

STRESZCZENIE

WSTĘP

Za rozwój ostrej białaczki szpikowej i zespołów mielodysplastycznych odpowiedzialne jest nabywanie przez komórki somatycznych mutacji genetycznych, które zaburzają procesy dojrzewania i apoptozy hematopoetycznych komórek macierzystych. W leukemogenezie kluczowe znaczenie mają również czynniki epigenetyczne, a jednym z podstawowych jest zaburzenie metylacji wysp CpG. Mechanizmem naprawczym dla zaburzonego procesu metylacji jest TET-TDG-BER-zależna demetylacja DNA, której aktywność prowadzi do usuwania z DNA i wydalania do moczu zdemetylowanych pochodnych 5-metylocytozyny, w czym kluczową rolę odgrywa dioksygenaza TET2 oraz glikozylaza TDG.

CELE BADANIA

Celem badania jest ocena procesów epigenetycznych u pacjentów dorosłych z AML oraz MDS, w tym analiza poziomów produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytnym oraz stężeń tych produktów w moczu w porównaniu do grupy kontrolnej, analiza ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne i ich wpływ na szlak TET-TDG-BER-aktywnej demetylacji DNA oraz ocena częstości występowania mutacji genów epigenetycznych. Zaplanowano również ocenę wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA leukocytnym oraz stężeń tych produktów w moczu na dane kliniczne: ryzyko transformacji MDS do AML, odpowiedź na chemioterapię indukującą oraz długość życia pacjentów z AML.

MATERIAŁY I METODY

Do badania włączono 62 pacjentów z nieleczonym AML oraz 42 pacjentów z nieleczonym MDS. U wszystkich pacjentów oznaczano wartości produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytnym oraz w moczu, a do analiz wykorzystano dedykowaną metodologię opartą o dwuwymiarową ultrasprawną chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas (2D UPLC-MS/MS). Wykonano także pomiary ekspresji mRNA genów *TET1*, *TET2*, *TET3*, *TDG*, *IDH1* oraz *IDH2*. Uzyskane wyniki porównywano do grupy kontrolnej (n=52). U wszystkich pacjentów oznaczono również status mutacji genów *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2*.

WYNIKI

Wykazano obniżenie poziomu 5-hmdC w DNA leukocytnym pacjentów z AML względem

grupy kontrolnej oraz pacjentów z MDS względem grupy kontrolnej. Najwyższe stężenia produktów aktywnej demetylacji w moczu odnotowano u pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS, a najniższe w grupie kontrolnej. W grupie pacjentów z AML wykazano niższą niż w grupie kontrolnej ekspresję mRNA *TET2* i jednocześnie wyższą ekspresję mRNA *TET1*, *TET3*, *TDG* oraz *IDH1/2*. Stwierdzono obecność mutacji genetycznych u pacjentów z AML i MDS: *IDH1* odpowiednio u 3,23% i 2,4% pacjentów, *TET2* odpowiednio u 6,5% i 11,9% pacjentów oraz *IDH2* u 4,8% pacjentów z AML. Nie wykazano związku pomiędzy wartościami produktów demetylacji a odsetkiem odpowiedzi na chemioterapię intensywną u pacjentów z AML. Pacjenci z MDS, u których doszło do transformacji do AML mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji. Pacjenci z AML z niskim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mieli dłuższe przeżycie całkowite, niż pacjenci z wysokim stężeniem 5-mdC.

WNIOSKI

Wykazano, że hipermetylacja wyrażona poprzez deplecję 5-hmdC jest cechą charakterystyczną AML oraz MDS. Dostarczono dowodów na to, że jedną z jej przyczyn może być obniżenie ekspresji mRNA genu *TET2*. Poprzez analizę stężeń produktów demetylacji trafiających do moczu wykazano różnice w nasileniu zaburzeń epigenomu w badanych grupach: największe wśród pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie osób zdrowych. Poprzez wykazanie zwiększonej ekspresji mRNA *TDG* w grupie chorych na AML potwierdzono znaczne nasilenie procesów naprawczych zaburzeń metylacji przez TET-TDG-BER-zależną aktywną demetylację DNA. Dodatkowo dostarczono dowodów wspierających hipotezę zakładającą kompensacyjną funkcję genów *TET1* oraz *TET3* w odpowiedzi na deplecję *TET2* oraz ustalono częstość występowania mutacji epigenetycznych w populacji pacjentów z AML i MDS. Wyjściowa wartość produktów aktywnej demetylacji w DNA i w moczu nie miała wpływu na powodzenie chemioterapii indukującej u pacjentów z AML. Wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym u pacjentów z MDS może mieć wartość prognostyczną w ocenie ryzyka transformacji do AML, a stężenie 5-mdC w moczu może wpływać na długość przeżycia całkowitego pacjentów z AML, jednak wnioski te powinny zostać potwierdzone na większej grupie pacjentów w analizie wieloczynnikowej.