

Mechanizmy epigenetyczne w rozwoju mięśniaków macicy

– rola modyfikacji m⁶A RNA oraz genów kodujących enzymy determinujące jej poziom



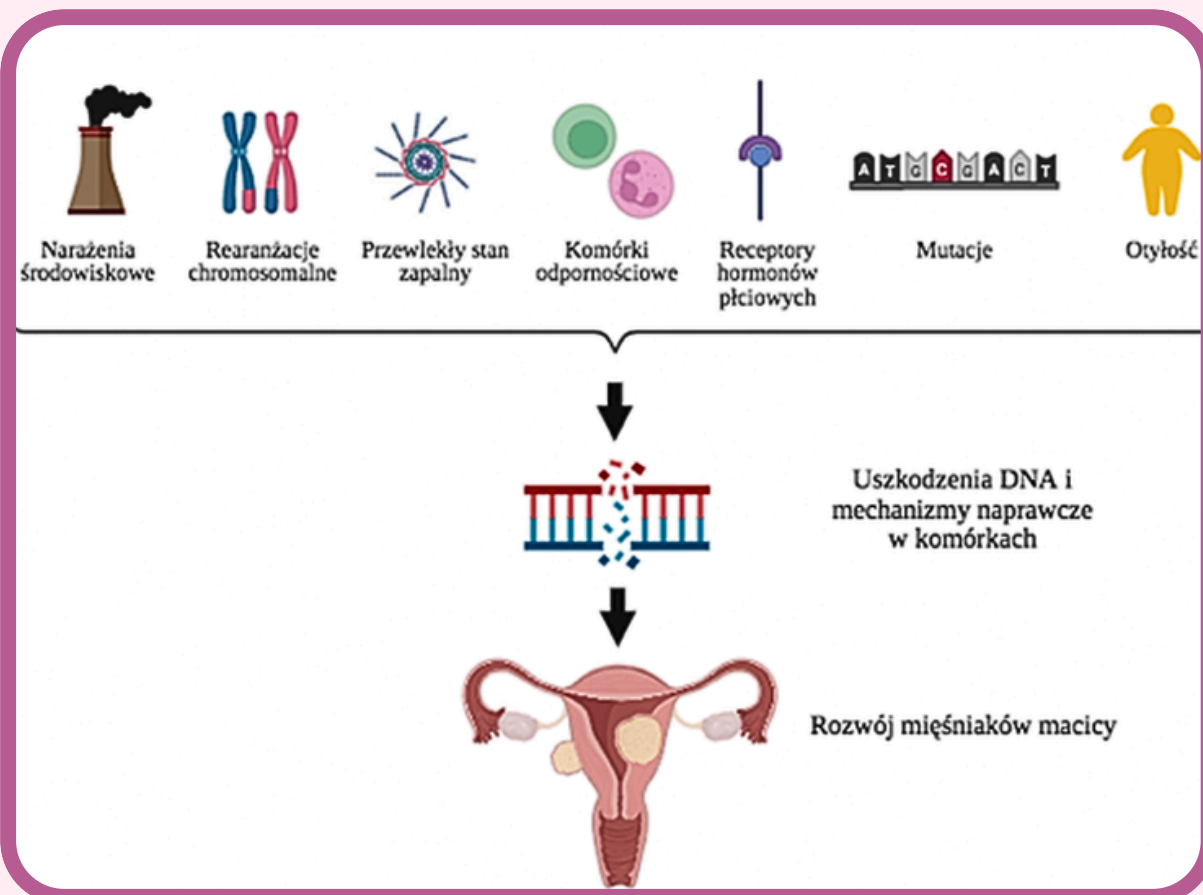
Dominika Tekień

Promotor pracy: dr Marta Włodarczyk

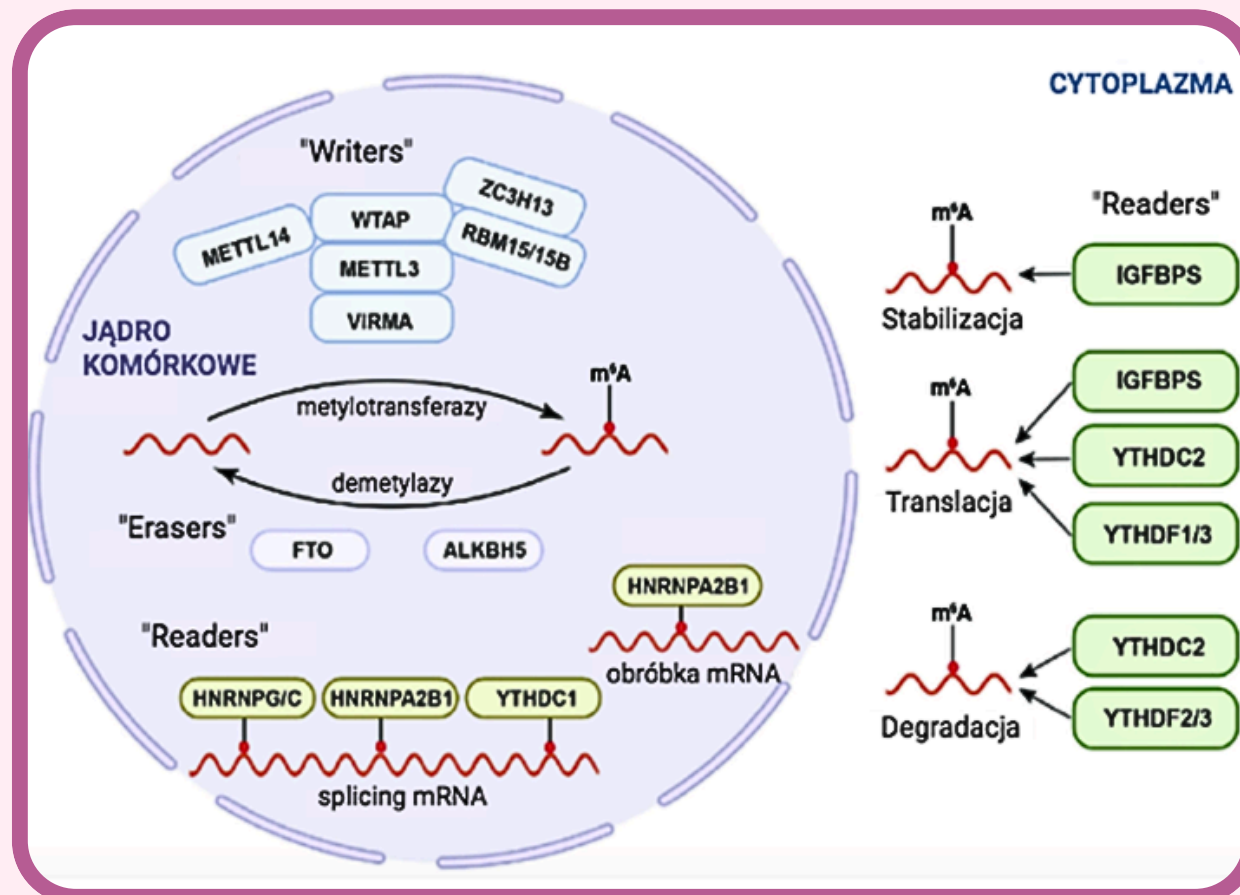
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki | Wydział Farmaceutyczny | Warszawski Uniwersytet Medyczny

WSTĘP

Mięśniaki macicy, łagodne nowotwory monoklonalne, są jedną z najczęstszych patologii układu rozrodczego kobiet, wywodzących się z mięśniówki macicy. Mimo, że w większości przypadków nie dają objawów, czasem mogą prowadzić do istotnych dolegliwości obniżających jakość życia. Ich rozwój zależy od czynników hormonalnych, genetycznych, ale także środowiskowych. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie epitranskryptomiką i mechanizmami epigenetycznymi, które mogą modulować ekspresję genów bez zmian w sekwencji DNA. Obecność modyfikacji cząsteczek RNA, **N6-metyloadenozyny (m⁶A)**, wpływa na dojrzewanie transkryptów, ich stabilność, translację oraz degradację. Poziom m⁶A zależy od aktywności metylotransferaz, demetylaz oraz białek wiążących m⁶A, takich jak **ALKBH5, FTO, METTL3** i **YTHDC1**. Ich rola w rozwoju mięśniaków macicy nie została dotąd określona.



Główne czynniki rozwoju mięśniaków macicy



Modyfikacja m⁶A RNA oraz regulacja mRNA

CEL PRACY

Ocena poziomu N6-metyloadenozyny (m⁶A) oraz ekspresji genów **ALKBH5, FTO, METTL3** i **YTHDC1** w tkankach mięśniaka macicy i prawidłowego myometrium.

GRUPA BADANA

Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem materiału tkankowego pobranego od 34 pacjentek (średni wiek: 43,6 lat; BMI ≥ 25: u około 74%) leczonych chirurgicznie z powodu objawowych mięśniaków macicy w Warszawskim Instytucie Zdrowia Kobiet w okresie od kwietnia 2022 do kwietnia 2024 r. Materiał kontrolny stanowiły fragmenty prawidłowego myometrium pobrane ok. 1,5 cm od tkanki mięśniaka. U każdej pacjentki wykonano pomiar mięśniaków w badaniu ultrasonografii przezpochwowej (TVUS), a z wywiadu lekarskiego pozyskano dane kliniczne (m.in. przebyte ciążę, masa ciała, choroby współistniejące).

METODYKA

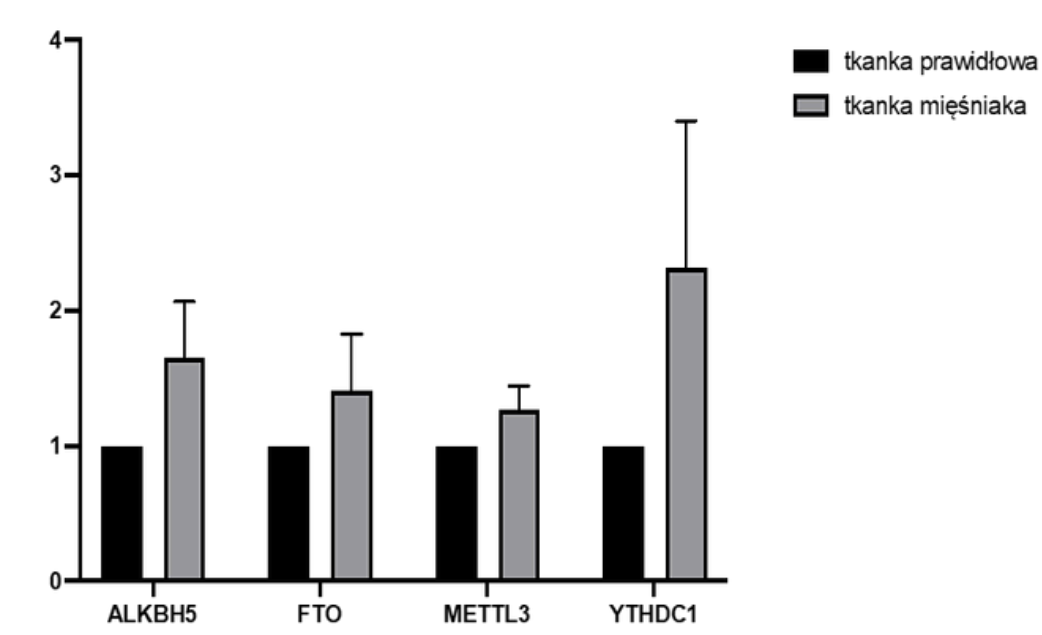
RNA z tkanek wyizolowano przy użyciu zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology). Stężenie i czystość RNA oceniano nanospektrofotometrem UV-Vis (Quawell Q5000). Do syntezy cDNA zastosowano zestaw High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Ekspresję genów **ALKBH5, FTO, METTL3** i **YTHDC1** oznaczano metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR na aparacie Viiia 7) z sondami TaqMan, której analizie dokonano względem genu referencyjnego GAPDH, a do obliczeń zastosowano względną metodę Livaka (2^{-ΔΔCq}). Globalny poziom metylacji m⁶A RNA oznaczano ilościowo testem kolorymetrycznym ELISA (EpiQuik™ m⁶A RNA Methylation Quantification Kit, EpigenTek), a wynik wyrażano jako m⁶A% w całkowitym RNA. Analizy statystyczne wykonano w programie GraphPad Prism 10, stosując m.in. test t-Studenta, dwuczynnikową analizę wariancji (two-way ANOVA) oraz analizę korelacji/regresji liniowej; za istotne przyjęto p < 0,05.

WNIOSKI

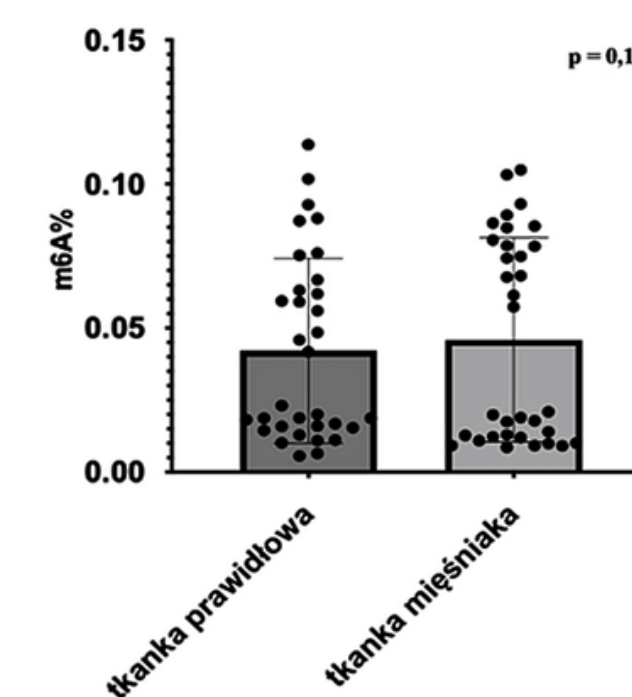
- Nie potwierdzono istotnej roli metylacji m⁶A RNA w rozwoju mięśniaków macicy.
- Tkankę mięśniaka cechowała wyższa ekspresja genów **ALKBH5, FTO, METTL3** i **YTHDC1** w porównaniu do tkanki prawidłowej.
- Korelacja pomiędzy globalnym poziomem m⁶A RNA a ekspresją genów **ALKBH5** oraz **YTHDC1**, niezależnie od pochodzenia badanej tkanki, potwierdza udział badanych genów w regulacji procesu metylacji m⁶A RNA.
- Wpływ otyłości na zaburzenia mechanizmów epigenetycznych w mięśniakach macicy wymaga dalszych badań.

WYNIKI

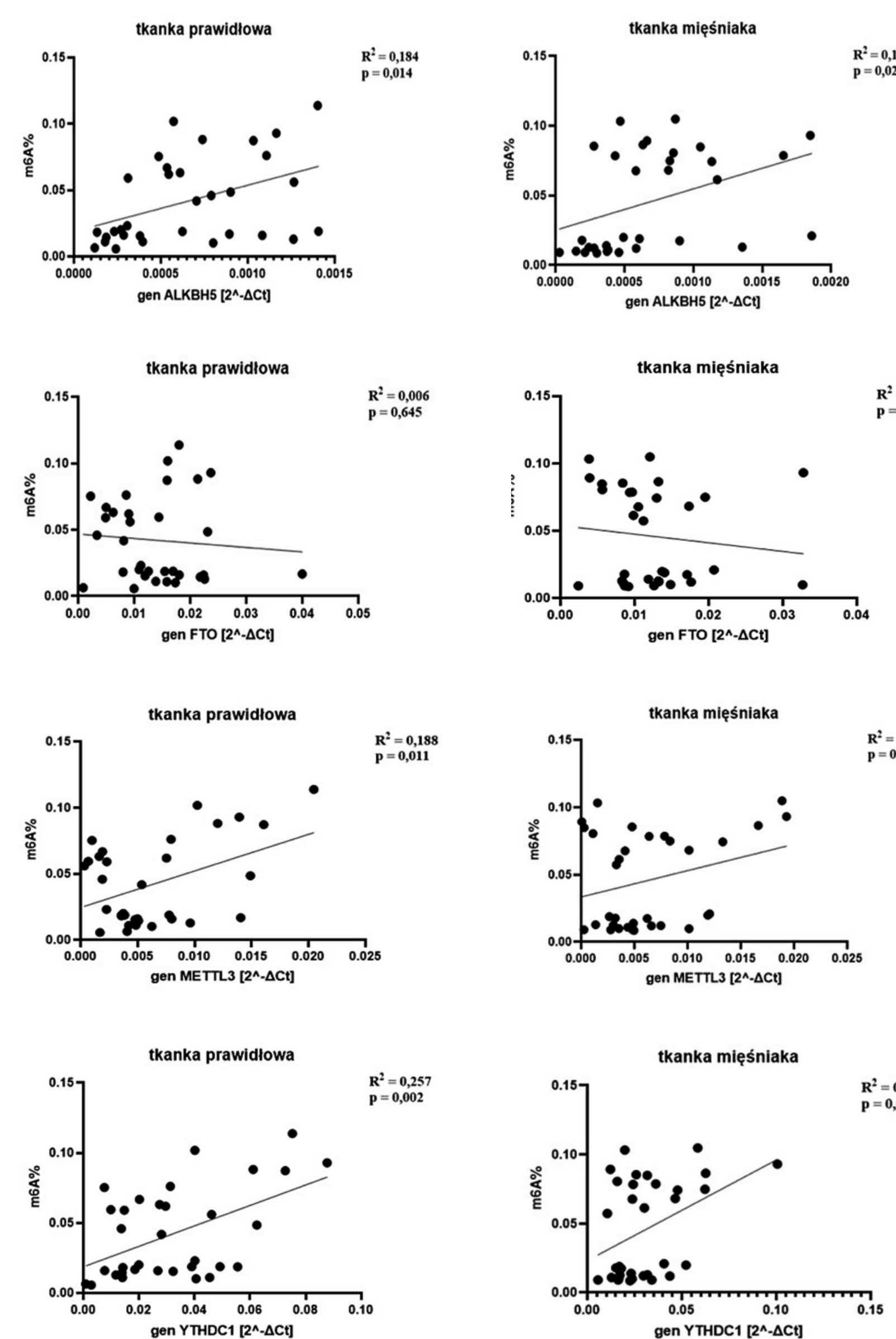
Obserwowano nieznaczne zwiększenie ekspresji genów **ALKBH5, FTO, METTL3** oraz **YTHDC1** w tkankach mięśniaka względem tkanek prawidłowych. Gen **ALKBH5** wykazał podwyższoną ekspresję u 59% pacjentek, **FTO** i **METTL3** u 44%, a **YTHDC1** u 53%. Średni poziom ekspresji względnej genu **YTHDC1** w mięśniakach był ponad dwukrotnie wyższy niż w zdrowym myometrium (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA; p=0,034).



Poziom metylacji m⁶A był nieznacznie wyższy w tkankach mięśniaka (zakres: 0,006% - 0,114%) w porównaniu do tkanek prawidłowych (zakres: 0,007% - 0,105%).



Analiza regresji liniowej wykazała istotne statystycznie dodatnie korelacje między ekspresją genów **ALKBH5** (R²=0,184; p=0,014), **METTL3** (R²=0,188; p=0,011) i **YTHDC1** (R²=0,257; p=0,002) a globalnym poziomem m⁶A w tkankach prawidłowych. W tkankach mięśniaka korelacje były słabsze oraz z większym rozrzutem danych. Gen **FTO** nie wykazał istotnych korelacji w żadnej z tkanek.



Istotnie niższy poziom metylacji m⁶A obserwowano w tkankach mięśniaka u kobiet z nadwagą lub otyłością (0,036% vs 0,077%; p=0,003). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji badanych genów między grupami BMI.

