zmianach w obrębie białek histonowych.

Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej do węgla w pozycji 5 pierścienia cytozyny, w obrębie dwunukleotydu CpG. W genomie człowieka około 70% wysp CpG ma przyłączoną grupę metylową do cytozyny. Proces ten zachodzi w prawidłowych komórkach podczas różnicowania się tkanek, inaktywacji chromosomu X, piętnowania genomowego (*genomic imprinting*), apoptozy i kontroli cyklu komórkowego [25]. Jednakże w obrębie genomu występują sekwencje DNA, w których wyspy CpG nie ulegają metylacji, są to wyspy CpG zlokalizowane na 5' końcach genów w regionach promotorowych, o zasadniczym znaczeniu dla podstawowych procesów komórki. Hypermetylacja regionów promotorowych może zahamować transkrypcję, co prowadzi do utraty ekspresji genu, a hypometylacja do zwiększenia ekspresji genu.

W rozwoju nowotworu istotną rolę odgrywają oba typy zaburzeń metylacji, czyli globalna hypometylacja genomu i jednoczesna hypermetylacja wysp CpG regionów promotorowych niektórych genów (najczęściej genów supresorowych i mutatorowych). Zjawisko zwiększonej częstości hypermetylacji określane jest jako niestabilność epigenetyczna, która wiąże się z występowaniem fenotypu metylatorowego wysp CpG (CIMP; CpG Island Methylator Phenotype). Fenotyp CIMP po raz pierwszy został opisany przez Toyotę i wsp. w 1999 r. w rakach jelita grubego. Badania ostatnich lat wskazują na związek pomiędzy nowotworami CIMP+, a np. rakiem [26, 27].

Drugim zjawiskiem prowadzącym do zaburzeń epigenetycznej regulacji ekspresji genów, obserwowanym w komórkach nowotworowych, jest modyfikacja białek histonowych. Posttranslacyjne modyfikacje histonów obejmują ich acetylację, metylację, fosforylację, ubikwitynację i koniugację z SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifer*), które powodują zmiany w ekspresji genów. W zależności od rodzaju i miejsca wystąpienia modyfikacji następuje kondensacja lub rozluźnienie struktury chromatyny. DNA staje się bardziej lub mniej dostępne dla czynników transkrypcyjnych i polimeraz, co skutku-

je zmniejszeniem lub zwiększeniem poziomu ekspresji genów. Zmiany epigenetyczne cechuje wysokie prawdopodobieństwo powrotu do stanu wyjściowego tzn., że w odróżnieniu od zmian genetycznych mają one charakter odwracalny [28, 29].

Techniki wykorzystywane do badania niestabilności epigenetycznej

MS-AP-PCR (*Methylation – Sensitive Arbitrarily Primed PCR*) to metoda oparta na reakcji PCR, dzięki czemu łatwo może być wprowadzona w każdym laboratorium molekularnym. Do identyfikacji miejsc metylowanych w genomie używany jest enzym restrykcyjny HpaII, tnący DNA w miejscach, które uległy metylacji oraz jego izoschizomer – enzym MspI, tnący DNA w miejscach niemetylowanych. Dodatkowo w tej reakcji stosowany jest enzym restrykcyjny RsaI, który tnie DNA na małe fragmenty, redukując potencjalne artefakty, powstające w reakcji PCR. Fragmenty DNA po amplifikacji oraz trawieniu rozdzielone są elektroforetycznie. Jeżeli po trawieniu odpowiednio enzymami RsaI oraz RsaI + HpaII obecny jest produkt, oznacza to, że badany fragment DNA był metylowany. Brak produktu trawienia po działaniu enzymami RsaI + MspI również świadczy o metylacji. Metoda wykorzystywana jest do wykrywania fragmentów o zmienionej metylacji, co pozwala na ocenę zmian we wzorze metylacji w komórkach nowotworowych, lub też na wykazanie różnic w częstości występowania i wzorze metylacji pomiędzy dwoma genomami.

Metoda RLSG (*Restriction Landmark Genomic Scanning*) umożliwia zlokalizowanie zmian w metylowanym DNA w całym genomie. Technika ta wymaga specjalistycznego sprzętu, a DNA użyte do badania musi być bardzo dobrej jakości. Wykorzystywane są tu metylowrażliwe enzymy restrykcyjne NotI i AscI, które tną jedynie niemetylowane miejsca, zlokalizowane na wyspach CpG. Rozdział fragmentów restrykcyjnych następuje w elektroforezie z użyciem dwupoziomowego żelu. Metoda umożliwia bezpośrednie porównanie DNA, pochodzącego od dwóch różnych osób lub porównanie pomiędzy zdrowym i nowotworowym DNA.

DMH (*Differential Methylation Hybridization*) wykorzystuje technikę mikromacierzy DNA. Na szklaną lub nylonową płytkę, podzieloną na komórki, umieszczane jest ponad 5000 małych jednoniciowych fragmentów wysp CpG. DNA z tkanki prawidłowej i nowotworowej poddane jest trawieniu metylowrażliwymi enzymami restrykcyjnymi. Po amplifikacji i wyznakowaniu nowotworowego i prawidłowego DNA dwoma barwnikami fluorescencyjnymi (Cy3 – barwnik zielony – nowotworowy; Cy5 – barwnik czerwony – prawidłowy), produkty PCR są mieszane i nanoszone na mikromacierze wysp CpG. Pojawienie się po hybrydyzacji czerwonego sygnału świadczy o obecności metylowanych sekwencji w tkance nowotworowej. Żółty sygnał obserwujemy w metylowanych sekwencjach, zarówno w tkance prawidłowej, jak i nowotworowej. Wynik analizowany jest przy pomocy specjalistycznego sprzętu i oprogramowania. Służy do

wykrywania różnic w metylacji pomiędzy dwoma genomami oraz wyznaczania wzoru metylacyjnego w tkankach nowotworowych [30].

Pojawienie się nowych, rozwój istniejących technik molekularnych oraz postępująca automatyzacja badań laboratoryjnych umożliwi dokładniejszą i szerszą ocenę zdarzeń zachodzących w komórkach nowotworowych. Poznanie zależności pomiędzy obserwowanymi zmianami oraz odkrycie nowych biomarkerów w sposób znaczący może przyczynić się do wcześniejszego wykrywania, badania progresji, określania typu nowotworu oraz doboru odpowiedniej terapii.

Podziękowania

Autorki dziękują pani prof. dr hab. Marii M. Sasiadek za pomoc w przygotowaniu niniejszej publikacji.

Mgr Joanna Kozłowska

Katedra i Zakład Genetyki
Akademia Medyczna we Wrocławiu
ul. Marcinkowskiego 1
50-368 Wrocław
jkozlowska@gen.am.wroc.pl

Piśmiennictwo

- Knudson AG. Overview. Genes that predispose to cancer. *Mutat Res* 1991; 247: 185-90.
- Siedlecki JA, Limon J. Choroby nowotworowe. W: Bal J (red.). *Biologia molekularna w medycynie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2007, 336-417.
- Fabricio F, Le Blanc K, Brodin B. Cancer Testis Antigens, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cells* 2007; 25: 707-11.
- Bal J, Bocian E. Zmienność i dziedziczność. W: Bal J (red.). *Biologia molekularna w medycynie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa; 2007, 62-87.
- Roulston D, Le Beau MM. Cytogenetic Analysis of Hematologic Malignant Diseases. W: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (red.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1997, 325-74.
- Yang J, Du X, Lazar J, Pollock R i wsp. Genetic aberrations of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 2008; 113: 1532-43.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, Karger S. *ISCN (2009) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel 2009.
- Bal J, Wiszniewski W. Metody badań genomu. W: Bal J (red.). *Biologia molekularna w medycynie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa; 2007, 142-62.
- Lawce HJ, BronMG. Cytogenetics. W: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (red.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1997, 19-48.
- Szyfter K, Jarmuż M. Zastosowanie techniki FISH do ustalenia pochodzenia chromosomów markerowych występujących w komórkach linii wyprowadzonych z nowotworów krtani. *Współcz Onkol* 2003; 4: 254-8.
- Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W i wsp. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Genetics* 2001; 98: 2538-43.
- Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A i wsp. Array Comparative Genomic Hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 2004; 64: 4817-25.
- Diamandis EP. Sequencing with Microarray Technology – A Powerful New Tool for Molecular Diagnostics. *Clin Chem* 2000; 46, 10: 1523-5.
- Shoemaker DD, Schadt EE, Armour CD i wsp. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature* 2001; 409: 922-7.
- Sasiadek M., Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A i wsp. Niestabilność genetyczna w nowotworach. *Postępy Biologii Komórki* 2003; 30: 259-72.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H i wsp. Chromosomal aberrations and cancer risk: Results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 36-43.
- Bonassi S, Norppa H, Ceppi M i wsp. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1178-83.
- Szyfter K, Jarmuż M. Zastosowanie testu bleomycynowego do określenia predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory. *Współcz Onkol* 1999; 3: 188-90.
- Moustacchi E. Fanconi's anemia. Orphanet Encyclopedia. October 2003. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FA.pdf>
- Risio M, Reato G, di Celle PF. Microsatellite instability is associated with histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 5470-4.
- Long S, Nam-Gyun K, Se HK i wsp. Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2003; 163: 1429-36.
- Śmigiel R, Stembalska A, Stal A. The microsatellite instability in patients with colon cancer treated in Lower Silesia. *Adv Clin Exp Med* 2006; 15: 29-36.
- Tomlinson IPM, Lambros MBK, Roylance RR. Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed, Genes. *Chromosomes & Cancer* 2002; 34: 349-53.
- Gonzales MW, Lopez-Larrea C, Juarez Menendez M, Coto E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in SCC of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1043-9.
- Eshleman JR, Markovitz SD. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Gen* 1996; 5: 1489-94.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-7.
- Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 2000; 910: 140-55.
- Kwinta Ł. Epigenetyka czerniaka. *Współcz Onkol* 2008; 12: 45-50.
- Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447: 407-12.
- Plass CH. Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2479-88.

Otrzymano: 8 lutego 2010 r.

Przyjęto do druku: 5 maja 2010 r.