

***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium
a daganatos halálozás csökkentésére***

1/48/2001

Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.

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

**Dr. Kásler Miklós
Országos Onkológiai Intézet**

RP5. Fej-nyaki-laphámrákok 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.**

1. A környezeti és genetikai predispozíció biomarkeres vizsgálata a fej-nyaki laphámrák kialakulásában.

A rák megelőzés egyik legfontosabb igénye olyan biomarkerek kutatása, amelyek a mutagénekkel szembeni általános érzékenység mellett az egyén genetikai instabilitását és reparáció-készségét is mérik. A bleomycin-tesztet környezeti etiológiájú daganatok esetében az egyéni rákkockázat kimutatására használják.

A konvencionális kromoszómaanalízis alapján az aberráns sejtek aránya a daganatos betegekben és az egészséges dohányzóknál egyaránt 2,8% volt, szemben a nem dohányzó kontrollok 2,25%-os értékével ($p < 0,04$). A dohányzás klasztogén hatása egyértelmű, tehát a veszélyeztetett populációk kockázatbecslésében a kromoszómaaberrációk biomarkerként alkalmazhatók.

A magyar kontrollok között azonban a mutagénérzékenyek aránya kétszeresen meghaladta (46%) más népcsoportok (10-22%) szakirodalomban közölt érzékenységi arányát. A módszer önálló biomarkerként hazai körülmények között valószínűleg nem használható a kontrollal való nagyfokú átfedése miatt.

Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a magyar populációban a metabolizáló és detoxikáló enzimek más jellegű polimorfizmussal vannak jelen, mint azokban a szubpopulációkban ahol a bleomycin-teszt egyéni rákkockázat becslésére is alkalmas módszer.

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

A fej-nyak daganatok biológiai viselkedésére általánosan jellemző, hogy a primer tumor megjelenését követő 5 éven belül másodlagos, synchron vagy metachron tumorok alakulnak ki. Az épnek látszó tumor melletti nyálkahártya p53 statusának meghatározása alkalmas lehet a residuális tumorsejtek kimutatására és a tumor locoregionális kiújulásának megakadályozására. A vizsgálat sorozat alapvető célkitűzése az volt, hogy a p53 mutáció típusát primer szájúregi daganatokban és a tumortól távoleső nyálkahártyában meghatározzuk. Vizsgálatainkban a p53 mutáció jelenlétét a gén 5., 7. 8. exonjaiban vizsgáltuk PCR-SSCP módszerrel. Megállapítottuk, hogy a p53 mutáció 152 tumoros minta 37,5%-ában van jelen. 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. Megállapítottuk, hogy a tumortól távoleső 152 ép nyálkahártya minta 11,2%-ában (17/152) p53 mutáció észlelhető. 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 p53 mutáció vizsgálata fej-nyak daganatokban tehát előre jelzi a másodlagos tumorok kialakulásának és recidívák megjelenésének veszélyét. Vizsgálataink hozzájárulnak a fej-nyak daganatok metasztázis képzésének, recidív hajlamának, másodlagos tumor kialakulásának, terápiás érzékenységének predikciójához és ezáltal növelik a betegek gyógyulási esélyét.

3. Genetikai károsodások összehasonlító vizsgálata dohányzó és nem dohányzó fej-nyak daganatos betegekben.

A vizsgálatsorozat alapvető célkitűzése annak megállapítása, hogy a dohányzó és nem dohányzó személyek génpolimorfizmus mintázata és ezáltal a genetikai predispozíció mértéke eltérő vagy hasonló-e.

204 beteg és 218 egészséges kontrollnál végeztünk genetikai analízist. A fej-nyak daganatok megjelenésének kor szerinti megoszlása: ≤ 40 év, 2.2%; 41-45 év 10.0%; 46-55, 47,5%; 56-65, 30.0% és >65 10.0%. A betegek döntő többsége, 88,7%-a férfi a 11.3%-a nő. 137 esetben voltak adataink a dohányzási szokásokról, eszerint 91.9% dohányzik és csak 8.1% nem. A dohányosok közé soroltuk azokat is akik most már nem, de korábban erősen dohányoztak. Lokalizáció szerint 5 csoportot (ajak, szájüregi, garat, gége, nyálmirigyek és tonsillák) különítettünk el, a daganatok kiindulási helye szerinti eloszlást vizsgáltuk. A beteg és kontroll csoport 3 polimorfizmus esetében tér el lényegesen. Az XRCC1 codon 194 TT mutáns a betegeknél egyáltalán nem fordul elő, az egészségesek között 1,8 %-ban viszont megtalálható. Az előbbi csoportban a T allél frekvenciája 5.4, míg az utóbbinál 9.9. Ez a megfigyelés, amit irodalmi adatok is alátámasztanak, azt a feltételezést vonja maga után, hogy a T allél védő hatással rendelkezik a tumorok kialakulásával szemben és a gyakoribb C allél az ami a daganatra hajlamosító hatással rendelkezik. A genetikai analízist a fej-nyak daganatok lokalizációja szerint értékelve, eltérő genotípus megoszlás figyelhető az egyes daganatoknál.

Az általunk vizsgált hét génpolimorfizmus eltérő mértékben, de alkalmasak a fej-nyak daganatok genetikai predispozíciójának megítélésére. Megállapítottuk, hogy a DNS repairben fontos szerepet játszó XRCC1 gén TT genotípusa (codon 194) csak egészséges kontroll személyekben fordul elő. Ennek alapján a T allél jelenléte védő hatással rendelkezik a tumorok kialakulásával szemben, míg a CC genotípus a daganatos betegek 89,2%-ában fordult elő. Ezzel szemben az XRCC1 (codon 280) polimorfizmusának AA genotípusa csak daganatos betegekben (ajak, szájüreg, garat) jelenik meg. A gége daganatos betegeknél ez a polimorfizmus nem észlelhető. Az XRCC1 (codon 399) polimorfizmus a garatrak esetében, az XRCC3 (codon 241) a nyálmirigy-tonsilla területét érintő daganatok esetében tűnik hajlamosító tényezőnek, és ez utóbbi gén mutációja a nemdohányzó betegeknél is gyakori. A gégetumorok genetikai analízisének jelentős eltérést nem tapasztaltunk, ami újabb genetikai markerek bevonásával további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A dohányzással összefüggésbe hozható még az MTHFR 1298 CC polimorfizmusa, mely a fej-nyak daganatos és a kontroll csoportnál is ritkább a nemdohányzóknál (6.7% ill. 3.4%) mint a dohányosoknál (10.4% ill. 12.1), és az XRCC1 cd399 AA polimorfizmus, mely a dohányzó betegek 13,5%-ánál és a nemdohányzók 6,7%-ánál fordul elő.

Vizsgálatainkban a fej-nyak daganatok kialakulására hajlamosító gén polimorfizmusokat azonosítottuk, amelyek elősegíthetik az egyéni rákkockázat becslését.

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

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.

4.1. 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 metilzettségi statusát. Megállapítottuk, hogy az esetek 17%-ában hMLH1 mutáció, 8,6%-ában hMSH2 mutáció fordul elő. A gének inaktiválódását a mutáció, deléción kívül a promoter régió hipermetilzettsége is elősegítheti.

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.

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

APC 12,50%, DAPK 14,04%, CDH1 18,81%, hMLH1 8,93%, MGMT 19,15%.

Ezen gének metilációs mintázatát anatómiai lokalizáció szerint is meghatároztuk. 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.

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

A daganatok legáltalánosabb sajátága a kontrolálatlan sejtproliferáció. Vizsgálatainkban ezért meghatároztuk a sejtproliferációt gátló p16 és a sejtproliferációt stimuláló Ciklin D expresszió mértékét 152 fej-nyak daganatban. Összefüggést kerestünk a fenti gének expressziója, valamint a daganatok metasztázáló 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.

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 heterozigótaság 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.

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

4.4. Fej-nyak daganatok terápiás markerei

4.4.1. XPD polimorfizmus vizsgálata

A fej-nyak daganatok terápiájában a ciszplatin jelentős szerepet játszik. Irodalmi adatok szerint a ciszplatinnal szembeni érzékenység háttérében DNS javító enzimeket kódoló gén polimorfizmusok is lehetnek. Ezen gének vizsgálata elősegítheti a kezelés 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 vizsgáltuk fej-nyak daganatoknál. A betegek 19,5%-a hordozza a mutáns genotípust, viszont a mutáció megoszlása lokalizációnként eltérő. A garat daganatokban 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. A gége tumoros betegek esetében csupán 10%, a szájüregi daganatos betegeknél pedig 20% a mutáció gyakorisága.

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

4.4.2. 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%, gégenél 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.

4.5. A fejnyaki daganatok progressziós markerei

Vizsgálataink szerint a laryngealis és hypopharyngealis daganatok progressziója jelentősen eltérő un. metasztázis-gémekek segítségével történik. Genomikai vizsgálataink szerint a két

lokalizációban közös a DCC metasztázis szupreszor elvesztése amit a az MHC-I vesztése kísér. Ezzel párhuzamosan a membrán kollagenáz MT1MMP és a cystatin C expresszió fokozódik. Hasonlóan közös jelenség a lymphagiogenezis jelentősége mindkét lokalizációban. A hypopharyngeális rákok esetében ezt a génekészletet csak a PAI és a caspase 8 elvesztése kíséri. Ezzel szemben a laryngealis rákok esetében a progresszióhoz sokkal több gén (17) együttműködése szükséges és talán ennek köszönhető az hogy ez a daganat kevésbé aggresszív mint a hypopharyngealis rák. A larynx specifikus progressziós gének között az AIP5 apoptosis inhibitor, az MMP11 és cathepsin B proteázok szerepelnek. Az apoptosis-rezisztencia úgy tűnik mindkét lokalizációban kulcsfontosságú, ami a kemo- és sugárterápia csökkenő hatásosságát jelentheti.

4.6. Publikációk:

Csuka O., Olasz J., Juhász A., Hargitai Á., Remenár É., Kásler M.: Genetikai marker-vizsgálatok fej-nyaki daganatokban. Magyar Onkológia 45, 161-167, 2001

Székely G, Remenár É, Kásler M, Bodrog A. Gundy S.: A kromoszómaanalízis és a bleomycin–teszt hazai alkalmazhatóságának vizsgálata a fej-nyaki laphámrák prevenciójában. Orvosi Hetilap 142 (2001) 611-616.

Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Expozíció vagy rákhajlam? Fej-nyaki laphámrákos betegek citogenetikai szűrése. Magyar Onkológia 45, 152-157, 2001

Kelecsényi Zs., Székely G., Gundy S.:A sporadikus kromoszómaaberrációk háromszoros emelkedése 1986-2001 között vizsgált egészséges személyekben. Magyar Onkológia, 47, 169-176, 2003

J. Tuimala, G. Székely, S. Gundy, A. Hirvonen, H. Norppa: Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic metabolizing enzymes: Role in mutagen sensitivity, Carcinogenesis, 2002, 23 (6) 1003-1008.

G.Székely, É.Remenár, M.Kásler, S.Gundy: Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? Mutagenesis, 18, 59-63, 2003

J. Tuimala, G. Székely, H. Wikman, H. Jarventaus, A. Hirvonen, S. Gundy, H. Norpa: Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations: Mutation Res, 554, 319-333, 2004

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