

# METYLAČNÍ A CHROMOSOMÁLNÍ ZMĚNY V OBLASTI 11p15 U FEOCHROMOCYTOMŮ A PARAGANGLIOMŮ

Jenčová P. (1), Zelinka T. (2), Musil Z. (1,5), Vosecká T. (1), Pacák K. (3), Dušková J. (4), Vícha A. (1)

1 - Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha; 2 - Centrum pro výzkum, diagnostiku a léčbu hypertenze, III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha; 3 - Section on Medical Neuroendocrinology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development (NICHD), National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20892, USA; 4 - Institut patologie, 1. LF UK a VFN, Praha; 5 - Institut biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN, Praha

Podpořeno MZ ČR - RVO, FN v Motole 00064203

## Úvod:

Feo chromocytomy a paragangliomy (PPGL) jsou vzácné neuroendokrinní tumory, které vznikají z chromafinných buněk sympatiku. Většina těchto nádorů je benigních, ale přibližně 10% nádorů je maligních. Se vznikem PPGL je nyní spojováno nejméně 19 genů.

## Cíl:

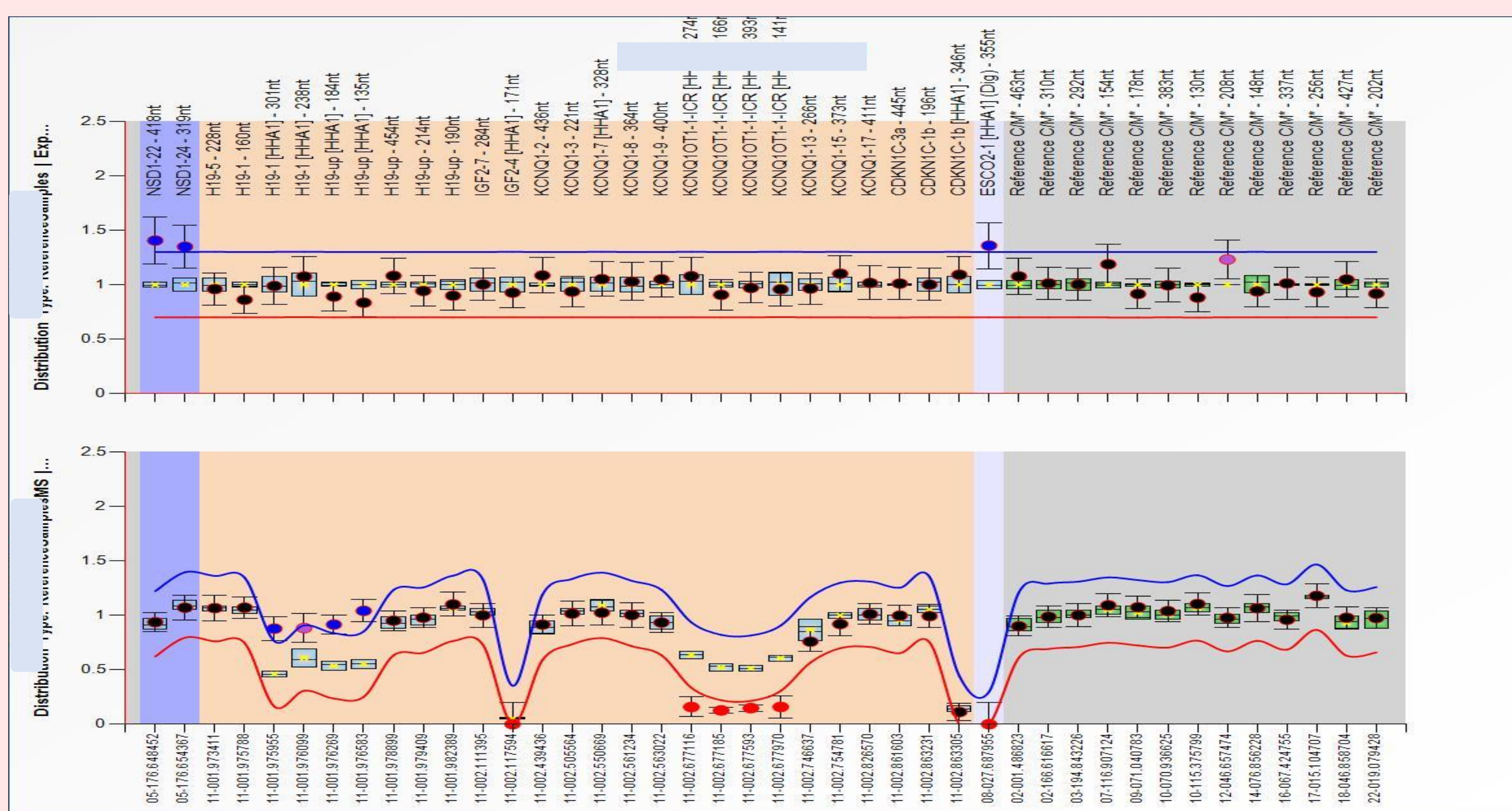
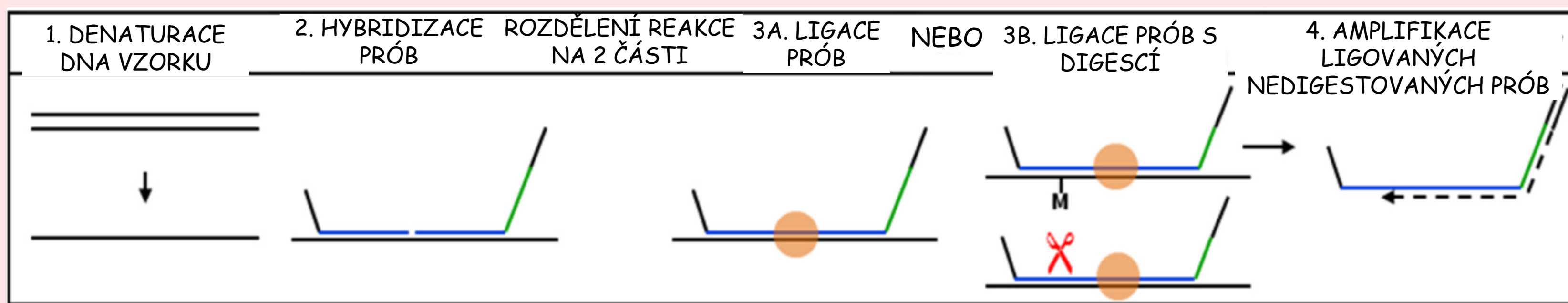
Ve studii jsme se zaměřili na změny v chromosomálním počtu a metylačním stavu genů *IGF2*, *H19* a *KCNQ1OT1* (11p15), protože jejich zapojení do vývoje různých nádorů bylo prokázáno již dříve. U PPGL byly zatím tyto geny zkoumány minimálně a změny jejich metylačního stavu byly popsány pouze dvě a to delece maternální alely a snížená metylace genu *KCNQ1OT1*. Obě tyto změny mají stejný následek a to snížení exprese genu *CDKN1C*. Naším cílem bylo zjistit, zda se u PPGL nevyskytují i jiné změny této oblasti a zda všechny změny mají stejný důsledek.

## Materiál a metody:

Vyšetřovaným materiálem byla DNA vyzískovaná ze zamražené nádorové tkáně pacientů s diagnostikovaným PPGL. Zvolenou metodou byla metylační MLPA probemix ME030. Vybranou skupinu vzorků jsme vyšetřili pomocí digital droplet PCR (ddPCR).

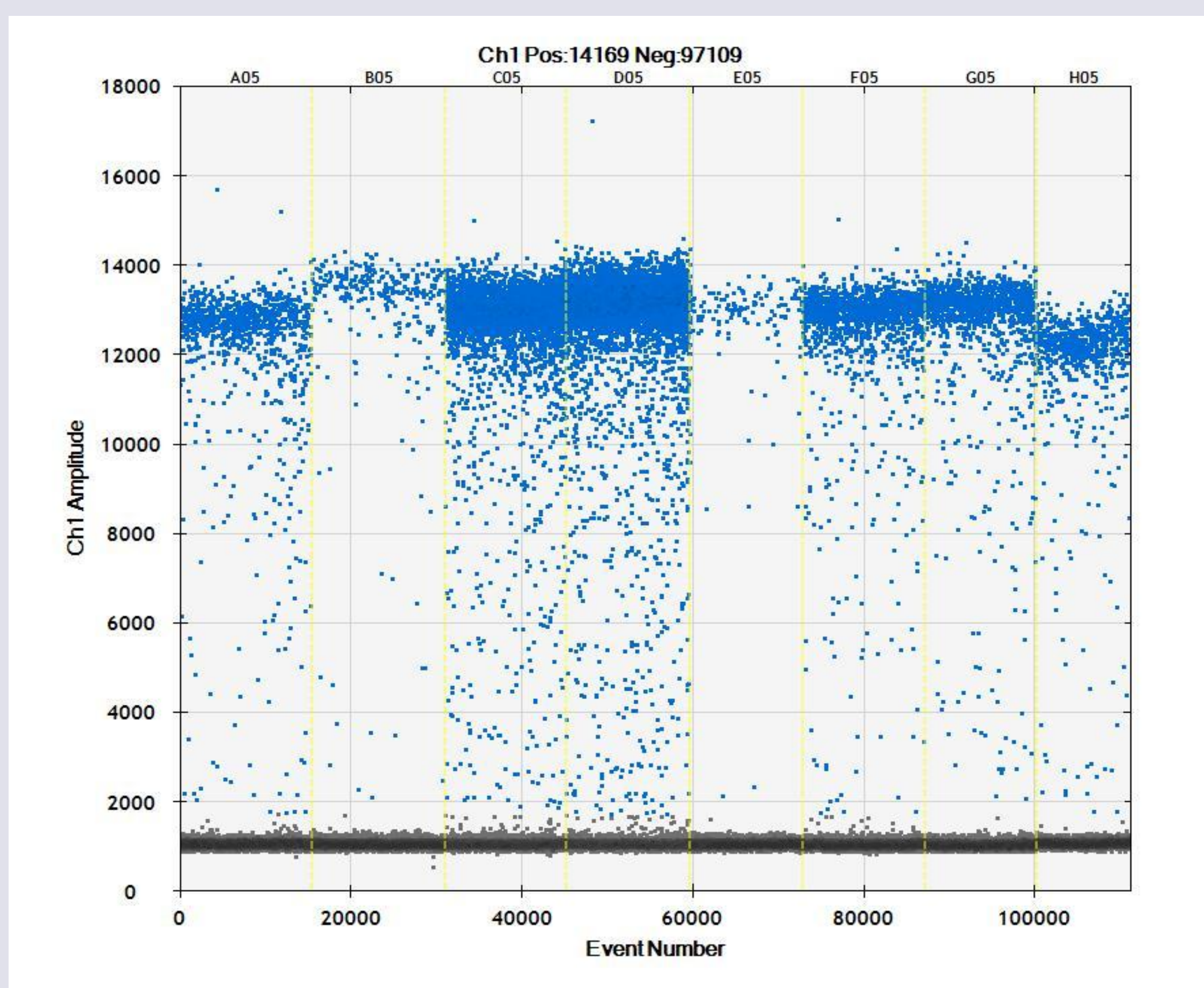
## Metylační MLPA

Během MS-MLPA reakce nejprve dochází k denaturaci vzorku. K denaturované DNA jsou poté přidány MLPA próby, které k této DNA hybridizují. Hybridizační sekvence prób musí hybridizovat na sousedící sekvence, aby mohlo dojít k ligaci prób a následně k jejich amplifikaci. Součástí metylačního kitu je několik methylyace-specifických prób. Vzorky jsou po hybridizaci rozděleny na dvě části. V jedné probíhá běžná MLPA reakce detekující numerické změny chromosomu. V druhé části jsou vzorky vystaveny trávení methylyace-senzitivnímu restriktivnímu enzymu *HhaI* a poskytují informace o metylačním stavu zkoumané sekvence. Pokud se methylyace-specifické próby hybridizují na nemethylovanou DNA, jsou ligovány a zároveň tráveny enzymem *HhaI*. Tyto próby pak nejsou amplifikovány a nemohou poskytovat žádný konečný signál.



## ddPCR

Digital droplet PCR je metoda při níž se provádí velké množství PCR v droplettech z vodo-olejové emulze. Vzorek je rozdělen do několika tisíc těchto dropletů a v každé této kapce probíhá individuální PCR reakce. K detekci amplifikovaných templátů se používají podobné metody jako při klasické Q-PCR, tedy fluorescenční detekce. Zásadním rozdílem oproti klasické Q-PCR je právě rozdělení na dropletty a konečný výstup reakce kdy vidíme počet kopií naší hledané sekvence.

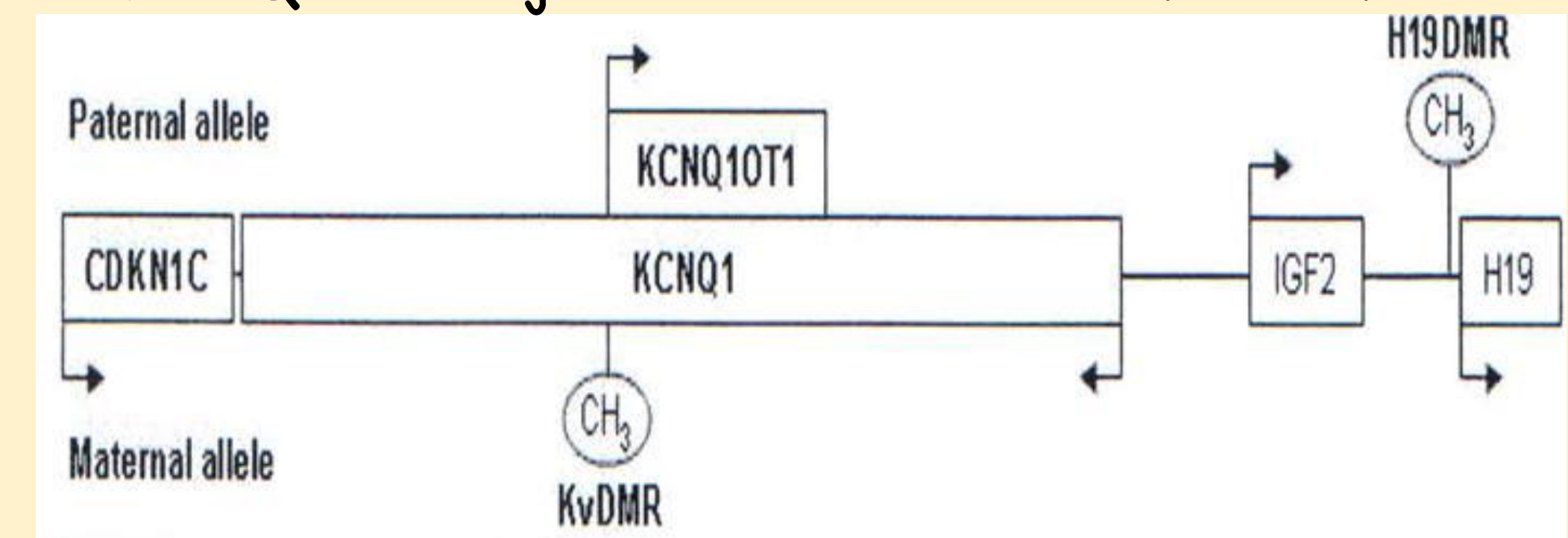


## Gen H19

Gen *H19* je přepisován, ale není převáděn v protein. Produktem je 2,3 kb dlouhá nekódující molekula RNA. Tato RNA je silně exprimována během embryogeneze, ale jelikož podléhá imprintingu, gen exprimuje pouze z maternální alely, protože paternální alela je metylována.

## Gen *KCNQ1OT1* a *CDKN1C*

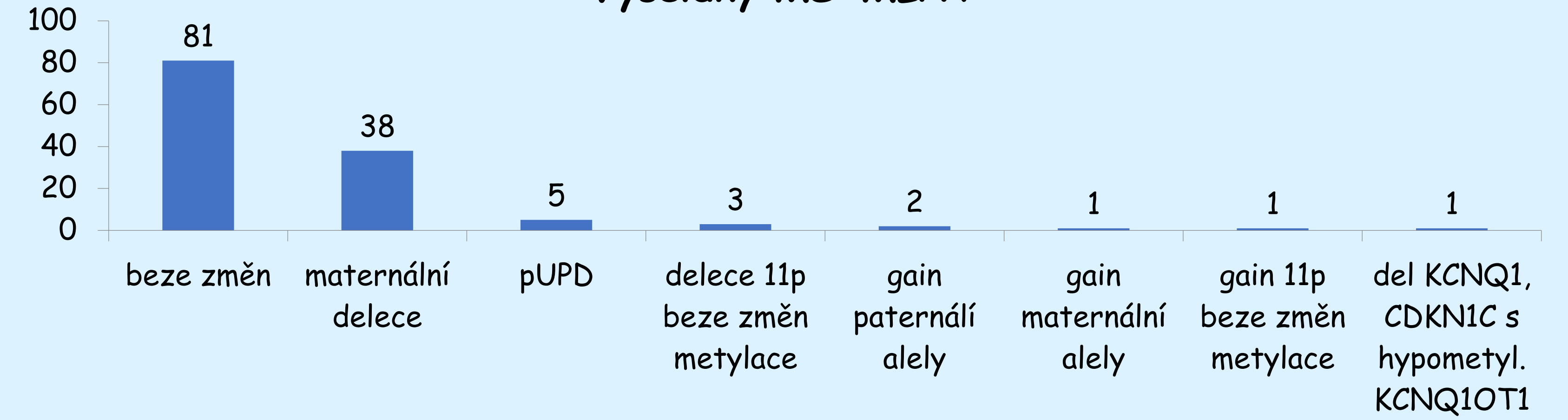
Gen *KCNQ1OT1* je vlastně antisensní transkript, který se nachází uvnitř 10. intronu genu *KCNQ1*. Gen *KCNQ1OT1* obsahuje CpG ostrůvky, které jsou na maternální alele metylovány a exprimuje se tedy z alely paternální. Přičemž exprese genu *KCNQ1* je na paternální alele umlčena, tento gen je exprimován z alely maternální. *KCNQ1OT1* RNA pomáhá regulovat geny, které jsou nezbytné pro normální růst a vývoj před narozením. Exprese genu *KCNQ1OT1* ovlivňuje maternálně exprimovaný gen *CDKN1C*, což je gen pro cyklin-dependentní kinasový inhibitor, který negativně reguluje buněčnou proliferaci. Exprese tohoto genu z paternální alely je znemožněna genem *KCNQ1OT1* a jeho interakcí s chromatinem.



## Výsledky:

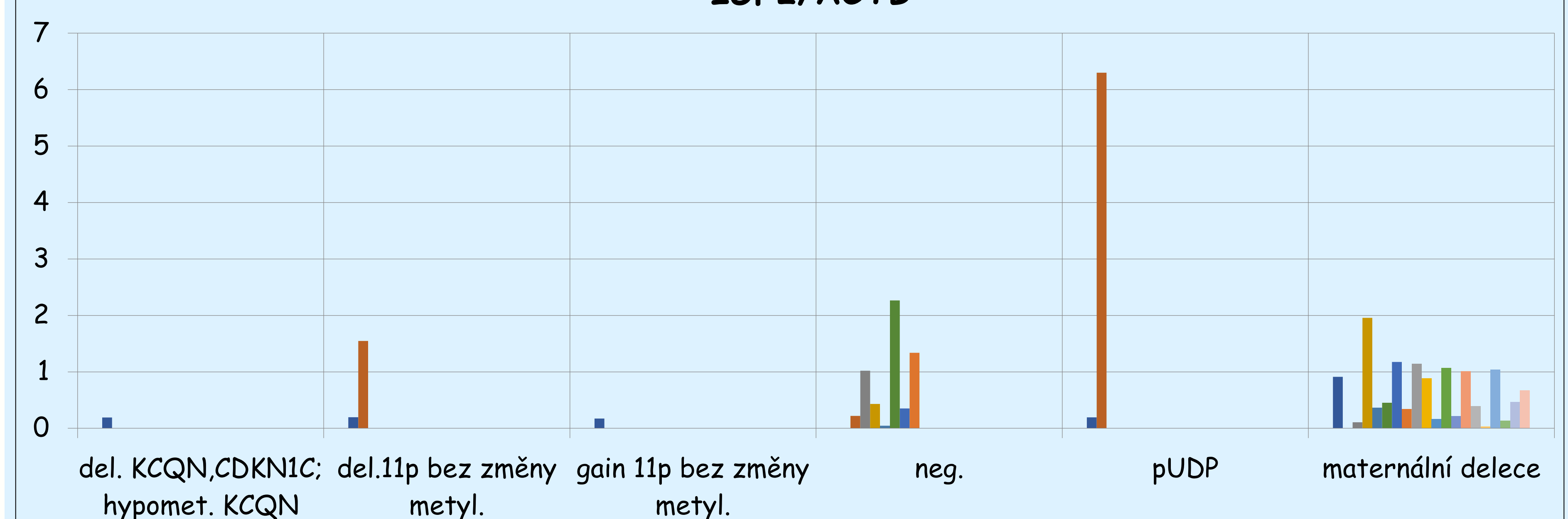
Pomocí MS-MLPA techniky jsme vyšetřili 132 vzorků DNA a našli jsme 7 různých změn ve sledované oblasti. Nejpočetnější skupinou jsou vzorky beze změn ve sledované oblasti tj. 81 vzorků. Nejčastější změnou v dané oblasti je maternální delece, kterou jsem zaznamenal u 38 vzorků. Druhou nejpočetnější změnou je paternální uniparentální disomie (pUPD), kterou jsem prokázal u 5 vzorků. Dalšími zaznamenanou změnou byla delece 11p beze změny metylace - 3 vzorky, gain paternální alely - 2 vzorky, gain maternální alely - 1 vzorek, gain 11p beze změny metylace - 1 vzorek a delece genů *KCNQ1* a *CDKN1C* s hypometylací *KCNQ1OT1*.

## Výsledky MS-MLPA

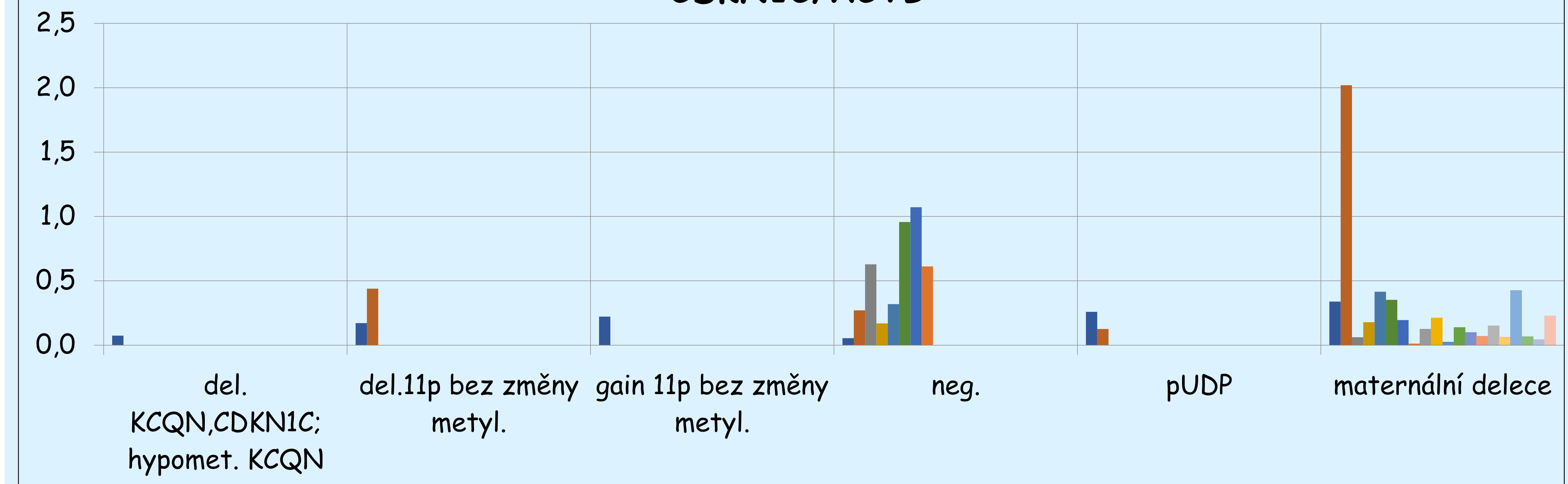


Pomocí metody ddPCR jsme určili absolutní expresi 34 vzorků. Tato vyšetřená skupina obsahovala 20 vzorků s maternální delecí, 8 vzorků beze změn, 2 vzorky s pUPD, 2 vzorky s delecí 11p beze změny metylace, 1 vzorek s gainem 11p beze změny metylace a 1 vzorek s delecí *KCNQ1* a *CDKN1C* s hypometylací *KCNQ1OT1*. K porovnání vzorků jsme použili vždy poměr sledovaného genu/kontrolnímu genu. Výslední hodnoty jsou znázorněny v následujících grafech.

## *IGF2/ACTB*



## *CDKN1C/ACTB*



## Závěr:

Pomocí MS-MLPA techniky jsme našli 7 druhů změn ve sledované oblasti z nichž nejzajímavější je pUPD, které v této oblasti není s PPGL spojováno. Při stanovení exprese genů *IGF2* a *CDKN1C* jsme zjistili, že i v rámci jedné změny jsou exprese mnohem různorodější než jsme očekávali. Z tohoto důvodu vyšetříme pomocí Q-RT-PCR všechny vzorky a pokusíme se zjistit co dalšího může expresi těchto genů ovlivňovat.