

**1/48/2001**

**3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.**

**RP 5. Fej-nyaki-laphámrákok genetikai  
rizikótényezői és molekuláris diagnosztikája illetve  
prognosztikája**

**Dr. Kásler Miklós  
Országos Onkológiai Intézet**

***RP5. Fej-nyaki-laphámrák genetikai rizikótényezői és molekuláris diagnosztikája illetve prognosztikája. Témavezető: dr. Kásler Miklós***

1. A környezeti és genetikai predispozíció biomarkeres vizsgálata a fej-nyaki laphámrák kialakulásában
2. Residuális tumorsejtek, recidívák és másodlagos primer tumorok kimutatására alkalmas genetikai markerek.
3. Genetikai károsodások összehasonlító vizsgálata dohányzó és nem dohányzó fej-nyak daganatos betegekben.
4. A fej-nyak daganatok prognosztikai és terápiás markerei.

***2. Residuális tumorsejtek, recidívák és másodlagos primer tumorok kimutatására alkalmas genetikai markerek***

**Bevezetés, célkitűzés**

A fej-nyak daganatok genetikai változásainak vizsgálata kitűnő modellként szolgál arra, hogy a környezeti carcinogének hatását molekuláris szinten elemezzük. A környezeti carcinogének elsődleges támadáspontja a genom stabilitását biztosító regulációs rendszer (p53, DNS javító enzimek, stb.). Ennek megfelelően a p53 mutációk mind a fej-nyak tumorokban, mind tüdőrákokban gyakoriak és az adott tumortípusra jellegzetesek. A fej-nyak daganatok biológiai viselkedésére általánosan jellemző, hogy a primer tumor megjelenését követő 5 éven belül másodlagos, synchron vagy metachron tumorok alakulnak ki. Ez a jelenség vezette Slaughter és mtsait (1994), hogy fej-nyak daganatok kialakulására a „field cancerization” hipotézist javasolják. A szájüregi daganatok nagyrésze laphámrák, ezért histológiai vizsgálattal nehéz megítélni, hogy az újonnan megjelenő daganat recidíva vagy másodlagos primer tumor. A p53 mutációs pattern segítséget nyújthat ezen dilemma eldöntésére. A daganatok kialakulásával kapcsolatban elfogadott és többnyire igazolt az, hogy a primer daganatok és azok metasztatizálási genetikai szinten megegyezők, vagyis a daganatok monoclonális eredetűek. Vizsgálataink egyik célkitűzése az, hogy a p53 mutációt clonális markerként használjuk. A jellegzetes mutációs „hot spot” alapján lehetővé válik a recidívák és másodlagos tumorok megkülönböztetése. Az épnél látszó tumor melletti nyálkahártya p53 statusának meghatározása alkalmas lehet a residuális tumorsejtek kimutatására és a tumor locoregionális kiújulásának megakadályozására.

Vizsgálatainkban ezért 152 fej-nyak daganatban és a tumor melletti ép nyálkahártyában meghatároztuk a p53 mutáció és p53 codon 72 gén polimorfizmusát.

**Anyag és módszer**

Szöveti minták

152, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> – T<sub>3</sub>N<sub>2</sub> fej-nyak daganatos beteg tumoros és ép szöveti mintáit vizsgáltuk az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán. Valamennyi tumort szövettanilag laphámráknak diagnosztizálták, amelyek differenciáltsági foka közepes vagy rosszul differenciált volt. A daganatok 57,2%-a metasztatizált és 17,7%-a recidivált. A betegek a mintavételt megelőzően nem részesültek sugár-, illetve kemoterápiás kezelésben.

Western blot analízis

A -180°C-ra fagyasztott tumoros és normál szövet mintákat golyós malommal porítottuk és RIPA pufferben 1 ml/g szövet homogenizáltuk. 5-20 µg fehérjét 7,5-12,5% SDS tartalmú

polyacrylamid gélen elektroforetizáltunk. A gélen szétválasztott fehérjéket elektromos úton Immobilon P membránra vittük át. A fehérjéket (p53, mdm2, Cyclin D, p16, hMLH1, Cadherin E, Bcl-2, Bax) a megfelelő ellenanyag segítségével (Santa Cruz) azonosítottuk, alkalikus foszfatázzal konjugált másodlagos ellenanyagokkal és ezt követően NBT reakcióval vizualizáltuk. A Western blot kvantitatív kiértékelését denzitometrálással végeztük el.

### PCR/SSCP analízis

A PCR reakciókat az alábbi primerekkel végeztük:

p53 (5. exon) sense: 5'-tac-tcc-cct-gcc-ctc-aac-aa-3' and antisense: 5'-atc-gct-atc-tga-gca-gag-ct-3, Analytical Biochem. 213:19-22 (1993); p53: (8. exon) sense: 5'-cct-atc-ctg-agt-agt-ggt-aa-3' and antisense: 5'-tcc-tgc-ttg-ctt-acc-tcg-ct-3', Leukemia, Vol. 7, No 4 593-600 (1993); hMLH1 sense: 5'-ctt-gtg-tct-tct-gct-gtt-tgt-tta-3' and antisense: 5'-ccg-act-aac-agc-att-tcc-aa-3', Luce MC, Marra G, Chauhan DP, Laghi L, Carethers JM, Cherian SP, Hawn M, Binnie CG, Kam-Morgan LN, Cayouette MC, Koi M and Boland CR. In vitro transcription/translation assay for the screening of hMLH1 and hMSH2 mutations in familial colon cancer. Gastroenterology 109: 1368-1374, 1995; hMSH2 sense: 5'-ttt-aaa-tga-gat-gtt-tag-gcc-3' and antisense: 5'-gta-aaa-att-tca-tgt-gaa-ggg-3', Nature Genetics 8:405-410 (1994); E2F4 sense: 5'-tgg-tcc-tcc-tgt-gtc-tgg-gtt-3' and antisense: 5'-agg-gag-gta-gaa-ggg-ttg-g-3', Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova, GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimnizu K, Matsubara N and Meltzer SJ. Frequent mutation of the E2F4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. Cancer Res. 57: 2350-2353, 1997

A PCR termékeket 95%-os formamidban (1:3) denaturáltuk 98°C-on 20 percig, majd 7.5-10%-os PAGE-sel szeparáltuk.

### p53cd72

A p53 gén codon 72 polimorfizmusának vizsgálata LightCycler (Roche) olvadáspont analízissel, egy korábban kidolgozott módszer alkalmazásával történt.

(Boltze C., Roessner A., Landt O., Szibor R., Peters B., Schneider-Stock R., (2002)

*Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. Int. J. Onc. 21, 1151-1154)*

### p53 intron 6 (G→A) és intron 3 (16bp duplikáció) polimorfizmus

PCR-RFLP módszer az alábbi cikk alapján.

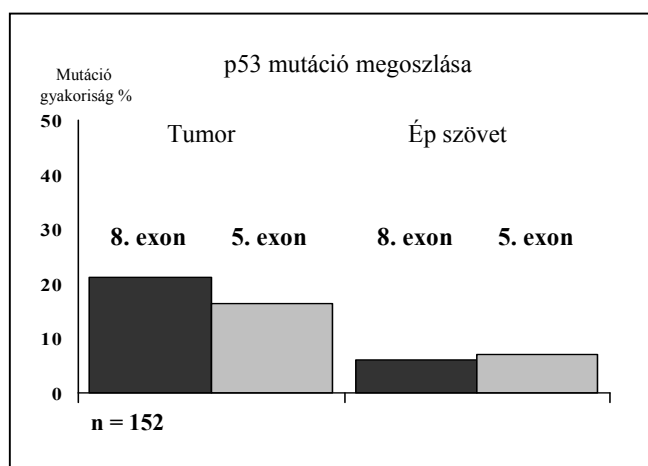
X. Wu, H. Zhao, C. I. Amos, S. Shete, N. Maman, W. K. Hong, F. F. Kadlubar, M. Spitz (2002) p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity, JNCI, 94; 681-690

## **Eredmények és megbeszélés**

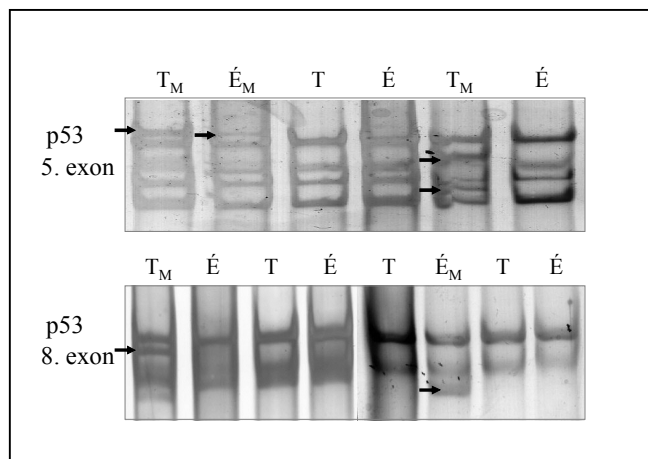
### **p53 status**

A vizsgálat sorozat alapvető célkitűzése az volt, hogy a p53 mutáció típusát primer szájüregi daganatokban és a tumortól távol eső nyálkahártyában meghatározzuk. A p53 mutáció jelenlétét PCR-SSCP analízis segítségével is meghatároztuk. Összefüggést kerestünk

a p53 mutációk előfordulása és a daganatok klinikai stádiuma között. A p53 mutációk előfordulási gyakoriságát az **1. ábra** szemlélteti. P53 mutációt a vizsgált fej-nyak daganatok 37,5%-ában mutattunk ki. A mutációkat az 5., 7., 8. exonban vizsgáltuk. A 8. exonban a p53 mutáció gyakorisága 21,2%, míg az 5. exon esetén a daganatok 16,5%-ában azonosítottuk p53 mutáció jelenlétét. Ugyanezen daganatos betegekben a tumortól távol eső nyálkahártyában 11,2%-ban (20/152) igazoltuk p53 mutáció jelenlétét (**1. ábra**). Az „ép” szövetben a p53 mutáció 6%-ban a 8. exonban, míg 7%-ban az 5. exonban fordult elő (**1. ábra**). A p53 mutációkat PCR-SSCP analízis segítségével azonosítottuk. Mutáció alkalmával eltérő elektroforetikus mobilitású csík jelenik meg, amelyet az ábrán nyíllal jelöltünk (**2. ábra**). P53 mutáció előfordul mind a tumorban (T), mind az „ép” nyálkahártyában (É).



**1. ábra.** P53 mutáció fej-nyak daganatokban és tumor melletti ép nyálkahártyában. A PCR-SSCP analízis eredményei szerint a 8. exonban 21,2%, az 5. exonban 16,3%-ban azonosítható p53 mutáció. Az „ép” nyálkahártya minták 11%-ában a p53 mutáns formában van jelen.

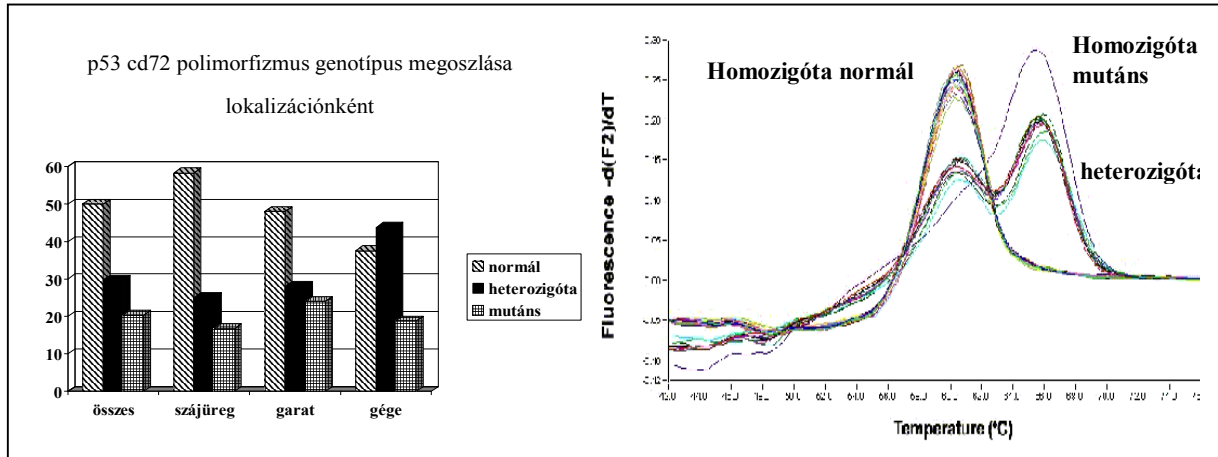


**2. ábra.** P53 mutációk kimutatása PCR-SSCP analízissel. A nyíl mutációt jelentő rendellenes mobilitású csíkra mutat. „Ép” nyálkahártyában (É) is kimutatható p53 mutáció.

A vizsgálati periódus alatt 27 betegben recidíva alakult ki. A recidívát adó primer tumorok 74%-ában (20/27) p53 mutációt lehetett azonosítani. Eredményeink arra utalnak, hogy a p53 mutáció jelenléte a tumor recidívák kialakulását valószínűsíti. A p53 mutáció előfordulása vizsgálataink szerint független a nyirokcsomó statustól.

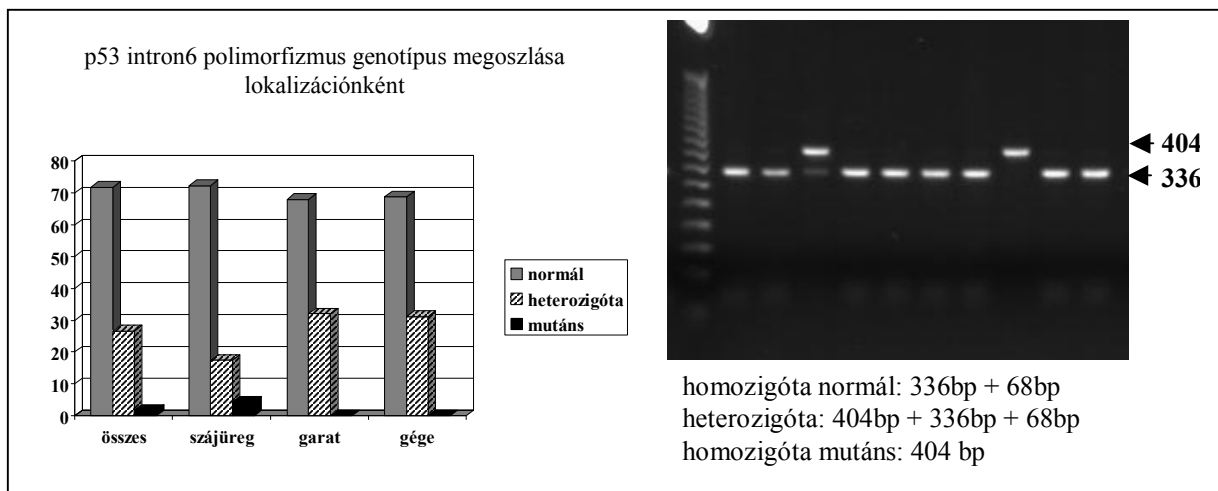
A primer tumorban és az ép nyálkahártyában (1 eset kivételével) a p53 mutáció nem azonos exonban fordul elő. Eredményeink arra utalnak, hogy a tumortól távoli „ép” szövetben, a primer tumortól független másodlagos tumor alakulhat ki. Eredményeink alátámasztják a „field cancerization” hipotézist. Ezen feltételezés szerint a folyamatos carcinogén expozíció hatására az egész szájüreg premalignus állapotba kerülhet és synchron vagy metachron multiplex tumorok alakulhatnak ki. A másodlagos tumorok kialakulásával kapcsolatban

feltételezték, hogy a primer tumorból kialakuló micrometasztázisok formájában terjed el a szájüreg nyálkahártyájában. Ha ez a feltételezés korrekt, a secunder tumorokban lévő p53 mutáció jellege a primer tumorokéval azonosságot mutatna. Eredményeink szerint a primer és secunder tumorok p53 mutációja egymástól eltérő, polyclonális. A p53 mutáció vizsgálata fejnyak daganatokban tehát előre jelzi a másodlagos tumorok kialakulásának és recidívák megjelenésének veszélyét. Ezen túlmenően alkalmas a daganat sugár- és



kemorezisztenciájának predikciójára.

**3. ábra.** A szájüregi daganatos betegek 16,7 %-a, a garat daganatosok 24,0%-a, a gégedaganatos betegek 18,8%-a hordozza a homozigóta mutáns genotípust, ez utóbbi csoport esetében a legnagyobb a heterozigóták aránya, 43,8%.



**4. ábra.** Homozigóta mutáns genotípus csak a szájüregi daganatos eseteknél fordult elő (4,3%), a garat- ill. gégerákosoknál a heterozigóták aránya (32,0% ill. 31,2%) csaknem a kétszerese a szájüregi daganatos eseteknél tapasztalt gyakoriságnak (17,4%).

A p53, a tumor szupresszor funkciója mellett fontos szerepet játszik a DNS transzkripcióban és a sejtciklus szabályozásában. A mutációk mellett számos ismert polimorfizmusa is létezik, ezek közül az intron 3 16 bp-os duplikációját, az intron 6 G→A tranzícióját és a codon 72 Arg→Pro cserét vizsgáltuk. Mivel az intron régiók előforduló mutációknak a génextpresszió szabályozásában és a DNS-fehérje kölcsönhatásokban játszanak szerepet, az itt előforduló mutációk ezt a funkciót módosíthatják. A codon 72 esetében a két változat biokémiai és biológiailag is eltérő. A p53 arginin variáns gyorsabban indukál apoptózist és a prolin

változaténál hatékonyabb a tumor szupressziója is. A p53 codon 72 SNP esetében a betegek 20,3%-a homozigóta mutáns genotípussal rendelkezik és a primer tumor lokalizációk szerint csoportosítva a garatrákos betegek esetében a legmagasabb, 24,0%, a mutáció előfordulása. A szájüregi és garatrákos csoporttól eltérően a gégerákos betegeknél kiemelkedően magas a heterozigóták aránya 43,8%. Az intron 6 és intron 3 polimorfizmusnál a homozigóta mutáns genotípus csak a szájüregi daganatos eseteknél fordult elő (4,3%), viszont a garat- ill. gégerákosoknál a heterozigóták aránya csaknem a kétszerese a szájüregi daganatos eseteknél tapasztalt gyakoriságnak (17,4%).

Vizsgálataink hozzájárulnak a fej-nyaki daganatok terápiás érzékenységének predikciójához, valamint előre jelzik a másodlagos tumorok kialakulásának és recidívák megjelenésének veszélyét.

#### ***4. A fej-nyak daganatok prognosztikai és terápiás markerei***

##### **Bevezetés, célkitűzés**

A fej-nyaki daganatok progresszióját kísérő genetikai változások közé tartozik a genetikai stabilitást biztosító gének inaktiválása (DNS mismatch gének, hMLH1, hMSH2), a sejtproliferációt gátló gének mutációja vagy allél vesztese (p16), valamint a sejtfelszíni adhéziót biztosító fehérjék mennyiségének csökkenése (Cadherin E).

Vizsgálataink annak meghatározására irányultak, hogy ezen gének (hMLH1, p16, Cadherin E, Ciklin D, APC) inaktiválása, overexpressziója alkalmas-e a recidíva hajlam felderítésére, a metasztázis hajlam megítélésére. Meghatároztuk továbbá ezen gén változások gyakoriságát a különböző anatómiai lokalizációjú (szájüreg, garat, gége) daganatokban.

A fej-nyak daganatok terápiás érzékenységének vizsgálatára meghatároztuk a CisPt érzékenységben szerepet játszó XPD polimorfizmust, a DNS mismatch repair, hMLH1 gének metilációs statusát.. A fej-nyak daganatok kezelésében új irányzatot jelen az epidermal growth faktor receptor (EGFR) gátlására alapuló terápia. Vizsgálatainkban ennek megfelelően az EGFR expressziót szabályozó intron 1 polimorfizmusát is meghatároztuk.

##### **Anyag és módszer**

###### *Szöveti minták*

152, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> – T<sub>3</sub>N<sub>2</sub> fej-nyak daganatos beteg tumoros és ép szöveti mintáit vizsgáltuk az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán. Valamennyi tumort szövettanilag laphámráknak diagnosztizálták, amelyek differenciáltsági foka közepes vagy rosszul differenciált volt. A daganatok 57,2%-a metasztatizált és 17,7%-a recidivált. A betegek a mintavételt megelőzően nem részesültek sugár-, illetve kemoterápiás kezelésben.

###### *Western blot analízis*

A -180°C-ra fagyasztott tumoros és normál szövet mintákat golyós malommal porítottuk és RIPA pufferben 1 ml/g szövet homogenizáltuk. 5-20 µg fehérjét 7,5-12,5% SDS tartalmú polyacrylamid gélen elektroforetizáltunk. A gélen szétválasztott fehérjéket elektromos úton Immobilon P membránra vittük át. A fehérjéket (p53, mdm2, Cyclin D, p16, hMLH1, Cadherin E, Bcl-2, Bax) a megfelelő ellenanyag segítségével (Santa Cruz) azonosítottuk, alkalikus foszfatázzal konjugált másodlagos ellenanyagokkal és ezt követően NBT reakcióval vizualizáltuk. A Western blot kvantitatív kiértékelését denzitometrálással végeztük el.

###### *DNS-metiláció vizsgálat*

A DNS izolálás standard fenol-kloroformos extrakcióval történt. 1 µg genomiális DNS-t emésztettünk 16 órán át 4 egység HpaII metiláció szenzitív és MspI metiláció inszenzitív restriktions endonukleázzal (Pharmacia), majd 0.5-0.5 µg emésztett DNS-sel PCR-t végeztünk, a következő primerekkel:

p16 (1. exon) sense: 5'-ctg-ctt-ggc-ggt-gag-ggg-g-3' and antisense: 5'-cct-cac-ctg-agg-gac-ctt-c-3', Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen TD, Beart RW, van Tornout JM and Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 55: 4531-4535, 1995;

hMLH1 (5. exon) sense: 5'-cgc-tcg-tag-tat-tcg-tgc-3' and antisense: 5'-tca-gtg-cct-cgt-gct-cac-3', Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM and Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57: 808-811, 1997

### PCR/SSCP analízis

A PCR reakciókat az alábbi primerekkel végeztük:

p53 (5. exon) sense: 5'-tac-tcc-cct-gcc-ctc-aac-aa-3' and antisense: 5'-atc-gct-atc-tga-gca-gag-ct-3, *Analytical Biochem.* 213:19-22 (1993); p53: (8.exon) sense: 5'-cct-atc-ctg-agt-agt-ggt-aa-3' and antisense: 5'-tcc-tgc-ttg-ctt-acc-tcg-ct-3', *Leukemia*, Vol.7, No4 593-600 (1993); hMLH1 sense: 5'-ctt-gtg-tct-tct-gct-gtt-tgt-tta-3' and antisense: 5'-ccg-act-aac-agg-att-tcc-aa-3', Luce MC, Marra G, Chauhan DP, Laghi L, Carethers JM, Cherian SP, Hawn M, Binnie CG, Kam-Morgan LN, Cayouette MC, Koi M and Boland CR. In vitro transcription/translation assay for the screening of hMLH1 and hMSH2 mutations in familial colon cancer. *Gastroenterology* 109: 1368-1374, 1995; hMSH2 sense: 5'-ttt-aaa-tga-gat-gtt-tag-gcc-3' and antisense: 5'-gta-aaa-att-tca-tgt-gaa-ggg-3', *Nature Genetics* 8:405-410 (1994); E2F4 sense: 5'-tgg-tcc-tcc-tgt-gtc-tgg-gtt-3' and antisense: 5'-agg-gag-gta-gaa-ggg-ttg-g-3', Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova, GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimnizu K, Matsubara N and Meltzer SJ. Frequent mutation of the E2F4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res.* 57: 2350-2353, 1997

A PCR termékeket 95%-os formamidban (1:3) denaturáltuk 98°C-on 20 percig, majd 7.5-10%-os PAGE-sel szeparáltuk.

### p16

Az LOH analízist a **D9S171**, **D9S161** markerekkel végeztük, a primer szekvenciák a „Genome Database” ([www.gdb.org](http://www.gdb.org)) adatbázisból származnak.

A multiplex PCR-t 50 µl térfogatban, 100 ng DNS templát, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 20 pmol primer, 1x PCR puffer és 1 U Taq polimeráz (Invitrogen) felhasználásával végeztük. Formamidos denaturálás után a mintákat Tamra jelenlétében ABI 310 készüléken POP4 polimer felhasználásával futtatuk, Genescan és Genotyper software segítségével analizáltuk.

### p16 mutációs analízis

A primer szekvenciák, és a PCR körülmények az alábbi cikkben találhatóak:

C.J. Hussussian, J. P. Struewing, A. M. Goldstein, P. A. T. Higgins, D. S. Ally, M. D.

Sheahan, W. H. Clark Jr., M. A. Tucker, N. C. Dracopoli (1994) *Nature Genetics*, 8; 15-21.

SSCP: a denaturált PCR terméket MDE gélen (Cambrex) 50V feszültséggel 18 órát futtatuk, ezüst festéssel hívtuk elő és AlphaInnotech géldokumentációs rendszerrel dokumentáltuk.

### EGFR intron 1 CA dinukleotid repeat

A primer szekvenciák a „Genome Database” ([www.gdb.org](http://www.gdb.org)) adatbázisból származnak.

A PCR-t 50 µl térfogatban, 100 ng DNS templát, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 20 pmol primer, 1x PCR puffer és 1 U Taq polimeráz (Invitrogen) felhasználásával végeztük.

Formamidos denaturálás után a mintákat Tamra jelenlétében ABI 310 készüléken POP4 polimer felhasználásával futtatuk, Genescan és Genotyper software segítségével analizáltuk.

### XPD cd312polimorfizmus

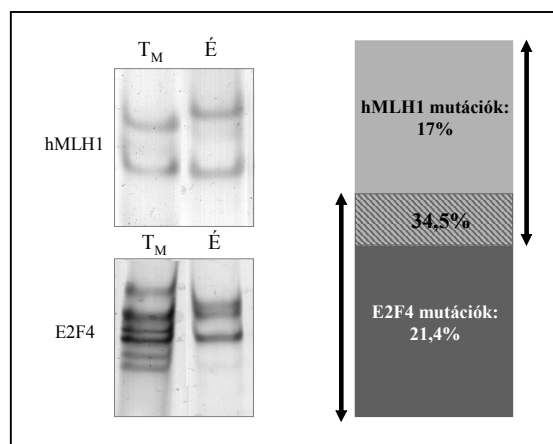
A vizsgálat LightCycler olvadáspont analízissel történt, melyhez egy új módszert állítottunk be. A primereket (Sense 5'-cgcaggatcaagagacag-3', antisense 5'-tcaggaagcccaggaaat-3') és próbákat (sensor LCR640-gcacttcgtcgggcagc-Ph; anchor gggtcggggctcaccctg-Fl) a LightCycler Probe Design Software (Roche) segítségével terveztük.

PCR reakciót 10µl térfogatban, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng genomi DNS, 0,75µM primer (Invitrogen), 0,15µM próba (TibMolbiol) és 1 µl LC-FastStart DNA Master HybProbe mix (Roche) felhasználásával végeztük.

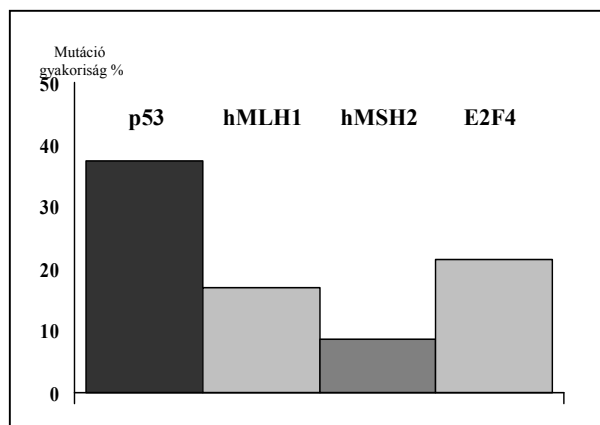
## Eredmények és Megbeszélés

### 1. DNS mismatch repair gén inaktiválódása fej-nyak daganatokban

A daganatok genetikai stabilitását a p53 gén mellett az u.n. DNS mismatch repair gének (MMR gének) is elősegítik. Vizsgálataink célkitűzése annak meghatározása, hogy az MMR gének milyen mértékben és milyen mechanizmus útján inaktiválódnak fej-nyak daganatokban. Ennek értelmében a hMLH1 és hMSH2 gén mutációk gyakoriságát határoztuk meg 128 fej-nyak daganatban. Ezen túlmenően elemeztük ezen gének promoter régiójának metilezettségi statusát. Megállapítottuk, hogy az esetek 17%-ában hMLH1 mutáció, 8,6%-ában hMSH2 mutáció fordul elő (**5. ábra**). A hMLH1 és hMSH2 gén mutációkat PCR-SSCP analízis segítségével azonosítottuk. Ezen vizsgálatok néhány reprezentatív esetét a 7. ábra szemlélteti. A DNS mismatch repair gének mutációs célpontjai lehetnek a di- vagy trinucleotid microszatellita szekvenciákat tartalmazó gének. Ezek közé tartozik az E2F4 gén is, amely AGC trinucleotic microsatellita szekvenciát tartalmaz. Ezért meghatároztuk az MMR gén mutációk és E2F4 mutációk együttes előfordulását. Az összes esetet figyelembe véve 21,4%-ban a hMLH1 mutánsokat tekintve 37,5%-ban találtunk E2F4 mutációt (**6. ábra**). A gének inaktiválódását a mutáció, deléción kívül a promoter régió hipermetilezettsége is elősegítheti.



**5. ábra.** *hMLH1- és E2F4-mutációk azonosítása PCR-SSCP analízissel. A hMLH1 mutációt mutató esetek 34,5%-ában E2F4 mutáció is előfordul.*



**6. ábra. Fej-nyaki daganatokban vizsgált gének mutációs gyakorisága PCR-SSCP analízis alapján. P53 = 37,5%, hMLH1= 17%, hMSH2 = 8,6%, E2F4 = 21,4%**

## 2. Fej-nyak daganatok epigenetikus vizsgálata

Különböző lokalizációjú fej-nyak tumorokon a következő gének promoter hipermetilációját vizsgáltuk: DAPK (114), E-cadherin (101), hMLH1 (112), APC (48), MGMT (47)t. A méréseket MethyLight assay-vel végeztük, ABI –7900 Sequence Detection System készüléken. Templátként Na-biszulfit módosított DNS-t használtunk.

A módosított DNS-re specifikusan tervezett TaqMan próbák és primerek szekvenciáit az **1. sz. táblázat** tartalmazza.

Pozitív kontrollként SssI metiláz enzimmel (New England Biolabs) mesterségesen metilált limfocita DNS-t, negatív kontrollként humán sperma DNS-t használtunk.

### 1. táblázat: az alkalmazott primerek és fluoreszcens próbák szekvenciái

	Forward primer	TaqMan próba	Reverse primer
<i>APC</i>	GAACCAAACGCTCCCCA T	6FAM- CCCGTCGAAAACCCGCCG ATTA-TAMRA	TTATATGTCGGTTAC GTGCGTTTATAT
<i>CDHI</i>	AATTTTAGGTTAGAGGGTT ATCGCGT	6FAM- CGCCACCCGACCTCGCAT -TAMRA	TCCCCAAAACGAAAC TAACGAC
<i>MLHI</i>	CGTTATATATCGTTCGTAG TATTCGTGTTT	6FAM- CGCGACGTCAAACGCCAC TACG-TAMRA	CTATCGCCGCCTCAT CGT
<i>DAPK</i>	GGATAGTCGGATCGAGTT AACGTC	6FAM5'- TTCGTAATTCGTAGCGGT AGGGTTTGG-3'TAMRA;	CCCTCCCAAACGCCG A
<i>MGMT</i>	CGAATATACTAAAACAAC CCGCG'	6FAM- AATCCTCGCGATACGCACC GTTTACG-3'TAMRA	GTATTTTTTCGGGAG CGAGGC
<i>ACTB</i>	TGGTGATGGAGGAGGTTT AGTAAGT	6FAM- ACCACCACCAACACACA ATAACAAACACA-TAMRA	AACCAATAAAACCTA CTCCTCCCTTAA

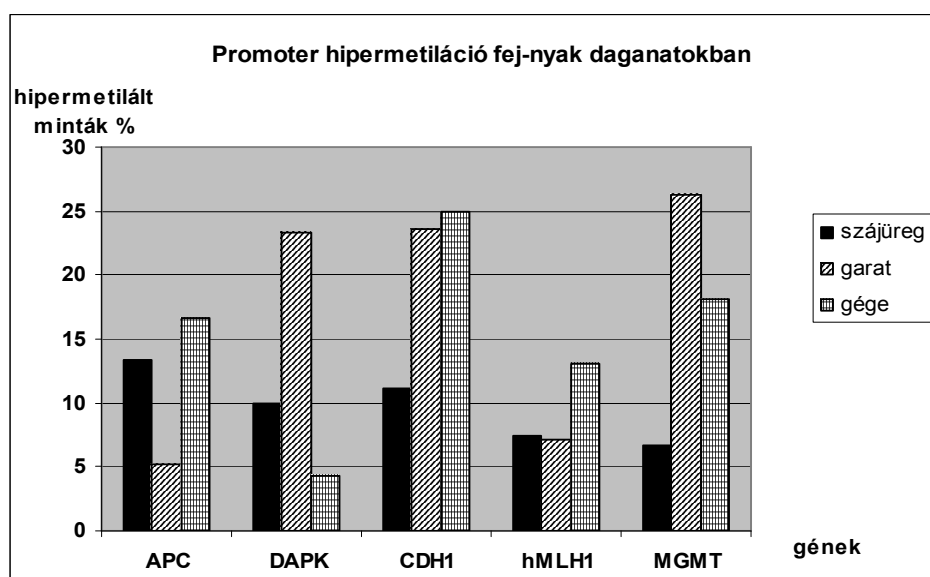
Az összes tumoros mintában a következő arányban voltak hipermetiláltak a vizsgált markerek:

APC 12,50%, DAPK 14,04%, CDHI 18,81%, hMLH1 8,93%, MGMT 19,15%.

## Tumor lokalizáció és promoter hipermetiláció

	APC	DAPK	CDH1	HMLH1	MGMT
Szájüreg	13,33	10,00	11,11	7,50	6,66
Pharynx-hypopharynx	5,26	23,26	23,68	7,14	26,32
gége	16,66	4,35	25,00	13,04	18,18

A fenti gének metilációs mintázatát anatómiai lokalizáció szerint is meghatároztuk (7. ábra).



7. ábra

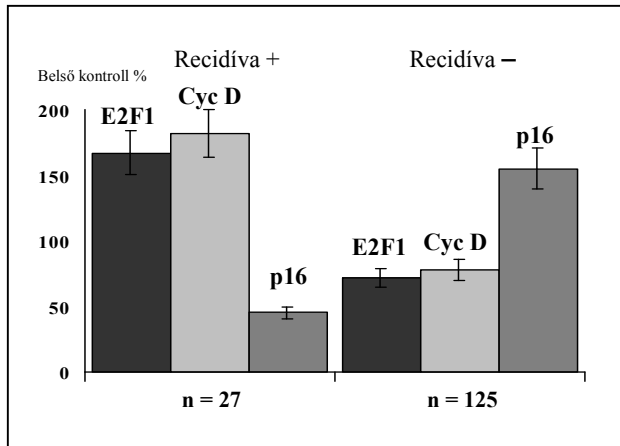
Gége daganatokban a legmagasabb az APC, Cadherin E és hMLH1 hipermetilációs inaktiválása. A garat daganatokban a terápiás érzékenységet módosító DAPK és MGMT gének inaktivációja a legmagasabb.

Eredményeink arra utalnak, hogy a fej-nyaki régióban lévő daganatok kialakulásának molekuláris mechanizmusa egymástól eltérő, ezért eltérő terápiás kezelést igényel.

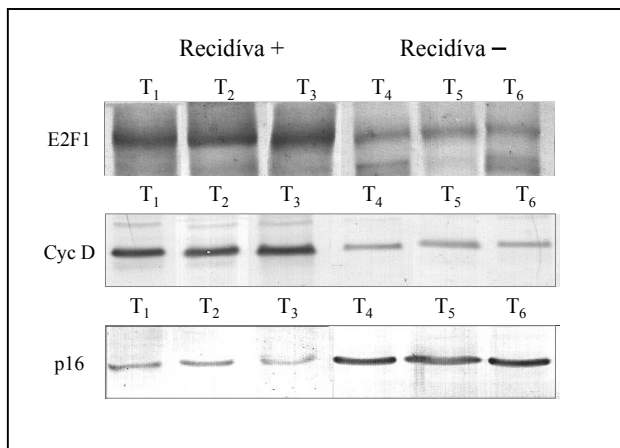
### 3. Sejtproliferációt szabályozó Ciklin D és p16 gének változása fej-nyak daganatokban

A daganatok legáltalánosabb sajátása a kontrolálatlan sejtproliferáció. Vizsgálatainkban ezért meghatároztuk a sejtproliferációt gátló p16 és a sejtproliferációt stimuláló Ciklin D expresszió mértékét 152 fej-nyak daganatban. Az E2F1 expresszió mértékét összehasonlítottuk a Ciklin D és p16 fehérjék mennyiségével. Összefüggést kerestünk a fenti gének expressziója, valamint a daganatok metasztatizáló képessége és recidíva hajlama között. Megállapítottuk, hogy mind az E2F1, mind a Ciklin D szint fej-nyak daganat recidívákban szignifikánsan magasabb ( $p < 0,05$ ), mint primer daganatokban. Ezzel szemben primer daganatokban a p16 expresszió mértéke magasabb, mint recurrens tumorokban (8. ábra).

A 9. ábra az E2F1, Ciklin D és p16 gének expressziós mintázatát mutatja be Western analízis segítségével. Ugyanazon daganatokban az alacsony p16 expresszió magas Ciklin D és E2F1 expresszióval társul.



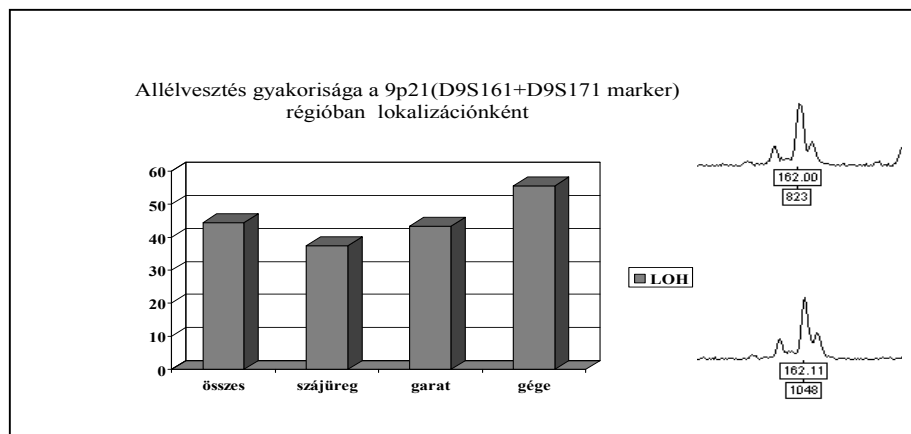
**8. ábra.** *E2F1-, Ciklin D- (Cyc D) és p16-expresszió recidívát adó és recidívát nem adó fej-nyaki daganatokban. Recidívát adó daganatokban az E2F1 és Ciklin D szintje szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabb, mint a recidívát nem adó tumorokban.*



**9. ábra.** *E2F1-, Ciklin D-, és p16-expresszió Western blot analízise fej-nyaki daganatokban.*

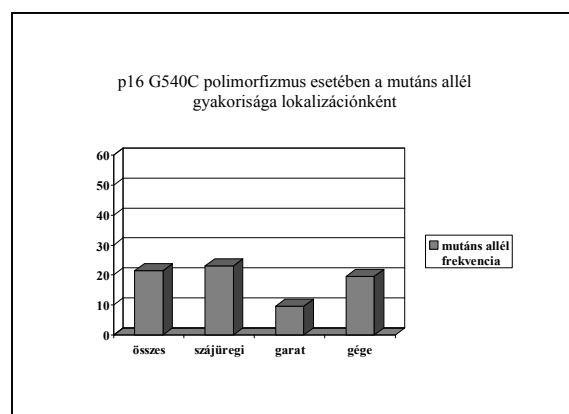
Az áttétet adó fej-nyak daganatok alacsony Cadherin E szinttel jellemezhetők. A Cadherin E és Bcl2 expresszió azonban függetlenül regulálódik. A Cadherin E – catenin  $\beta$  metasztázis szuppresszor rendszer fontos szerepet játszik az epithelialis architectura fenntartásában. A Cadherin E vagy a catenin  $\beta$  mutációs megváltozása, csökkent expressziója a sejtek közötti kapcsolatok fellazulásához, az invazív növekedés megindulásához vezet. A Cadherin E szint vizsgálata a fej-nyak daganatok prognosztikai markereként használható. Előzetes vizsgálatok is azt bizonyítják, hogy metasztatizáló fej-nyak daganatokban a Cadherin E expresszió mértéke csökken.

A fej-nyak daganatok kialakulásában a p16 tumor szuppresszor génnek nagy jelentőséget tulajdonítanak. A p16 gén a sejtciklus szabályozásában vesz részt, allélvesztéssel, mutációkkal, és epigenetikus úton károsodhat. A 9p21 kromoszóma régióra lokalizálják, amelynél az allélvesztést a D9S161 és D9S171 elnevezésű mikroszatellita markerrel vizsgáltuk. A D9S161 marker esetében a heterozigótáság 80%-os a D9S171 marker esetében pedig 71%-os volt. A két markernél együttesen a betegek 44,4%-ánál tapasztaltunk allélvesztést, ebből a szájüregi daganatok 37,5%, a garat régióban 43,3% és a gége területén előforduló daganatok 55,6%-ában. tapasztaltunk allélvesztést. A mutációs analízisnél a G540C polimorfizmus esetében fordított a helyzet, itt a mutáns genotípus a csupán a betegek 10%-ánál, ezen belül, a szájüregi lokalizációjú tumorok 7,7%-ban, a gégeráknál 11,1%-ban, garatrákos betegeknél, pedig egyáltalán nem fordult elő. A mutáns allél gyakorisága a garatráknál a legalacsonyabb 9,6, míg a gége ill. szájüregi daganatos betegeknél 19,5 ill. 23,1.



**10. ábra** Az allélvesztés gyakorisága a szájüregi daganatoknál 37,5%, garatnál 43,3, gégerákosoknál 55,6%.

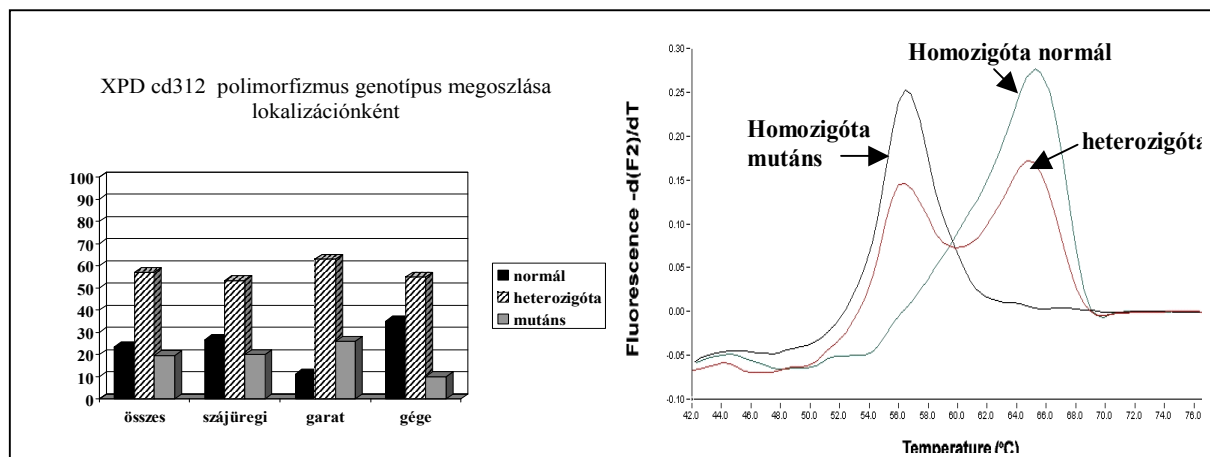
**11. ábra.** A mutáns allél gyakorisága a garatránál a legalacsonyabb 9,6, míg a gége ill. szájüregi daganatos betegeknél 19,5 ill. 23,1.



Eredményeink arra utalnak, hogy a fej-nyaki daganatok kialakulásához a 9p21 kromoszóma régióban történő allél vesztés nagymértékben hozzájárul.

#### 4. XPD polimorfizmus vizsgálata

A fej-nyak daganatok terápiájában a ciszplatin jelentős szerepet játszanak. Irodalmi adatok szerint a ciszplatinnal szembeni érzékenység hátterében DNS javító enzimeket kódoló gén polimorfizmusok is lehetnek. Ezen gének vizsgálata elősegítheti a  $1^{\text{st}}$  lépés során a terápiás érzékenység meghatározását, mivel a mutáció csökkent repair kapacitást, és így a terápiás szerrel szembeni nagyobb érzékenységet eredményezhet. A nukleotid excíziós javító enzimek közé tartozik az XPD gén, melynél több, feltehetően az enzimaktivitással is összefüggésben lévő polimorfizmust írtak le. Mi a codon 312 G→A cserét eredményező polimorfizmus előfordulását vizsgálatuk fej-nyak daganatoknál. A betegek 19,5%-a hordozza a mutáns genotípust, viszont a mutáció megoszlása lokalizációnként eltérő. A garat daganatosoknál fordul elő leggyakrabban a homozigóta mutáns genotípus (25,9%) és itt a heterozigóták aránya (63,0%) is kb. 10%-kal meghaladja másik két csoportnál tapasztaltat.

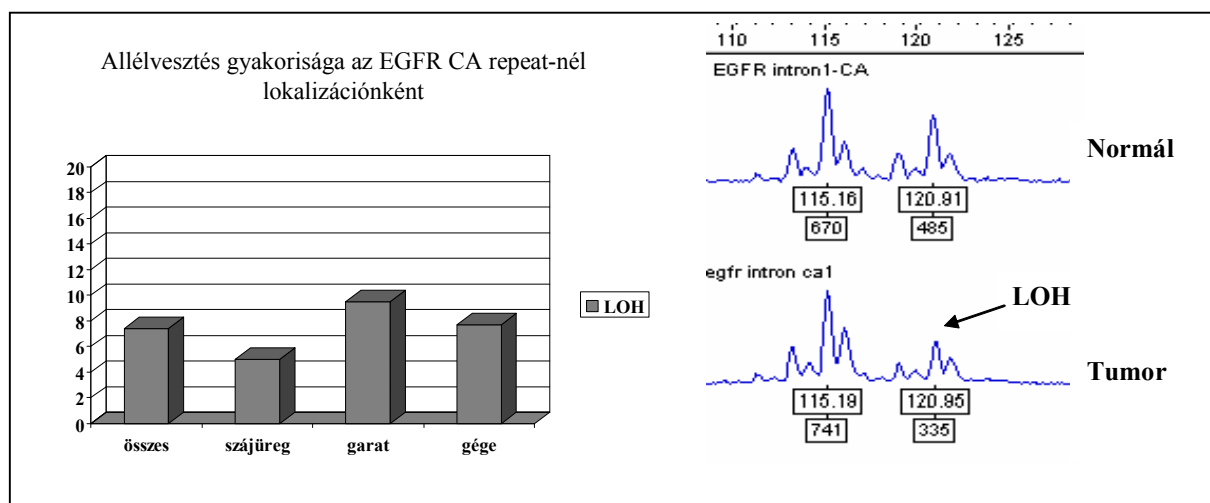


**12. ábra.** A garatrákosoknál fordul elő leggyakrabban a heterozigóta (63,0%) és a homozigóta mutáns genotípus (25,9%) is, ez utóbbi a gége tumoros betegek esetében csupán 10%, míg a heterozigóták aránya 55%, ami kb. megegyezik a szájüregi lokalizációjú tumorok esetében tapasztalt 53,3%-kal.

Az XPD polimorfizmus vizsgálata hozzájárulhat a fej-nyak daganatos betegek individuális terápiai protokoll kialakításához és ezáltal növeli a betegek gyógyulási esélyét.

### 5. EGFR polimorfizmus vizsgálata

Az EGFR szignál transzdukciós útvonal szerepet játszik a sejtciklus progressziójának, az apoptózis, angiogenezis tumor sejt motilitás, invázió és metasztázis gátlásának szabályozásában. Az EGFR útvonalon ható szerek a fej-nyak daganatok terápiájában is szerepet kaphatnak. Irodalmi adatok szerint a fej-nyak daganatoknál igen gyakori az EGFR overexpressziója ami rosszabb prognózissal is kapcsolatba hozható. Az EGFR gén 1. intronjában egy dinukleotid repeat szekvencia található, amely feltehetően a gén expresszióját és transzkripcióját szabályozza. Vizsgálataink során ennél a mikroszatellita markernél a betegek 7,4%-ánál tapasztaltunk allélvesztést. Primer tumor lokalizáció szerint csoportosítva a garatrégiben 9,5%, szájüregnél 5,0%, gégnél pedig 7,7%.



**13. ábra.** A betegek 7,4%-ánál fordult elő allélvesztés. A garatrégióra lokalizált tumorok esetében 9,5%, szájüregnél 5,0%, gégnél pedig 7,7%.

Az általunk vizsgált EGFR polimorfizmus alapján az EGFR tirozin kináz gátlókkal szembeni érzékenység, illetve az immunterápiás kezelés (Erbix) várható hatékonysága előre jelezhető.

## **6. A glottikus daganatok progressziós génmintázata**

A glottikus daganatok progressziós génexpressziós mintázatának meghatározására 5-5 laryngeális és hypopharyngeális daganat expressziós profilját vizsgáltuk ahol a betegek túlélése rövidebb volt mint 2 év (igen agresszív volt a folyamat). A vizsgált 96 metasztázis génből 7-nek az expressziója tért el mindkét lokalizációban a különösen agresszív esetekben: ezek között volt található a DCC metasztázis szuppresszor (2. táblázat). A fokozottan expresszált gének között meglepetésre az E-cadherin szuppresszor tűnt fel, valamint az MT1-MMP és a CD31. Ez utóbbi a daganatban lévő angiogenezist, elsősorban a lymphangiogenezist jelezheti. Vizsgálataink szerint ugyanakkor a két anatómiai lokalizációban a progresszióban jelentősen eltérő expressziós mintázat vesz részt: ebből a szempontból a laryngeális rákok sokkal sokoldalúbbak mint a hypopharyngeálisak: az előbbi 21 míg az utóbbit csak 4 génből álló készlet jellemzi.

A hypopharynx rákjaiban a caspase8 apoptózis effektor és a PAI1 proteáz inhibitor elvesztése jellemzi. A fatális laryngeális rákok esetében további 17 fokozottan expresszáldó metasztázis asszociált gént találtunk: közöttük a c-myc onkogén, MMP1 kollagenáz, katepszinB szerepét már felismerték korábban. Vizsgálataink ugyanakkor számos metasztázis gén szerepére mutattak rá amelyekről eddig még nem volt adatunk laryngeális rákokban: API5 apoptózis inhibitor, caveolin1, TSP1, MMP11. A fatális laryngeális rákokban csökkent expressziót mutató (tehát ún. metasztázis szuppresszor funkciójú) gének között a korábban már megfigyelt NME1 mellett a RAF-1, az  $\alpha 5$  integrin és a TSP2 volt található (1. táblázat, Tímár és mtsai 2005).

Ezek a megfigyelések megerősítették azon elképzelésünket, hogy a fejnyaki daganatok egy meglehetősen heterogén családot alkotnak, amelyek génexpressziós mintázata, emiatt progressziós sajátosságai és talán terápiás érzékenysége is eltérő. Ennek alapján célszerű volna a fejnyaki daganatokat szisztematikusan vizsgálni az anatómiai lokalizációnak megfelelően mind progressziós szempontból, mind gyógyszer-érzékenység szempontjából. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a fejnyaki daganatok progressziójának van közös momentuma is, ez pedig az apoptózis-rezisztencia kialakulása, ami bár eltérő mechanizmussal, de valamennyi lokalizációban bekövetkezik. Ennek jelentősége az lehet, hogy ezen daganatok terápiája a sugárterápiára alapul, aminek kritikus kérdése lehet az apoptózis rezisztencia.

1. táblázat. Metasztázis-asszociált gének expressziója glottikus rákokban és ennek összefüggése a túléléssel (2 év).

Gene name	GeneBank		Túlélő (n=10)	Fatális (n=10)
<b>Közös</b>				
E-cadherin	NM-004360	<i>Cadherin 1, epithelial</i>		
CD31	NM-000442	<i>Platelet/endothelial adhesion molecule</i>		
MT1-MMP	NM-004995	<i>Matrix metalloproteinase 14 (membrane-ins)</i>		
Cystatin C	NM-000099	<i>Cystatin C</i>		
MUC-18	NM-000247	<i>MHC-I polypeptide related sequence-A</i>		
c-Fos	NM-05252	<i>V-fos FBJ m. osteosarcoma viral oncogene h.</i>		
DCC	NM-005215	<i>Deleted in colorectal cancer</i>		
<b>Larynx-specifikus</b>			<b>(n=5)</b>	<b>(n=5)</b>
S100A4	NM-002961	<b>S100 calcium binding protein A4</b>		
Osteopontin	NM-000582	<i>Secreted phosphoprotein-1 (osteopontin)</i>		
Integrin $\alpha$ 6	NM-000210	<i>Integrin, alpha 6</i>		
Collagenase1	NM-002421	<i>Matrix metalloproteinase 1 (interstitial)</i>		
TMPRSS4	NM-019894	<i>Transmembrane protease, serine 4</i>		
NGF	NM-002506	<b>Nerve growth factor beta polypeptide</b>		
PDGF $\alpha$	NM-002607	<i>Platelet-derived growth factor alpha</i>		
c-Fes	NM-002005	<i>Feline sarcoma oncogene</i>		
c-Myc	NM-002467	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene hom.</i>		
AAC-11	NM-006595	<b>Apoptosis inhibitor 5</b>		
Caveolin-1	NM-001753	<b>Caveolin-1, 22 kD</b>		
OC	NM-002539	<b>Ornithine decarboxylase 1</b>		
KISS1	NM-002256	<b>KiSS-1 metastasis suppressor</b>		
COL4A2	NM-001846	<b>Collagen type IV, alpha2</b>		
TSP1	NM-003246	<b>Thrombospondin-1</b>		
CathepsinB	NM-001908	<b>Cathepsin B</b>		
ST3	NM-005940	<i>Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin3)</i>		
RAF1	NM-002880	<i>V-raf-1 m. leukemia viral oncogene homolog1</i>		
NME1	NM-000269	<i>Non-metastatic cells-1 protein (NM23A)</i>		
Integrin $\alpha$ 5	NM-002205	<i>Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor alpha)</i>		
TSP2	NM-003247	<b>Thrombospondin-2</b>		
<b>Hypopharynx-specifikus</b>			<b>(n=5)</b>	<b>(n=5)</b>
PAI-1	NM-000602	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i>		
NME4	NM-005009	<i>Non-metastatic cell-4, protein</i>		
c-Fes	NM-002005	<i>Feline sarcoma oncogene</i>		
FLICE	NM-001228	<b>Caspase 8, cystein protease</b>		

Human tumor metasztázis gene-array-t (SuperArray HS 007-N) használtunk 5-5 poolozott laryngeális és hypopharyngeális tumor exóressziós mintázatának megállapítására. A cDNS biotinylated-16-dUTP volt jelölve és chemiluminescens próbával. A 4 párhuzamos spot intenzitását Alpha Innotech Chemi Imager 8900 készülékkel mértük. A gének expressziós szintjét GAPDH housekeeping genhez hasonlítottuk.  
Jelek: nincs= fehér, van=fekete, down-regulált=zöld, over-expresszált=piros, eltérés >2 fold

**Közlemény:**

1. Tímár J, Csuka O, Remenár É, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Metast Rev 24:105-125, 2005