Bartosz Mucha

„Związek naprawy DNA z polimorfizmem genów HRR i NHEJ u pacjentów z rakiem jelita grubego"

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Podstawy teoretyczne:

Rak jelita grubego (RJG) jest jedną z wiodących chorób nowotworowych w krajach zindustrializowanych, którą cechuje wysoki poziom śmiertelności. Zdecydowana wiekszość RJG (>60%) to tzw. przypadki sporadyczne, o charakterze niedziedzicznym. Komórki nowotworu jelita wykazują najczęściej fenotyp niestabilności chromosomowej (CIN, ang. chromosomal instability), która objawia się zmianami w strukturze chromosomów, poliploidią, aneuploidią czy utratą heterozygotyczności. Ekspozycja na czynniki środowiskowe, tj. promieniowanie jonizujące, palenie tytodniu czy niewłaściwa dieta, sprzyja powstawawaniu wielu typów uszkodzeń DNA. Spośród nich największe zagrożenie dla stabilności genomu stanowią pęknięcia dwunicowe DNA (DSB, ang. *doulbe stranded breaks*). W celu obrony przed negatywnymi skutkami DSB komórki w toku ewolucji wykształciły dwa wzajemnie kompensujące się mechanizmy naprawcze, tj. rekombinację homologiczną (HRR, ang. homologous recombination) oraz łączenie niehomologicznych końców (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*). Niefektywne funkcjonowanie któregoś z nich może sprzyjać akumulowaniu się mutacji, które w krytycznym momencie uruchomią proces kancerogenezy. Zmienności osobnicze genów powodują, iż jedna część populacji może być bardziej podatna na nowotwór od innej. Powszechnie rozważanym czynnikiem, który może modulować interakcję gen - środowisko w kontekście nowotworzenia są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism), szczególnie te obecne w tak kluczowych mechanizmach, jak naprawa DNA. Wśród genów HRR do wiodących zalicza się gen *RAD51* kodujący rekombinazę odpowiadającą za odszukiwanie obszaru homologii oraz *XRCC3* kodujący białko pomocnicze dla RAD51. W przypadku genów NHEJ, wśród kluczowych wymienia się *XRCC6* kodujący białko KU70, które uczestniczy w zbliżaniu wolnych końców uszkodzenia, a także gen *XRCC4* kodujący białko pomocnicze dla ligazy katalizującej wiązanie zerwanych nici. Wyżej wspomniane geny są bogate w SNP, których warianty mogą wpływać na ryzyko RJG.

Cele:

Pierwszym celem była ocena związku pomiędzy rozkładem genotypów oraz częstości występowania alleli a ryzykiem rozwoju lub progresji RJG w polimorfizmach genów zwiazanych z HRR 135G/C (rs1801320), 172G/T (rs1801321), -4791A/T (rs2619679); -4601A/G (rs5030789) genu *RAD51*; 241Thr/Met (rs861539) genu *XRCC3*. oraz NHEJ -991T/C (rs5751129) genu *XRCC6*, -1394G/T (rs6869366) genu *XRCC4*.

Drugim celem była ocena efektu fenotypowego dla polimorfizmów znajdujących się w regionach promotorowych genów.

Kolejną podjętą kwestią była ocena różnic w efektywności naprawy przez HRR i NHEJ u pacjentów z RJG oraz osób bez raka z grupy kontrolnej, a także w liniach komórkowych RJG i prawidłowego epitelium jelita.

Ostatnią kwestią była ocena uzyskanych wyników w kontekście przydatności w diagnostyce i prewencji raka jelita grubego.

Materiały i metody:

Do oznaczania genotypów zaangażowano 200 osób z histopatologicznie potwierdzonym rakiem jelita grubego oraz 200 osób stanowiących grupę kontrolną, dopasowaną pod względem płci i wieku. DNA zostało wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej. Z każdej z grup wybrano po 3 osoby do oceny efektywności naprawy NHEJ i HRR. W badaniach modelowych wykorzystano dostępne komercyjnie komórki RJG linii HT-29, prawidłowe komórki epitelialne jelita linii CCD841 oraz fibroblasty mysie MEF.

Do genotypowania wykorzystano metodę RFLP-PCR oraz Real-Time PCR z użyciem sond TaqMan. Oceny promotorów poszczególnych genów dokonano przy użyciu systemu reporterowego z genem kodującym lucyferazę. W oznaczaniu aktywności NHEJ oraz HRR wykorzystano test TAK z zastosowaniem pozachromosomalnego substratu dostarczanego do badanych komórek metodą elektroporacji.

Wyniki:

Analiza statystyczna wykazała, iż następujące genotypy oraz allele są związane z podniesionym ryzykiem RJG: allel T polimorfizmu 172G/T genu *RAD51*, allel A polimorfizmu -4601A/G genu *RAD51*, genotyp T/G oraz allel G polimorfizmu-1394G/T genu *XRCC4*, genotyp T/C, C/C oraz allel C polimorfizmu -991T/C genu *XRCC6*. Z kolei, wariant Thr/Met oraz allel Met polimorfizmu 241Thr/Met genu *XRCC3* są związane z obniżonym ryzykiem RJG.

Analiza statystyczna kombinacji podwójnych SNP wykazała zwiększone ryzyko RJG dla następujących wariantów: GT/AA, GT/GG, TT/AG, GG/AG, TT/GG, GT/AA w kombinacji polimorfizmów kolejno 172G/T oraz -4601A/G genu RAD51; TM/GT, TM/GG w kombinacji polimorfizmów 241Thr/Met genu XRCC3 oraz 172G/T genu RAD51; TT/TC, TG/TC, TG/TT, TT/CC, TG/CC, GG/TC w kombinacji polimorfizmów 1394G/T genu *XRCC4* oraz -991T/C genu *XRCC6*.

Analiza związku polimorfizmów z ryzykiem progresji nie wykazała istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów i częstości występowania alleli.

Ocena aktywności promotorów wykazała, iż allel T polimorfizmu 172G/T obniża aktywność promotora genu *RAD51* w komórkach prawidłowych CCD841. Podobnie wariant C polimorfizmu -991T/C obniża aktywność promotora genu *XRCC6* w komórkach prawidłowych epitelium jelita.

Porównanie efektywności naprawy NHEJ/HRR w limfocytach pobranych od pacjentów i osób z grupy kontrolnej nie wykazało istotnych statystycznie różnic. Podobnie, żadnych różnic nie zaobserwowano pomiędzy liniami komórek RJG oraz prawidłowych komórek epitelialnych jelita.

Wnioski:

Polimorfizmy 172G/T i -4601A/G, genu *RAD51*, -1394G/T genu *XRCC4* oraz

-991T/C genu XRCC6 są kandydatami, by zostać markerami oceny ryzyka wystąpienia RJG. Ocena efektywności naprawy NHEJ i HRR wymaga dalszych prac z zastosowaniem czulszych metod.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii i Biochemii Klinicznej
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego
90-647 Łódź, pl. Hallera 1
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek