

זיהוי מקור מחלות באמצעות מודיפיקציות על היסטונים ב-DNA

שבדמ

מעין אפרתי, שירה גז, יעל גת ותומר מוז - תיכון ליד"ה 2019

במהלך העבודה ליינו את החוקרים גבריאל פיאלקוף וד"ר איסראא שרקיה במעבדה של פרופ' ניר פרידמן במכון למדעי החיים, האוניברסיטה העברית, ירושלים.

מבוא

בכל תא בגוף של אדם מסוים נמצא כל הגנום שלו, ולכן לכל תא יש את הפוטנציאל לבטא את כל הגנים הקיימים ב-DNA. הבקרה על ביטוי הגנים בתאים שונים היא אשר גורמת לשונות בין התאים בגוף. תא כבד ותא לב, למשל, צריכים לבצע פעולות שונות כדי שכל אחד מהאיברים יתפקד כראוי, לכן בכל תא מושתקים גנים מסוימים ומשועתקים גנים שונים בהתאם.

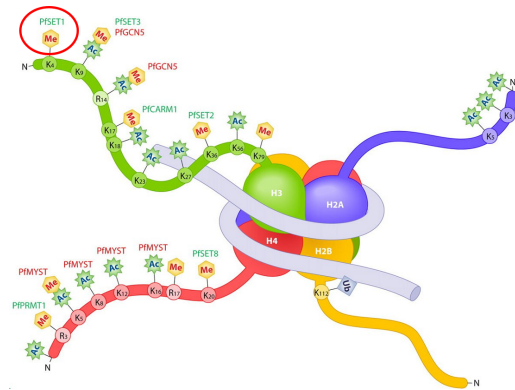
אחד ממנגנוני הבקרה מבוסס על חיבור של קבוצות כימיות שונות לחלבונים הנושאים את ה-DNA, הנקראים היסטונים. ההיסטונים מסודרים בנוקלאוזומים - קבוצה של שמונה היסטונים המחוברים יחד, וסביבם מלופפים גדילי ה-DNA. צירוף זה של היסטונים ו-DNA נקרא כרומטין, כך שבכל כרומטין יש כמה נוקלאוזומים. למיקומן של הקבוצות הכימיות על ההיסטונים ולסוגן יש קשר למידת השעתוק של הגן¹.

כאשר תא מת, ה-DNA שהיה בגרעינו מפורק לקטעים קצרים על ידי אנזימים שחותכים אותו באזורים הנגישים שאינם מלופפים סביב ההיסטונים ונקראים לינקרים. כך מהכרומטין מתקבלים נוקלאוזומים בודדים, שהם קטעים באורך של 150-200 נוקלאוטידים, ושבהם יש קבוצת היסטונים אחת. בעקבות התפרקות התא, הנוקלאוזומים יוצאים אל הסביבה - במערכות החיצוניות כמו העור ומערכת העיכול, הנוקלאוזומים יוצאים החוצה מהגוף; במערכות הפנימיות הנוקלאוזומים משתחררים לדם. הקשר של ה-DNA להיסטונים חזק מאוד, לכן המבנה של הנוקלאוזומים נשמר כאשר הם משתחררים אל הדם. לאחר שה-DNA החתוך השתחרר אל הדם, הוא נקרא cfDNA (כלומר circulating free DNA)².

המודיפיקציות הכימיות מופיעות על "זנבות" ההיסטונים, כלומר על שרשראות חומצות אמיניות שמחוברות להיסטונים. מודיפיקציות אלו משפיעות על מידת הצפיפות של הכרומטין ועל קישור של חלבונים שונים ל-DNA. כרומטין צפוף מאוד לא יכול להיות משועתק ולכן הגנים שעליו לא יתורגמו לחלבון; כרומטין שאיננו צפוף ניתן לקריאה ולכן הגנים שעליו יוכלו לעבור שעתוק ואז תרגום. בנוסף, המודיפיקציות משמשות או מפריעות לזיהוי של הכרומטין על ידי חלבונים שונים, כך שקטע DNA שעובר שעתוק וקטע DNA שלא עובר שעתוק יסומנו באופנים שונים.

¹ [Histone modifications](#), אתר חברת abcam

² [Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA](#), Yuval Dor



המחשה של מבנה הנוקלאוזום. החוט האפור הוא קטע ה-DNA אשר כרוך סביב ההיסטונים. ההיסטונים הם העיגולים הצבעוניים במרכז האזור, ולכל אחד מהם יש "זנב" היוצא ממנו ומתאים לו בצבעו. על זנבות אלו נמצאות המודיפיקציות. המודיפיקציה שאיתה עובדים בניסוי נמצאת על ה"זנב" של היסטון 3 ובאזור היא מוקפת בעיגול. למרות שבאזור מוצגת קבוצת מתיל אחת במודיפיקציה זו, בניסוי מתעסקים עם מודיפיקציה שבה שלוש קבוצות מתיל.

המחקר שראינו מתמקד במודיפיקציה ספציפית מסוג מתילציה - H3K4me3, שהיא קבוצה של שלושה מתילים (CH₃) שיושבים על החומצה האמינית ליזין (K) שנמצאת בעמדה 4 של היסטון 3. המתילציה הזו מופיעה רק על היסטונים באזור של פרומוטור פעיל או של פרומוטור שהיה פעיל בזמן האחרון, והיא תמצא בכל נוקלאוזום שעליו גן פעיל. כיוון שיש גנים שמתבטאים רק באיבר אחד או ברקמה אחת בגוף, המודיפיקציה הזו תימצא בפרומוטור של גנים אלו רק בתאים של רקמה ספציפית. בעזרת ריצוף ה-DNA ושיוך המודיפיקציות שעל ההיסטונים לגנים הייחודיים לרקמה מסוימת - ניתן לגלות מאיזה איבר או רקמה בגוף הגיע ה-cfDNA.

מטרת המחקר שראינו היא אבחון מחלות שבהן מתרחש מוות של תאים בעזרת דגימות דם פשוטות. בעזרת פענוח המתיציות שעל ההיסטונים וריצוף קטעי ה-DNA המתקבלים בניסוי, ניתן לזהות מאיזה סוג תא הגיע ה-cfDNA, והאם הגן שאותו בודקים היה פעיל או לא פעיל בתא זה בחלון זמן מסוים. כך ניתן להסיק, על ידי דגימת cfDNA מהדם, באיזה איבר מתים כעת תאים רבים יחסית, ולאבחן איברים חולים או פגועים. כמו כן השיטה מאפשרת לאבחן איזה גנים מתבטאים בצורה לא תקינה, כלומר האם הם מתבטאים יותר מדי או פחות מדי. במצבים מסוימים, ניתן יהיה לאבחן את המחלה באמצעות גילוי הרקמה הפגומה, כיוון שראינו מוות מסיבי של תאים ממנה, ובמצבים אחרים ניתן יהיה לדעת איזה גנים בתאי הרקמה פעלו/לא פעלו כך שנגרמה מחלה.

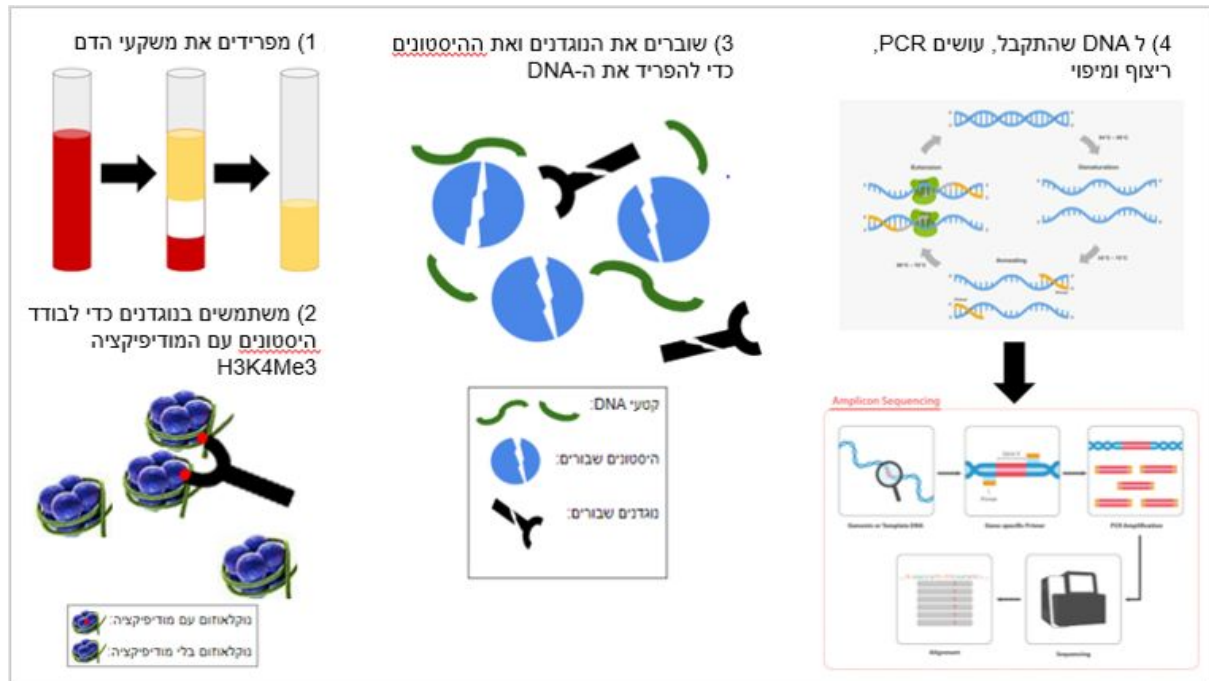
היתרון של שימוש בזיהוי מתילציות על נוקלאוזמים על מנת לאתר את מקור התא המת, הוא שהקשר בין ה-DNA להיסטונים חזק מאוד והמודיפיקציות על ההיסטונים נשמרות גם לאחר שחרור ה-DNA לדם, ולכן הבדיקה של המתילציה יעילה. בנוסף, למתילציות יתרון נוסף: הגנום בתא מרקמה מסוימת יסומן באותה מתילציה בכל התאים מרקמה זו בכל האנשים. אם בתא לבלב, ורק בתא לבלב, הגן של אינסולין פעיל, אז על הפרומוטור של גן זה תמצא אותה המתילציה בכל בני האדם. לכן, אם נלקחה דגימה של DNA והרצפ זוהה

כרצף הפרומוטר של הגן של אינסולין, ועל הכרומטין הנ"ל הייתה המתילציה, ניתן לדעת שכרומטין זה הגיע מתא לבלב שמת.

שאלת המחקר שלנו היא האם ניתן לאבחן מחלות בבני אדם על ידי זיהוי רקמות מהן משתחרר DNA לדם לפי האפיגנטיקה של ה-cfDNA. השערתנו היא שניתן יהיה לגלות איזה איבר חולה לפי מציאת מקורם של קטעי ה-cfDNA ששוחררו לדם. אנו מניחים כי ניתן יהיה לגלות את מקור המחלה כיוון שלפי המתילציות על ההיסטונים שמחוברים לקטעי ה-cfDNA ניתן לגלות מאיזו רקמה הגיע קטע ה-cfDNA, וכיוון שהדרך לזיהוי המתילציה בה משתמשים בניסוי ידועה כיעילה ונוחה לשימוש.

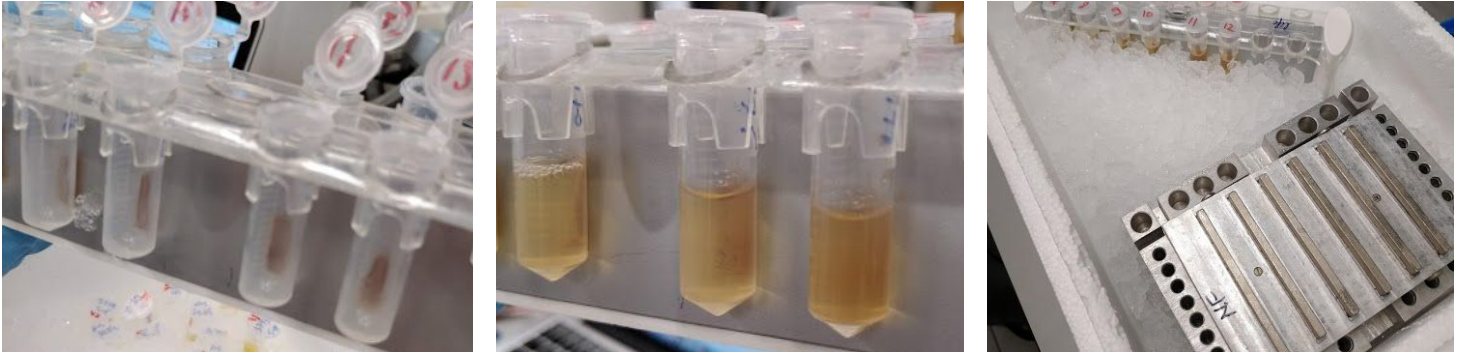
שיטות

שאלת החקר של הניסוי אותו ראינו היא: האם ניתן לאבחן מחלות בבני אדם על ידי זיהוי רקמות מהן משתחרר DNA לדם לפי האפיגנטיקה של ה-cfDNA. האורגניזם הנחקר בניסוי הוא בני אדם. מאחר ובשלב זה עדיין נבחנת אמינות השיטה, החוקרים עובדים עם DNA של חולים במחלה מאובחנת ומנסים לראות אם הם מצליחים להגיע לאותו איבחון בשיטה החדשה. בניסוי שבו צפינו, נבדק ה-DNA של בני אדם החולים בסרטן המעי הגס שטרם עברו טיפול במחלתם.



הניסוי מתחיל בלקיחת דגימת דם מאדם. מפרידים את רכיבי הדם בעזרת צנטריפוגה כך שהפלזמה (נוזל הדם ללא גורמי קרישה) מופרדת מתאי הדם הלבנים והאדומים, בגלל הצפיפויות השונות של אלה. מוציאים את תאי הדם, ומתקבלת מבחנה המכילה פלזמה בלבד. לפלזמה מכניסים מעכב פרוטאז שמונע מהפרוטאז בדם לפרק את ההיסטונים, ובופר שמווסת את רמת החומציות כך שתגיע ל- pH 7.4. כעת, למבחנה מכניסים חרוזים (בידים) מגנטיים, אשר להם מחוברים נוגדנים. נוגדנים אלו ספציפיים למודיפיקציה H3K4me3, הנמצאת בערך על אחוז אחד מתוך הנוקלאוזומים שב-cfDNA. כפי שהסברנו, סביב נוקלאוזום שעליו מודיפיקציה זו נמצא פרומוטור של גן "מוכן לפעילות". מדגירים את המבחנות עד לקישור הנוקלאוזומים לנוגדנים שעל הבידים.

מציבים ליד המבחנות מגנט שמושך אליו את הבידים המגנטיים. לבידים אלו מחוברים הנוגדנים אשר קשורים לנוקלאוזומים שעליהם המודיפיקציה המבוקשת. תהליך זה של קשירת הנוקלאוזומים לנוגדנים נקרא ChIP. אחרי תהליך ה-ChIP מוציאים מהתמיסה את הפלזמה, שוטפים את תוכן המבחנה כמה פעמים עד שנותרים במבחנה רק בידיים שאליהם קשורים נוקלאוזומים נושאי המודיפיקציה הספציפית בתמיסה של pH 7.4.



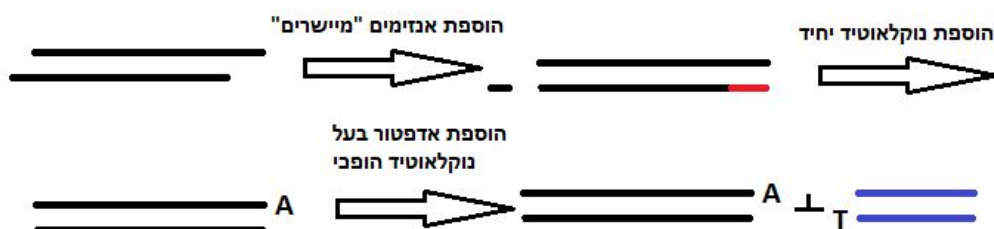
בצד ימין ניתן לראות את המגנט שבו משתמשים בשטיפות כדי לרכז את הבידים. בתמונה האמצעית ניתן לראות את הבידים (בצבע חום) נצמדים למגנט שמאחוריהם כשהם עוד בתוך הפלזמה. בתמונה השמאלית הבידיים נשארים צמודים למגנט לאחר שהוציאו את הפלזמה.

לאחר מכן מכניסים לתמיסה שני אנזימים. האנזים הראשון משלים/חותך את קצוות גדילי ה-DNA כך שיהיו "blunt" (כלומר שני הגדילים נגמרים באותו זוג בסיסים). יש צורך לוודא שגדילי ה-DNA שווים באורכם, כיוון שבהמשך הניסוי יחברו לקטעים אלה אדפטור, דבר שמתאפשר רק כאשר קצוות הגדילים באורכים שווים. כדי שהאנזים יוכל להשלים את הקצוות מכניסים לתמיסה נוקלאוטידים, מגנזיום, ATP, בופר ואנזים מעכב פרוטאזות. האנזים השני אשר מכניסים לתמיסות מזרחן את הקצה של גדיל ה-DNA שאיננו מזורחן כך שניתן לחבר לקצוות ה-DNA את האדפטורים. כדי ששני האנזימים יעבדו זה אחר זה, מכניסים את המבחנות לאינקובטור שמחמם אותן לטמפרטורות האופטימליות של שני האנזימים זו אחר זו.



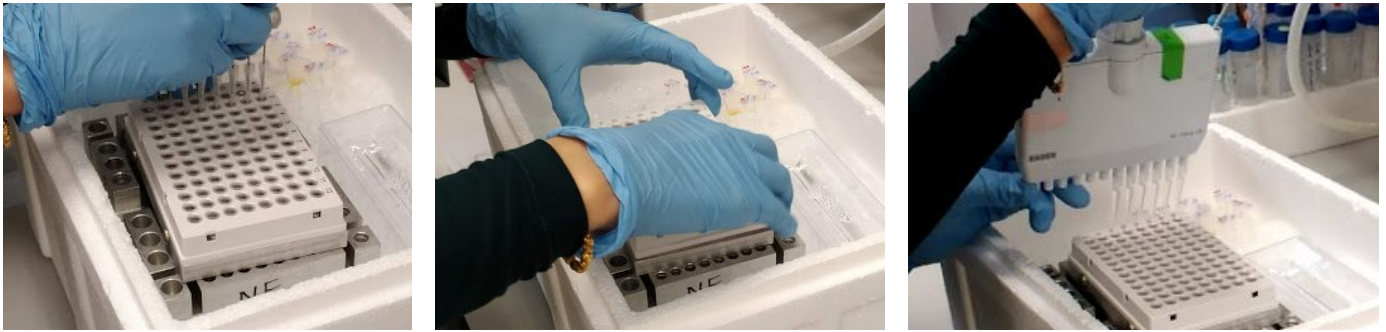
הרחפת הבידים בבופר

לאחר שמוציאים את המבחנות מהאינקובטור, מכניסים למבחנה אנזים שמחבר נוקלאוטידים לרצפי ה-DNA. כיוון שהנוקלאוטיד היחיד אשר נכניס למבחנה הוא A, האנזים יחבר אל קצוות ה-DNA שבנוקלאוזומים נוקלאוטיד A אחד. למבחנה מוסיפים גם את האנזים ליגאז ואדפטור, שהוא רצף נוקלאוטידים אשר אנו קובעים מראש. האדפטור ישמש כפריימר לריאקציה PCR. האנזים ליגאז עושה ליגאציה ומחבר את האדפטורים לקטעי ה-DNA המזורחנים.



בשלב זה כבר אין צורך בהיסטונים ולכן מכניסים למבחנות את האנזים פרוטאז, שהורס את כל החלבונים. כעת גם ההיסטונים הרוסים, וגם הנוגדנים (אשר קישרו בין הבידים לבין הנוקלאוזומים) הרוסים.

נפטרים מהבידים קושרי הנוגדנים ומוסיפים למבחנות בידים חדשים קושרי DNA. בעזרת שטיפות נפטרים משברי ההיסטונים והנוגדנים, ומכל החומרים שהיו במבחנות עד כה. מנתקים את ה-DNA מהבידים ומקבלים DNA "נקי" ללא תוספות. מוסיפים למבחנות פריימרים משלימים לאדפטורים, נוקלאוטידים ו-DNA פולימראז ומבצעים ריאקציה PCR.



שלבי השטיפות: הרחפה בנוזל של הבידים, ערבוב בעזרת הזזת מגנט מצד לצד, ושאיבה של הנוזל.



תוצר השטיפות - הבידים שוקעים לתחתיות הבאריות בהן בוצעו השטיפות.



מכונת PCR

מכשיר ה-PCR משכפל את הפרומוטרים של הגנים הפעילים של התאים המתים מדגימת הדם שנלקחה מהאדם. זאת על מנת שאת ה-DNA שיתקבל ישלחו לריצוף, ולרצפים המתקבלים ייעשה מיפוי לגנום. ההעברה של הגנים ל-PCR מאפשרת לייצר יותר עותקים של הגן באמצעות שכפול חוזר. בתחילת התהליך, ה-DNA מחומם כך שגדיליו יופרדו. לאחר מכן מוכנסים לתמיסה פרומוטורים שמתאימים לאדפטור אותו חיברנו לגנים מוקדם יותר, והם נצמדים ל-DNA בעזרת קירור התמיסה. לתמיסה מוכנס גם DNA פולימראז עמיד בחום שמשכפל את גדילי ה-DNA. כעת התהליך חוזר על עצמו שוב ושוב, עד שמתקבלים מספר רב של עותקים מכל גן.

בניסוי ישנן כמה בקורות. הראשונה מביניהן היא בקרה המתמקדת באספקט הביולוגי של הניסוי, והיא DNA מבני אדם בריאים. את מספר החזרות של הגנים שב-cfDNA של הנבדקים הבריאים אנחנו משווים למספר החזרות של הנבדקים החולים כדי לדעת מהי כמות החזרות התקינה ומה יוצאת הדופן. כמות חזרות זו מצביעה על ביטוי מוגבר של הגן בתאי האדם, או על מוות מוגבר של התאים מהם הוא מגיע.

הבקרה השנייה היא בקרה טכנית על הניסוי, והיא משתמשת ב-DNA של תאי שמרים. גם בנוקלאוזומים של שמרים קיימת המודיפיקציה H3K4Me3 ובשמרים הספציפיים המשמשים לבקרה ידוע מספר הנוקלאוזומים הנושאים מודיפיקציה זו. בתהליך של הבקרה הזו, יחד עם קטעי DNA של האדם אותו אנו בודקים, מכניסים למבחנה גם נוקלאוזומים של תאי שמרים. ניתן לדעת על כמה מהם קיימת המודיפיקציה וכך לדעת כמה מהם יופיעו בסוף הניסוי, כאשר יתקבל מספר החזרות שלהם. התוצאות על תאי השמרים יושוּו עם התוצאות שיש לקבל, וכך ניתן לגלות אם המערכת פועלת כראוי ואם התוצאות של בני האדם אמינות. (ההבחנה בין ה-DNA של האדם ל-DNA של השמרים נעשית בשלב המיפוי, ע"פ ההבדל ברצף).

הקבועים בניסוי הם כל התנאים בהם נמצאים קטעי ה-DNA, אשר כוללים: טמפרטורה, חומציות, תמיסה ותכולתה, ומספר החזרות על כל תהליך שמתבצע (שטיפה/ צנטריפוגה).

תוצאות

בתחילה, קיבלנו תוצאות שהתקבלו מדגימות שנלקחו מעשרה אנשים בריאים ומשני אנשים חולים שאובחנו כחולים בסרטן המעי הגס. בדגימה של כל אדם נמדד מספר הפרומוטרים המחוברים להיסטון הנושא את המודיפיקציה H3K4Me3 ב-40,000 מקומות בגנום.

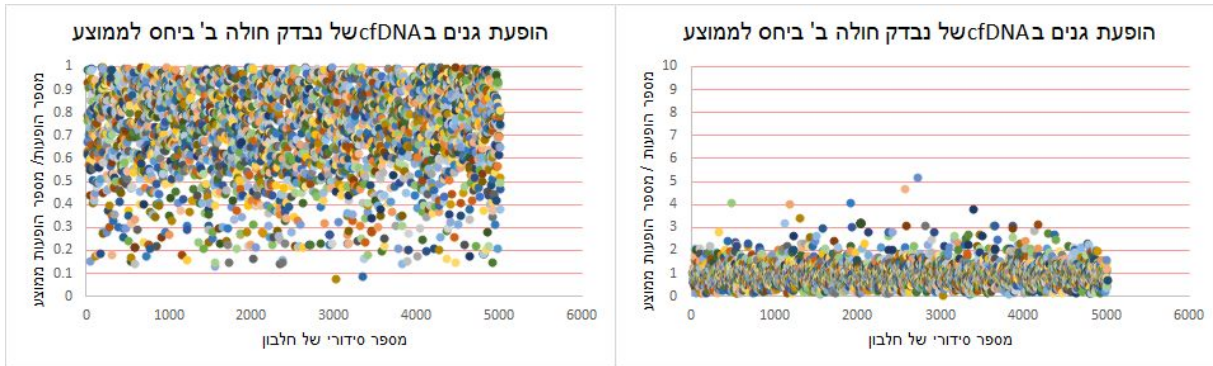
בשלב זה, התחלנו לעבד את התוצאות. חישבנו את ממוצע ההופעות של כל גן עבור קבוצת האנשים הבריאים. כדי לפסול מקומות אשר מספר הופעותיהם בדם משתנה באופן טבעי גם בין בני אדם בריאים חישבנו את סטיית התקן ובחרנו רק גנים שסטיית התקן שלהם קטנה יחסית. הוצאנו מהרשימה גם גנים שלא היו להם קריאות בכלל או שמספר הקריאות היה קטן מ-1.

בגנים שנותרו השונו את מספר הקריאות בכל אחד מהחולים ובאדם בריא אחד (כביקורת) לממוצע הקריאות בבריאים, ע"י חלוקת הממוצע עבור כל גן במספר הקריאות שהתקבל אצל כל נבדק – וכך יכולנו לדעת פי כמה גבוהה/נמוכה כמות הגן שנמצאה אצל הנבדקים מהממוצע של האנשים הבריאים.

תוצאת החלוקה מהווה תשובה לשאלה "פי כמה היה שונה מספר ההופעות אצל כל נבדק ממספר ההופעות הממוצע בבריאים?".

התוצאות מוצגות בגרפים להלן, בשתי רזולוציות שונות: פעם אחת כאשר על ציר ה-Y – ערכים בין 1 ל-10, המדגישים את הגנים שהופיעו אצל הנבדק יותר פעמים מהממוצע, ופעם אחת כאשר על ציר ה-Y – ערכים בין 0 ל-1 המדגישים את הגנים שהופיעו אצל הנבדק פחות מהממוצע. על ציר ה-X מוצג המספר הסידורי של כל גן. כל נקודה על הגרף מייצגת גן ואת מספר ההופעות שלו.





ניתן לראות כי אצל האדם הבריא, מספר ההופעות היה תמיד קרוב לממוצע - הן בקנה מידה של 1 - 10 והן בקנה מידה של 0-1. כל הגנים הופיעו אצל האדם הבריא לא פחות מחצי פעמים מהממוצע ולא יותר מפי 1.5 מהממוצע. כלומר - אצל האדם הבריא, לא ראינו מצב בו הייתה כמות חריגה של גנים מסוימים בדמו. לעומת זאת, אצל שני החולים, ראינו מצב שונה בתכלית. גנים רבים הופיעו אצל החולים משמעותית פחות מהממוצע - לעיתים אפילו פי חמישה. גם בסקאלה שבין 1 - 10 ראינו שינויים משמעותיים מאוד: אצל החולים מצאנו גנים שהופיעו פעמים רבות בהרבה מהממוצע, וגנים מסוימים הופיעו פי שישה ואפילו שמונה מהממוצע.

כאשר בדקנו את הגנים שמספר ההופעות שלהם היה שונה במידה הרבה ביותר יחסית לממוצע הבריאים זיהינו 3 גנים מעניינים.

בין הגנים שהביטוי שלהם היה גבוה משמעותית בשני החולים יחסית לממוצע הבריאים מצאנו את הגן MYC^3 שידוע שבגידולים סרטניים רבים יש ביטוי עודף שלו. בין הגנים שהביטוי שלהם היה נמוך בשני החולים משמעותית מהממוצע מצאנו את הגן $GNG2^4$ שדווח בספרות שהביטוי שלו יורד בגידולים סרטניים מסוימים. ממצאים אלו יכולים להעיד כי השוני בין תוצאות החולים לתוצאות הבריאים נובע כתוצאה מסרטן. גן נוסף שהביטוי שלו היה נמוך יחסית אצל החולים הוא $NFE2^5$ שהוא גן המתבטא במגה קריוציטים. באנשים בריאים DNA ממגה קריוציטים מרכיב חלק משמעותי מהcfDNA, ויתכן שהקריאות שלו יורדות בחולים בגלל שיש יותר cfDNA מתאים אחרים ולכן אחוז DNA ממגה קריוציטים נמוך יותר. ממצא זה מחזק את ההשערה כי העליה בכמות הפרומוטרים המחוברים להיסטון הנושא את המודיפיקציה H3K4Me3 נובעת ממות מוגבר של תאים, עליה נרחיב בהמשך.

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3345192/>

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365811/>

⁵ <https://en.wikipedia.org/wiki/NFE2>

דיון

שאלת החקר אשר בה עסקנו הייתה "האם ניתן לאבחן מחלות בבני אדם על ידי זיהוי רקמות מהן משתחרר דנ"א לדם לפי האפיגנטיקה של ה-cfDNA?" הניסוי בודק האם ניתן לזהות תמותה מוגברת של תאים מרקמה מסוימת. תמותה זו לא בהכרח אומרת שיש שיבוש בביטוי הגנים ברקמה: בהתקף לב, למשל, מתים תאים בריאים ולא רק תאים שיש שיבוש בביטוי הגנים בתוכם. במקביל, בניסוי מנסים לבדוק אם אפשר לזהות שינוי בביטוי גנים ברקמה המתה (כלומר האם גן או מספר גנים מסוימים מבטאים ברמה גבוהה או נמוכה יותר מהרגיל), כיוון שחלק מהמחלות נובעות מבעיה של בקרה על ביטוי גן. תוצאות הניסוי יכולות לרמז על הסיבה למות התאים, כך שהחוקרים יוכלו לאחר מכן לעזור להתאים טיפול.

השיטה בה החוקרים משתמשים לא מתאימה לאבחון כל המחלות. למשל - היא לא מתאימה לזיהוי מקורן של מחלות מדבקות. הסיבה לכך היא שבמחלות מדבקות, מקור המחלה הוא לא בעיה ב-DNA של האדם, אלא בגורם חיצוני הפולש לגוף האדם - וירוס או חיידק. המחקר לא יכול להתבצע על DNA של וירוס או של חיידק, כיוון שאין להם היסטונים ולכן אין להם מתילציות על ההיסטונים. כמו כן אנחנו לא יודעים להתאים להם פריימרים ספציפיים. אם החיידק או הוירוס גורם למוות של תאים, השיטה המוצעת תזהה את ה-cfDNA בדם אך לא תזהה את הגורם למוות. בנוסף, השיטה מתאימה לאבחון של מחלות בהן נגרם מוות של תאים בלבד, כיוון שרק בהן ניתן להיעזר באבחון ב-cfDNA של תאים מתים.

מהלך הניסוי כולל שלבים רבים בהם חלק מה-DNA שהיה בדם הולך לאיבוד (לא כל הנוקלאוזומים נקשרים לנוגדנים, וחלק מה-DNA הולך לאיבוד בשטיפות החוזרות). מתוקף כך, ישנו תמיד סיכוי שאבדו לאורך התהליך גנים שאנחנו מחפשים בניסוי, וכתוצאה מכך התוצאות לא יהיו מייצגות. כיוון שהניסוי כן הצליח, ניתן להסיק שמאותה הסיבה שבגללה "אבדו" גנים רלוונטיים, "אבדו" גם גנים שאינם רלוונטיים, ביחס זהה ליחס שבו גנים אלו נמצאו מלכתחילה. בשל כך התוצאות מייצגות וניתן להסתמך עליהן.

מכיוון ששיטת הניסוי הצליחה להראות שתוצאות הבדיקות של הבריאים אינן כמו אלה של החולים, ושהגנים בהם יש הבדל בין הדגימות ייחודיים לאיבר החולה, הניסוי מוגדר כהצלחה. המסקנות מהניסוי, אם כן, תואמות את ההשערה שלפיה ניתן לגלות איזה איבר חולה לפי מציאת מקורם של קטעי ה-cfDNA ששוחררו לדם. כיוון שתוצאות הניסוי עונות באופן ברור על השאלות שהובילו אליו, לא מצאנו דרכים בהן אפשר לשפר את הניסוי.

בשני החולים יכולנו לראות שרמת הביטוי של גנים רבים שונה באופן משמעותי מממוצע הבריאים. אנו יודעים שבתאים מרקמות שונות מתבטאים גנים שונים כתוצאה מתהליכי התמיינות של העובר, בכך מתבטא עיקרון התאמת מבנה לתפקוד, מכיוון שמבנה האיבר נקבע ע"י סוגי התאים בריקמותיו. תהליכי התמיינות אלו קשורים קשר ישיר למחקר שלנו מכיוון שהוא עוסק בהיסטונים שבאמצעותם מתבצעים תהליכים אפיגנטיים של הפעלה או השתקת גנים. לפי מידע שקיבלנו מהחוקרים, גנים רבים שביטויים היה גבוה ב-cfDNA של החולים הם גנים שביטויים אופייני לתאי מעי גס. העובדה הזאת מצביעה על הבדל בתמותת התאים במעי הגס אצל החולים לעומת הבריאים.

ניתן לדעת על המחלה דברים נוספים מהדגימה. לדוגמא, ביטוי גבוה בהרבה מהממוצע של האונקוגן MYC הצביע על סבירות גבוהה ששני החולים חולים בסרטן. בנוסף, אצל חולה א' ישנו שינוי קיצוני יותר ביחס לאדם הבריא לעומת השינוי של חולה ב'. ניתן להניח שעובדה זו נובעת מהבדלים בין שני הגידולים הסרטניים (אף על פי ששניהם סרטן מאותו סוג) כמו למשל הבדל בשלב ההתקדמות של הסרטן. ניתן לשער שחולה א' בעל גידול בשלב מתקדם יותר מאשר חולה ב', מכיוון שהיחס בין כמות הגנים שלו לזו של ממוצע הבריאים קיצוני יותר.

לפני שקיבלנו את התוצאות, עמדה בפנינו השאלה "על מה מצביע מספר הופעות גבוה של גן מסוים בתוצאות?" לשאלה זו הצענו שני פתרונות אפשריים. הראשון הוא שבשל המחלה, בתוך התאים של רקמה מסוימת היה שעתוק מוגבר של הגנים שגרמו למחלת הסרטן, ולכן כאשר תאים אלו מתו בסופו של דבר, הגנים הסרטניים הופיעו יותר פעמים מאשר גנים אחרים באותו התא. הפתרון האפשרי השני הוא שיותר תאים של הרקמה החולה מתו בסך הכל, ולכן כל הגנים ששועתקו בתאי הרקמה הופיעו פעמים רבות יותר מאשר במצב תקין - כולל הגנים הסרטניים. לפי תוצאות הניסוי, יש לשער שההסבר השני הוא הנכון. זאת כיוון שגנים רבים הייחודיים למעי הגס ואינם קשורים לסרטן התבטאו פעמים רבות גם הם. לא ניתן להסביר שינוי זה באמצעות ביטוי מוגבר של גנים בלבד, משום שגם גנים שהסרטן לא משפיע עליהם התבטאו פעמים רבות באופן יחסי. כלומר, ההסבר ההגיוני הוא שתאי הרקמה מתו בקצב מהיר יותר מהרגיל, וזאת הסיבה לביטוי הגנים השונים יותר מהממוצע.

בנוסף, גילינו שיש קשר בין סרטן לבין מוות מוגבר של תאים. הסבר אפשרי לכך הוא שגידולים סרטניים דורשים כמות גדולה של דם, כיוון שהתאים החולים מתחלקים ללא הפסקה. זוהי דוגמא להתפתחות וחלוקה לא תקינה של תאים. אצל אדם בריא, תא מתחלק לפי אותות מסביבתו ולפי המידע הגנטי שלו. בתא סרטני, לעומת זאת, התא מתחלק באופן לא רצוי בשל טעות ברצף הגנטי. כיוון שיש חלוקה מוגברת של התא, הגוף מתקשה לספק לרקמה הסרטנית את כמות הדם הדרושה לה, משום שהגוף לא ערוך לחלוקה כה מוגברת של תאים. בשל כך, התאים הסרטניים לא יקבלו מספיק דם, וייסבלו ממחסור בחומרים הדרושים לקיומם, שיוביל למוות של חלקם⁶.

ישנם מחקרים נוספים אשר מחפשים שיטות יעילות להשתמש ב-cfDNA כדי לאבחן מחלות ולמצוא את מקורן. שיטה אחת קוראת את רצף ה-DNA ומחפשת מוטציות בו, על מנת לזהות מחלות הנגרמות ע"י מוטציות. שיטה שנייה משתמשת במתילציות הנמצאות על ה-DNA עצמו ומשנות גם הן את מידת הפעילות של הגנים. מתילציות אלו נוצרות כבר בשלב העוברי, והן משתנות כתלות ברקמה, ונשארות על קטע ה-DNA לאורך כל חייו של האדם. בשיטה זו מחפשים מתילציות לא תקינות ב-cfDNA, כיוון שלעיתים מתילציות כאלו הן הגורם למחלה.

שיטה שלישית עליה קראנו היא השיטה של יובל דור. שיטה זו משתמשת גם היא במתילציות על ה-DNA, אך בה מחפשים מתילציות תקינות. בעזרתן, כמו בעזרת המתילציות על ההיסטונים, ניתן למצוא את המקור של

⁶ [ScienceDirect - Circulating \(cell-free\) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases](#)

ה-cfDNA, כלומר את הרקמה ממנה הגיע. השיטה הרביעית היא של פרידמן, והיא חדשנית כיוון שבה יש שימוש ב-DNA שהשתחרר לדם כשהוא עדיין במבנה הנוקלאוזום, ולכן עדיין מחובר להיסטונים נושאי מודיפיקציות. המחקר של פרידמן יעיל יותר מהמחקר של דור כיוון שמתילציות על היסטונים, לעומת מתילציות על קטעי DNA, הן קצרות-טווח, כך שבאמצעותן ניתן לגלות לא רק מאיזו רקמה הגיע ה-cfDNA, אלא גם איזה גנים התבטאו בתא לפני שמת, וכך לאפיין את הגורם למות התאים.

מכיוון שהמחקר בו צפינו התמקד ביכולת לאבחן את המחלה בעזרת מציאת מיקומה, אנו מציעים בהמשך לבדוק מה ניתן לדעת על טיב המחלות בעזרת שיטת מיפוי גנים פעילים ב-cfDNA. אחת האפשרויות שמחקר כזה פותח היא השאלה "האם ניתן להסיק במחלות מסויימות את חומרתן לפי כמות התאים המתים מאותו אזור?". במקרה של גידולים סרטניים, כמו הניסוי בו צפינו, אפשר לנסות לענות על שאלה זו על ידי בדיקה של סוג הגידול לפי המרקרים האפיגנטיים של תאי הגידול המתים. לדוגמא, ידוע על סרטן המעי הגס שישנו הבדל מולקולרי ומבני בין גידולים באזורים שונים של המעי⁷. ניתן לבדוק בדגימות מחולי סרטן המעי הגס, האם ישנו מכנה משותף ברור להתבטאות הגנים בגידולים מאותו סוג ובמידה וכן האם ניתן להבדיל בין סוגי הגידולים בעזרת קריאת מרקרים אפיגנטיים בלבד.

⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6089587/>

מקורות מידע

1. אתר abcam, ערך "Histone modifications" (נלקח מהכתובת
<https://www.abcam.com/epigenetics/histone-modifications> בתאריך 19.12.19)
2. Lehmann-Wermana, Roni et al (2016): **Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA**. PNAS Published online March 14, 2016 pp. E1826–E1834
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1519286113
3. אתר NCBI, ערך "MYC on the Path to Cancer" (נלקח מהכתובת
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3345192> בתאריך 24.12.19)
4. אתר NCBI, ערך "Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines" (נלקח מהכתובת
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365811> בתאריך 24.12.19)
5. אתר ויקיפדיה, ערך "NFE2" (נלקח מהכתובת <https://en.wikipedia.org/wiki/NFE2> בתאריך 24.12.19)
6. אתר ScienceDirect, ערך "Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases" (נלקח מהכתובת
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579307000944> בתאריך 27.12.19)
7. Baran, Burcin et al (2018): **Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature**. Gastroenterology Res.11(4): 264–273
 doi: [10.14740/gr1062w](https://doi.org/10.14740/gr1062w)
 אוחר בתאריך 27.12.19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6089587>