

Genetikai marker-vizsgálatok fej-nyaki daganatokban

Csuka Orsolya¹, Olasz Judit¹, Juhász Alíz¹, Hargitai Árpád¹,
Remenár Éva², Kásler Miklós²

Országos Onkológiai Intézet, Pathogenetikai Osztály¹,
²Fej-Nyák, Állcsont és Rekonstrukciós Sebészeti Osztály, Budapest

A szájüregi daganatok prognózisa magába foglalja a reziduális tumorsejtek azonosítását, recidívák, távoli metasztázisok, másodlagos primer tumorok megjelenésének predikcióját és a terápiás érzékenység megbecsülését. A szájüregi daganatsejtek biomarkerei közé tartoznak a p53-, p16- mutációk, és a Ciklin D-, E2F4-amplifikáció. A másodlagos primer tumorok kialakulásának veszélyét az épnak látszó nyálkahártya p53 statusának meghatározásával lehet megítélni. Feltételezik ugyanis, hogy a környezeti ártalmaknak kitett száj- és garatüreg premalignus állapotba kerül (field cancerization), amely multiplex tumorok kialakulását segítheti elő. Vizsgálatainkban 152 fej-nyaki daganatban és a tumorokhoz tartozó sebészeti ép szélben, ép nyálkahártyában Western blot analízissel, illetve PCR-SSCP módszerrel határoztuk meg a p53, hMLH1, Ciklin D, p16 génkárosodásokat. A daganatok PCR-SSCP analízisével az esetek 37,5%-ában mutatható ki p53-mutáció. A tumortól távol eső ép nyálkahártya p53 statusa alapján a „field cancerization” az esetek 11%-ában igazolható, amely multiplex, multifokális tumorok kialakulásának veszélyét jelzi. A hMLH1-, hMSH2-mutációk jelenlétét a vizsgált esetek 17, illetve 8,6%-ában igazoltuk. Az E2F4-mutációk 21,4%-os gyakorisággal fordultak elő. Eredményeink arra utalnak, hogy az E2F4-gén overexpresszióját, sejtproliferációt stimuláló hatását a p16 gén inaktiválása idézi elő. Az E2F4-mutációk kialakulásában az MMR (mismatch repair) gén mutációi játszhatnak szerepet. Vizsgálataink szerint a szájüregi daganatok melletti sebészi ép szél és ép nyálkahártya genetikai jellemzése elősegíti mind a reziduális tumorsejtek azonosítását, mind a másodlagos tumorok kialakulásának predikcióját és ezáltal növeli a fej-nyaki daganatos betegek gyógyulási esélyét. *Magyar Onkológia 45:161-167, 2001*

Prognostication of head and neck cancer (HNCC) involves molecular identification of residual tumor cells, prediction of recurrence, distant metastases or secondary tumors and prediction of the sensitivity to therapy. Biomarkers of HNCC are mutations of p53, p16 and amplification of Cyclin D and E2F4. One hundred and fifty-two HNCC cases have been evaluated for p53, hMLH1, Cyclin D and p16 gene alterations using PCR-SSCP and Western blot analysis. P53 mutations of HNCC have been found in 37.5% of cases. However, 11% of the cases showed p53 mutations in the normal peritumoral mucosa suggesting „field cancerization” process. Mismatch-repair gene mutations (MMR: hMHL1 and hMSH2) occurred with 17 and 8.6% frequency, respectively, while E2F4 mutations were even more frequent (21.4%) in HNCC. Our data suggest that E2F4 overexpression can be caused by the inactivation of the p16 gene in HNCC, while its mutations are most probably associated to the mutations of the MMR genes. These molecular informations can help to predict the biological potential of HNCC as well as the probability of the development of secondary HNCCs. *Csuka O, Olasz J, Juhász A, Hargitai Á, Remenár É, Kásler M. Genetic marker analysis in head and neck cancer. Hungarian Oncology, 45:161-167, 2001*

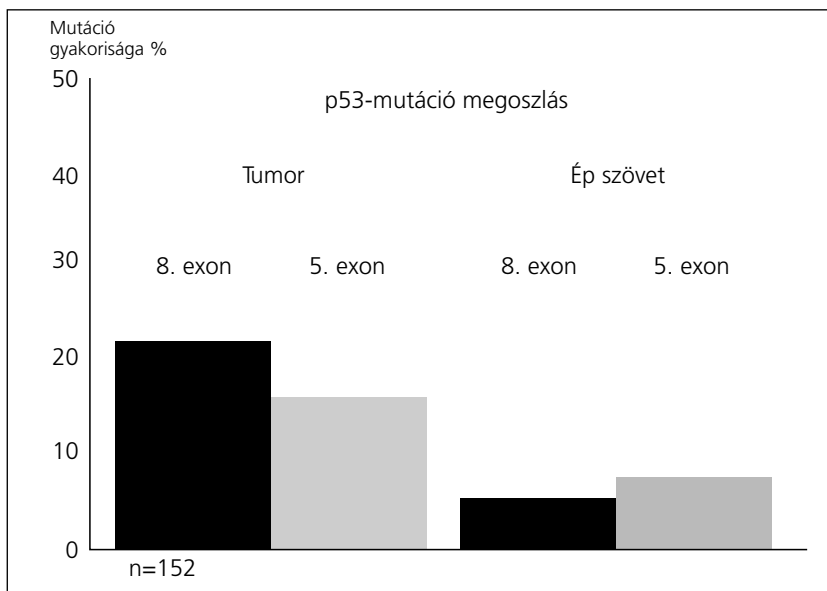
Közlésre érkezett: 2001. február 20.
Elfogadva: 2001. május 30.

Levelezési cím: Dr. Csuka Orsolya, Országos Onkológiai Intézet, 1122. Budapest, Ráth György u. 7-9.
Tel: 224-8785, fax: 224-8775, E-mail: csuka@oncol.hu

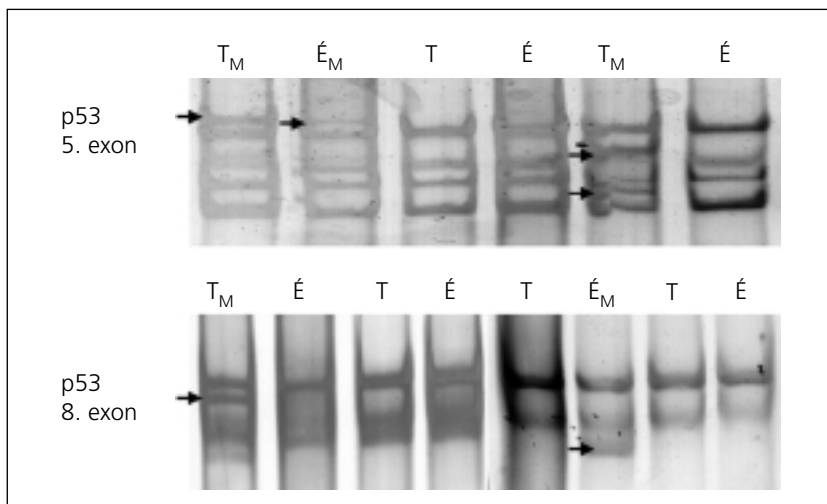
Bevezetés

A fej-nyaki daganatok előfordulási gyakorisága Magyarországon növekvő tendenciát mutat. Az Európai Unió országaiban 60 000 fej-nyaki daganatos beteget regisztrálnak évente (13). A sikeres sebészeti, kemoterápiás és sugárterápiás kezelés ellenére a betegek 50%-ánál a túlélési idő rövidebb, mint 5 év, amely a tumorok kiújulásával, másodlagos primer tumorok megjelenésével, távoli metasztázisok kialakulásával hozható összefüggésbe. A fej-nyaki daganatok genetikai változásainak vizsgálata kitűnő modellként szolgál arra, hogy a környezeti karcinogének hatását molekuláris szinten elemezzük (3). A környezeti karcinogének elsődleges támadáspontja a genom stabilitását biztosító regulációs rendszer (p53, DNS-javító enzimek, stb.). Ennek megfelelően a p53-mutációk mind a fej-nyaki tumorokban, mind tüdőrákokban gyakoriak és az adott tumortípusra jellegzetesek. A fej-nyaki daganatok biológiai viselkedésére általánosan jellemző, hogy a

1. ábra. P53-mutáció fej-nyaki daganatokban és tumor melletti ép nyálkahártyában. A PCR-SSCP analízis eredményei szerint a 8. exonban 21,2%-ban, az 5. exonban 16,5%-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 csikra mutat. „Ép” nyálkahártyában (É) is kimutatható p53-mutáció.



primer tumor megjelenését követő 5 éven belül másodlagos, synchron vagy metachron tumorok alakulnak ki. Ez a jelenség vezette Slaughtert és mtsait (1994), hogy fej-nyaki daganatok kialakulására a „field cancerization” hipotézist javasolják. A szájüregi daganatok nagyrésze laphámrák, ezért hisztológiai 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 metasztázisai genetikai szinten megegyezők, vagyis a daganatok monoklonális eredetűek (25). Vizsgálataink egyik célkitűzése az, hogy a p53-mutációt klonális markerként használjuk. A jellegzetes mutációs „hot spot” alapján lehetővé válik a recidívák és másodlagos tumorok megkülönböztetése. Az épnek látszó tumor melletti nyálkahártya p53 statusának meghatározása alkalmas lehet a reziduális tumorsejtek kimutatására és a tumor lokoregionális kiújulásának megakadályozására. A fej-nyaki daganatok progressziója egy növekvő genetikai instabilitással jellemezhető folyamat, amely malignus transzformációt előidéző mutációk megjelenéséhez vezet. A sejtek genetikai stabilitását a p53-mutáció mellett a DNS mismatch repair gének (MMR) is biztosítják. Ezen gének mutációja malignus daganatok kialakulásához vezet (16). Az MMR gének inaktivációját a promoter régiók hipermetiláltsága is előidézhetheti (9).

Vizsgálatainkban ezért 152 fej-nyaki daganatban és a tumor melletti ép nyálkahártyában meghatároztuk a p53-mutáció és MMR génmutációk gyakoriságát. Megállapítottuk, hogy a genetikai instabilitás kialakulásához mind a p53-, mind az MMR génmutációk hozzájárulnak. Az apoptózist szabályozó Bcl-2-overexpresszió és a Cadherin E-downreguláció a fej-nyaki daganatok metasztázisképzését segíti elő. A Ciklin D-overexpresszió és p16 gén-inaktiváció a fej-nyaki daganatok recidívahajlamára hívja fel a figyelmet. Vizsgálataink hozzájárulnak a fej-nyaki daganatok metasztázis- és recidívahajlamának predikciójához.

Anyag és módszer

Szöveti minták

152, T1N0 – T3N2 fej-nyaki 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 normális szövetmintákat golyós malommal porítottuk és RIPA pufferben (1 ml/g szövet) homogenizáltuk.

A citoszol előállítására a homogenizátumot 15 000 g-n 20 percen át 4°C-on centrifugáltuk. A sejtizátum fehérjetartalmát Lowry-módszerrel határoztuk meg. 5-20 mg fehérjét 7,5-12,5% SDS-tartalmú polyacrylamid gélen elektroforetízáltunk. A gélen szétválasztott fehérjéket elektromos úton Immobilon P membránra vittük át. A fehérjéket (p53, mdm2, Ciklin 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 denzitometrállással végeztük el.

DNS-metiláció vizsgálata

A DNS-izolálás standard fenol-kloroformos extrakcióval történt. 1µg genomiális DNS-t emésztettünk 16 órán át 4 egység Hpa II metilációszenzitiv és Msp I metilációinszenzitiv 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' és antisense: 5'-CCT CAC CTG AGG GAC CTT-C-3' (9); hMLH1 (5. exon) sense: 5'-CGC TCG TAG TAT TCG TGC-3' és antisense: 5'-TCA GTG CCT CGT GCT CAC-3' (12).

PCR/SSCP analízis

A PCR-reakciókat az alábbi primerekkel végeztük: p53 (5. exon) sense: 5'-TAC TCC CCT GCC CTC AAC AA-3' és antisense: 5'-ATC GCT ATC TGA GCA GAG CT-3'; p53: (8. exon) sense: 5'-CCT ATC CTG AGT AGT GGT AA-3' és antisense: 5'-TCC TGC TTG CTT ACC TCG CT-3'; hMLH1 sense: 5'-CTT GTG TCT TCT GCT GTT TGT TTA-3' és antisense: 5'-CCG ACT AAC AGC ATT TCC AA-3' (14); hMSH2 sense: 5'-TTT AAA TGA GAT GTT TAG GCC-3' és antisense: 5'-GTA AAA ATT TCA TGT GAA GGG-3'; E2F4 sense: 5'-TGG TCC TCC TGT GTC TGG GTT-3' és antisense: 5'-AGG GAG GTA GAA GGG TTG G-3' (24).

A PCR-termékeket 95%-os formamidban (1:3) denaturáltuk 98°C-on 20 percig, majd 7,5-10%-os PAGE-sel szeparáltuk.

Eredmények

p53 status

A vizsgálatsorozat 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-nyaki 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

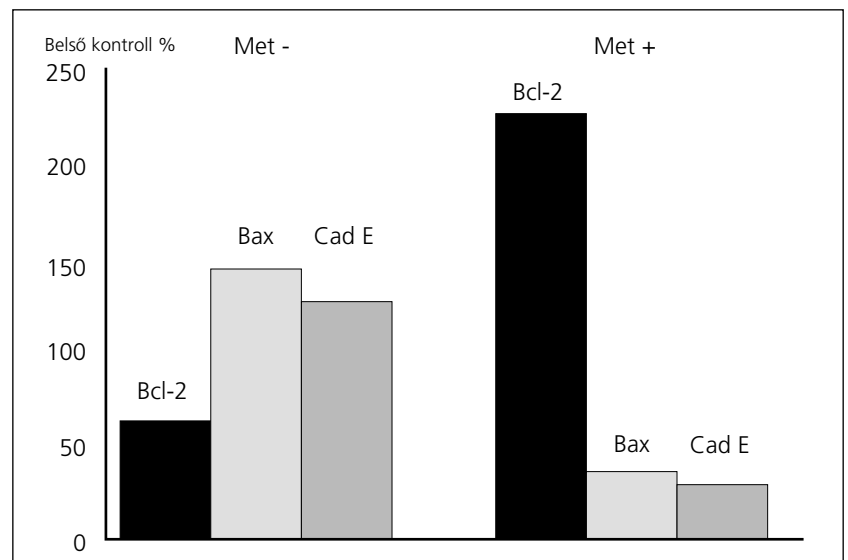
p53-mutáció jelenlétét. Ugyanezen daganatos betegekben a tumortól távol eső nyálkahártyában 11,2%-ban (17/152) igazoltuk p53-mutáció jelenlétét (1. ábra). Az „ép” szövetben a p53-mutáció a 8. exonban 6%-ban, míg az 5. exonban 7%-ban fordult elő (1. ábra). A p53-mutációkat PCR-SSCP analízis segítségével 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).

Figyelemre méltó, hogy az „ép” nyálkahártyában lévő p53-mutációk közül egy azonos típusú primer tumorral (5. exon). A többi esetben a p53-mutáció (2. ábra) az „ép” nyálkahártyában eltér a primer daganatétól (8. exon ÉM).

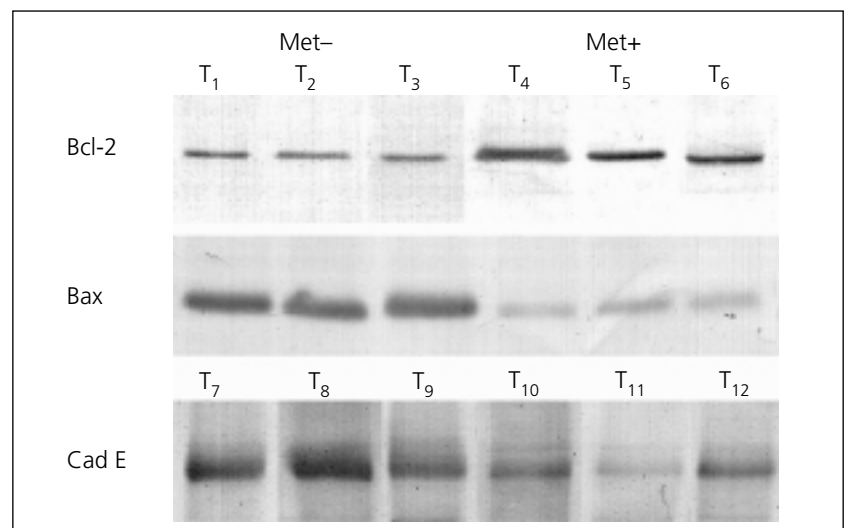
Bcl-2-, Bax-, Cadherin E-expresszió fej-nyaki daganatokban

Vizsgálatainkban 152 fej-nyaki daganatos betegben Western blot analízis segítségével a Bax-, Bcl-2- és

3. ábra. Bcl-2, Bax, Cadherin E génexpresszió metasztatizáló (Met +) és nem metasztatizáló (Met -) fej-nyaki daganatokban. Met + daganatokban a Bcl-2 szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$), a Bax- és Cadherin E-szint (Cad E) szignifikánsan alacsonyabb, mint Met-tumorokban.

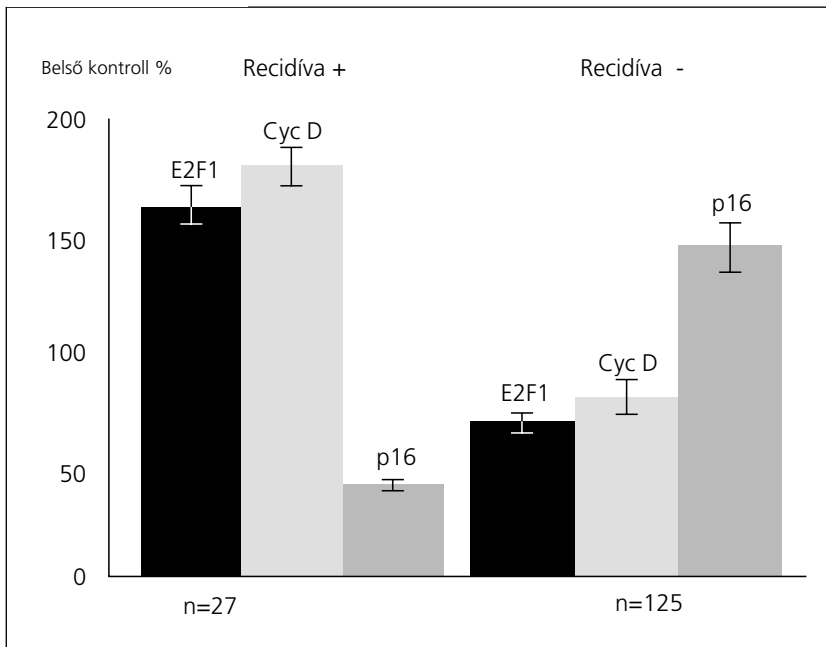


4. ábra. Bcl-2, Bax-, Cadherin E-expresszió Western blot analízise fej-nyaki daganatokban. A Bcl-2 és Bax-expresszió inverz korrelációt mutat ugyanazon daganatokban. A Cadherin E-expresszió a Bax- és Bcl-2-expressziótól függetlenül regulálódik.

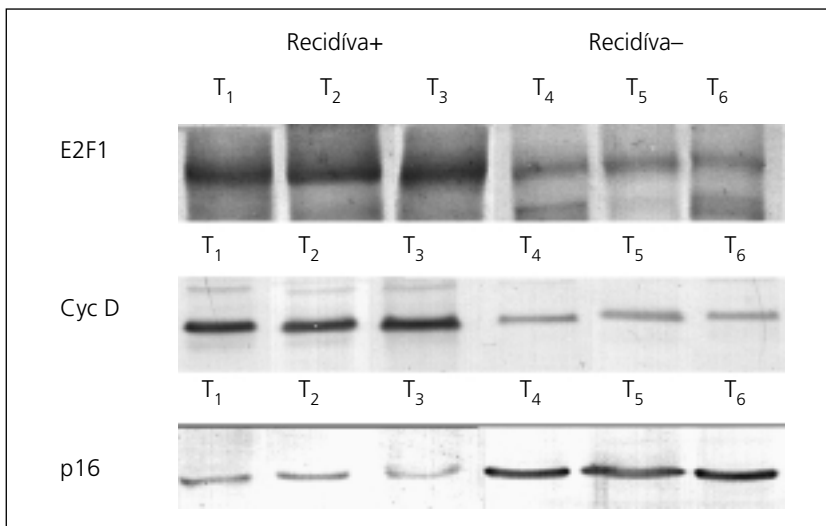


5. ábra. E2F1-, Ciklin D- (Cyc D), és p16-expresszió recidívát adó (Recidíva +) és recidívát nem adó (Recidíva -) fej-nyaki daganatokban. Recidívát adó daganatokban az E2F1 és Ciklin D szintje szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb, mint a recidívát nem adó tumorokban.

Cadherin E-expresszió mértékét határoztuk meg. Belső kontrollként Hep-2 gégecarcinoma sejteket alkalmaztunk. Valamennyi blot értékeit 20,0 mg Hep-2 protein OD értékére normalizáltuk. A vizsgálat célkitűzése az volt, hogy összefüggést keressünk a fenti gének expressziója és a daganat metasztatizáló hajlama között. Megállapítottuk, hogy metasztatizáló fej-nyaki daganatokban a Bcl-2-szint szignifikánsan ($p < 0,05$), négyszer magasabb, mint a nem metasztatizáló daganatokban. A Bax- és Cadherin E-szint ezzel szemben a metasztatizáló tumorokban ~3-szor alacsonyabb, mint az áttétet nem adó daganatokban (3. ábra). A 4. ábra a Bcl-2-, Bax- és Cadherin E fehérjék Western blot analízisét mutatja be. Metasztatizáló fej-nyaki daganatokban az apoptózist gátló Bcl-2 expressziójának mértéke magas, míg az apoptózist stimuláló Bax szintje alacsony (4. ábra). A nem metasztatizáló daganatok Cadherin E-szintje átlagosan magasabb, mint a metasztatizáló tumoroké (4. ábra).



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



Ciklin D, p16, E2F1 status

A daganatok legáltalánosabb sajátja a kontrollálatlan sejtproliferáció. Vizsgálatainkban ezért meghatároztuk a sejtproliferációt gátló p16 és a sejtproliferációt stimuláló Ciklin D expressziójának mértékét 152 fej-nyaki 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 recidívahajlama között. Megállapítottuk, hogy mind az E2F1, mind a Ciklin D szintje fej-nyaki daganat recidívákban szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$), mint primer daganatokban. Ezzel szemben primer daganatokban a p16-expresszió mértéke magasabb, mint rekurrens tumorokban (5. ábra).

A 6. ábra az E2F1, Ciklin D és p16 gének expressziós mintázatát mutatja be Western blot analízis segítségével. Ugyanazon daganatokban az alacsony p16-expresszió magas Ciklin D- és E2F1-expresszióval társul (6. ábra).

DNS mismatch repair gén inaktiválódása fej-nyaki daganatokban

A daganatok genetikai stabilitását a p53 gén mellett az ún. DNS mismatch repair gének (MMR gének) is elősegítik. Vizsgálataink célkitűzése annak meghatározása volt, hogy az MMR gének milyen mértékben és milyen mechanizmus útján inaktiválódnak fej-nyaki daganatokban. Ennek értelmében a hMLH1 és hMSH2 génmutációk gyakoriságát határoztuk meg 128 fej-nyaki 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 (9. ábra).

A hMLH1 és hMSH2 génmutációkat 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 trinukleotid mikroszatellita szekvenciákat tartalmazó gének. Ezek közé tartozik az E2F4 gén is, amely AGC trinukleotid mikrosatellita szekvenciát tartalmaz. Ezért meghatároztuk az MMR génmutációk és E2F4-mutációk együttes előfordulását. Az összes esetet figyelembe véve 21,4%-ban, a hMLH1-mutánsokat tekintve 34,5%-ban találtunk E2F4-mutációt (8. ábra).

A gének inaktiválódását a mutáció, deléción kívül a promoter régió hipermetilezettsége is elősegítheti. Ezért RFLP analízis segítségével meghatároztuk a hMLH1 gének metilezettségi statusát. Megállapítottuk, hogy az esetek 14%-ában a hMLH1 gén promoter régiója hipermetilált. A p16 gén promoter régiója a fej-nyaki daganatok 37%-ában hipermetilált. A hipermetiláltságot a Hpa II (H) metilációszenzitív enzimmel történő emésztés után is jelenlévő emésztetlen DNS jelzi.

A hipemetilált mintákban mind a Hpa II (H), mind az Msp I (M) emésztés megakadályozza a

PCR-termék kialakulását (10. ábra). A hMLH1 és p16 génekben lévő 5' CpG szigetek metilációja a transzkripció gátlásához vezet és a fehérjeszint csökkenését eredményezi (11. ábra).

Megbeszélés

A daganatok kifejlődésének egyik fontos eleme a genetikai instabilitás kialakulása. A genom stabilitásának fenntartásában a p53 tumorszuppresszor gén és a DNS javításában résztvevő DNS mismatch repair gének (MMR gének) lényegi szerepet játszanak. Környezeti karcinogének hatására (pl. dohányzás) ezen gének inaktiválódnak, amely végső soron genetikai instabilitáshoz, malignus transzformációhoz vezet.

Előzetes vizsgálatok szerint a fej-nyaki daganatok 34-67%-ában mutattak ki p53-mutációt (17). P53-mutáció a fej-nyaki daganatok dysplasiás laesióiban is észlelhető, jelenléte a malignus daganat kialakulásának veszélyét jelzi (3, 5). P53-mutációt a tumor melletti ép nyálkahártyában és a tumortól távolabb eső ép szövetben is detektáltak (10).

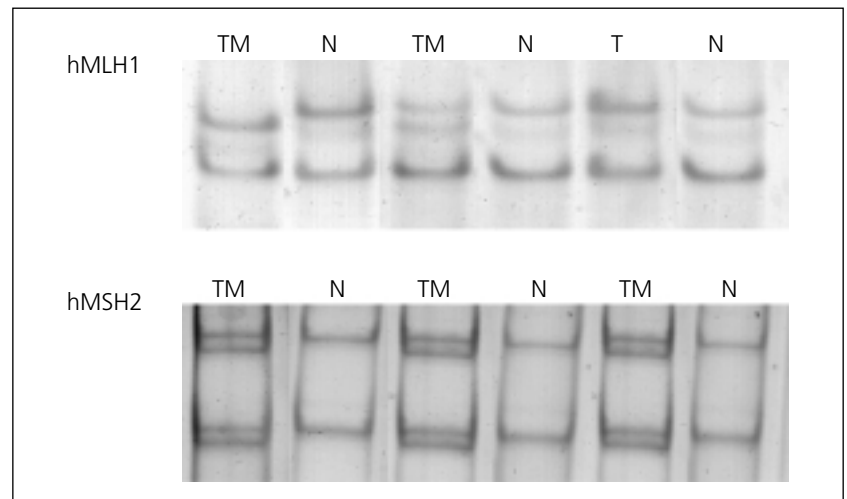
Vizsgálatainkban a p53-mutáció jelenlétét a gén 5., 7. és 8. exonjaiban vizsgáltuk PCR-SSCP módszerrel. Megállapítottuk, hogy a p53-mutáció 152 tumoros minta 37,5%-ában van jelen. A vizsgálati periódus alatt 27 betegben recidíva alakult ki. A recidívát adó primer tumorok 74%-ában (20/27) p53-mutációt lehetett azonosítani. Eredményeink arra utalnak, hogy a p53-mutáció jelenléte a tumorrecidívák kialakulását valószínűsíti. Hasonló eredményekről számolnak be korábbi vizsgálatokban is (22). A p53-mutáció előfordulása vizsgálataink szerint független a nyirokcsomóstatustól.

Megállapítottuk, hogy a tumortól távol eső 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 karcinogén-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 mikrometasztázisok formájában terjed el a szájüreg nyálkahártyájában (4). Ha ez a feltételezés korrekt, a szekunder tumorokban lévő p53-mutáció jellege a primer tumorokéval azonosítást mutatna. Eredményeink szerint a primer és szekunder tumorok p53-mutációja egymástól eltérő, poliklonális. Vizsgálatainkkal megegyező eredményekről számolnak be előzetes tanulmányok is (25). A p53-mutáció vizsgálata fej-nyaki daganatokban tehát előre jelzi a másodlagos tumorok kialakulásának és recidívák megjelenésének veszélyét. Ezen túlmenően alkalmas a daganat sugár- és kemorezisztenciájának predikciójára (8). A p53 géntermék transzkripció faktoraként ugyanis sza-

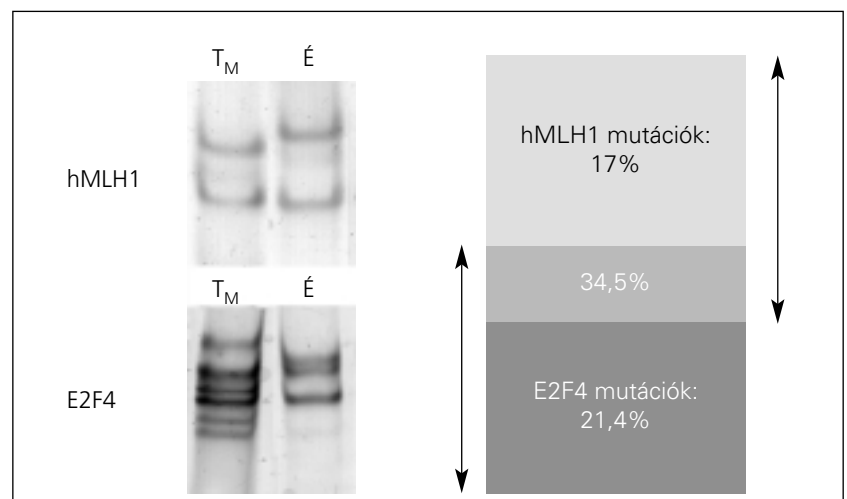
bályozza az apoptózist gátló Bcl-2 és apoptózist stimuláló Bax gének expresszióját (18).

Az apoptózis gátlása kulcsszerepet játszik a daganatos transzformációban és az invazív növekedés megindulásában is (2). Ismeretes, hogy magas Bcl-2-szint gátolja, magas Bax-szint azonban stimulálja az apoptózist. Bebizonyosodott az is, hogy a sejtek apoptóziskészségét a Bcl-2:Bax-arány határozza meg. Mutáns p53 nem képes regulálni az apoptózist stimuláló Bax gén expresszióját (26). Ezáltal a daganatok apoptóziskészsége alacsony, terápiás érzékenységük csökken. Előzetes vizsgálatok arra utalnak, hogy a fej-nyaki daganatok magas Bcl-2- és alacsony Bax-szintje rossz prognózissal társult (27). Vizsgálataink szerint a metasztatizáló fej-nyaki daganatokban a Bcl-2-szint szignifikánsan magasabb, mint az áttét nélküli daganatokban. Hasonló eredményekről számolnak be előzetes vizsgálatok is, amennyiben a Bcl-2-overexpresszió a fej-nyaki daganatok nyirokcsomó-metasztázisaival társult (20). Az áttétet adó fej-nyaki daganatok alacsony Cadherin E- szinttel jellemezhetők. A Cadherin E és Bcl-2 expressziója azonban függetlenül regulálódik. A Cadherin E - catenin β metasztázisszuppresszor rendszer fontos szerepet játszik az epithelialis architectura

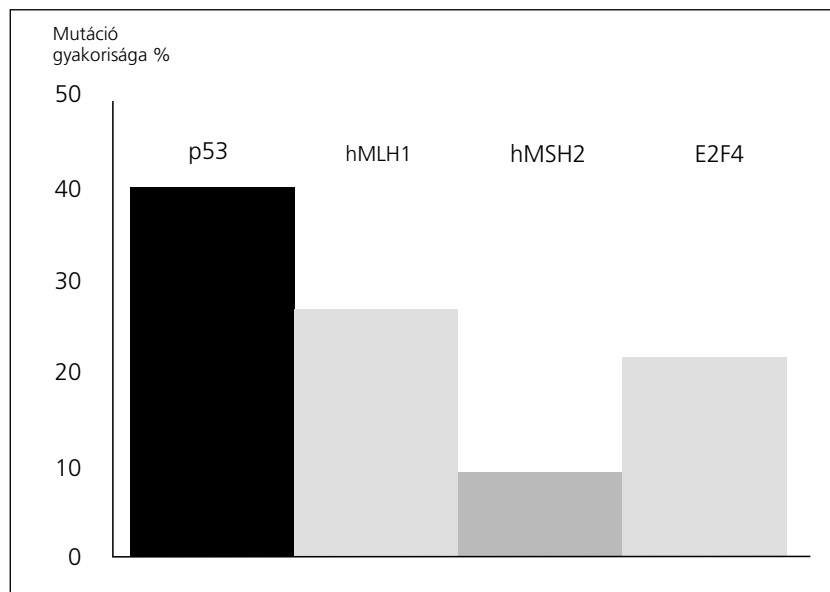
7. ábra. A hMLH1 és hMSH2 gének PCR-SSCP analízise. A nyíl a mutációt képviselő bandre (TM) mutat



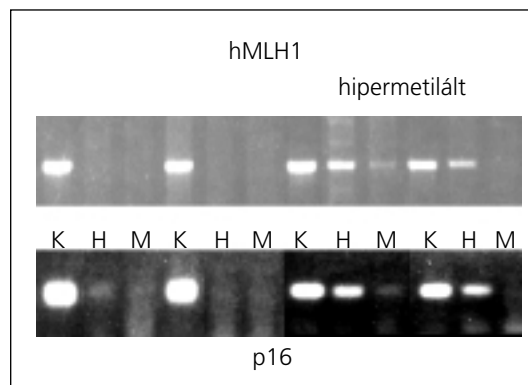
8. ábra. HMLH1- és E2F4-mutációk azonosítása PCR-SSCP analízissel. A hMLH1-mutációt mutató esetek 34,5%-ában E2F4-mutáció is előfordul.



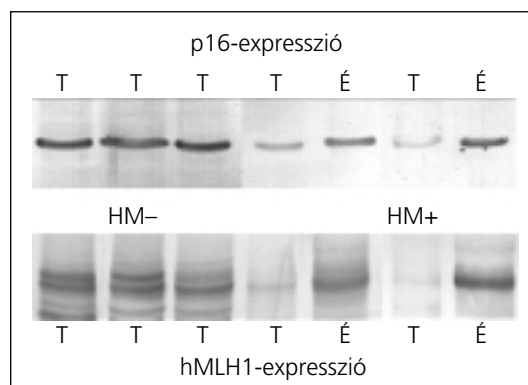
9. ábra. Fej-nyaki daganatokban vizsgált gének mutációs gyakorisága PCR-SSCP analízis alapján. P53 = 37,5%; hMLH1 = 17%; hMSH2 = 8,6%; E2F4 = 21,4%



10. ábra. Hipermetilált-ság vizsgálata hMLH1 és p16 gén promoter régióiban. Hpa II (H) enzimemésztés hatására a hipermetilált DNS-szakaszok eltűnnek. M (MSDT) enzimemésztés megakadályozza mind a hipo-, mind a hipermetilált DNS-szakaszok PCR-reakcióját.



11. ábra. P16 és hMLH1 gének expressziója. A hipermetilált (HM+) tumormintákban a p16 és hMLH1 nem expresszálódik. Western blot analízissel csak a hipometilált gének (HM-) fehérjeterméke azonosítható.



fenntartásában. A Cadherin E vagy a catenin β mutációs megváltozása, csökkent expressziója a sejtek közötti kapcsolatok fellazulásához, az invazív növekedés megindulásához vezet (11). A Cadherin E-szint vizsgálata a fej-nyaki daganatok prognosztikai markereként használható. Előzetes vizsgálatok is azt bizonyítják, hogy metasztatizáló fej-nyak daganatokban a Cadherin E-expresszió mértéke csökken (21). A p53 gén mellett a genetikai stabilitást a DNS mismatch repair gének (MMR gének) biztosítják.

Bebizonyosodott, hogy ezen gének számos sporadikus tumorban (vastagbél, gyomor, endometrium) inaktiválódnak. Ezen túlmenően az egyik típusú örökletes vastagbél-daganat kialakulásában (Lynch-syndroma) oki tényezőként

vesznek részt (16). Vizsgálataink szerint a fej-nyaki daganatok 25,6%-ában az MMR gén mutációja mutatható ki (17% hMLH1 + 8,6% hMSH2). Az MMR gének inaktiválása csökkent fehérjeszintet eredményez, amely a DNS-károsodást védő funkció elvesztését eredményezi. Előzetes vizsgálatok arról számolnak be, hogy az alacsony hMLH1-, hMSH6-szint a fej-nyaki daganatok fokozott rizikóját eredményezheti (6).

Az MMR gének inaktiválódhatnak a promoter régiók hipermetilációjával is (12). Vizsgálatainkban a tumorok 14%-ában a hMLH1 gén promoter régiójának hipermetilezettségét mutattuk ki. Hasonló vizsgálatokról előzetesen nem tudósítottak. A gén hipermetiláltsága csökkent expressziót eredményez, amely kemorezisztenciát és genetikai instabilitást eredményez.

Az MMR gének inaktiválásának további következménye az, hogy a di- és trinukleotid mikroszatellita szekvenciákat tartalmazó génekben fokozott mértékben mutációk alakulnak ki. Ezek közé tartozik az E2F4 gén is, amely trinukleotid mikroszatellita (AGC) repeatet tartalmaz. Vizsgálatainkban E2F4-mutációt a fej-nyaki daganatos mintáink 21,4%-ában észleltünk. Előzetes vizsgálatok szerint gastrointestinalis tumorok 37-42%-ában észleltek E2F4-mutációt (24). Vizsgálataink tudósítanak először arról, hogy E2F4-mutáció fej-nyaki daganatokban is előfordul. Az E2F4 gén az E2F géncsalád egyik tagja, amely géncsalád a sejtproliferációt szabályozó enzimek (timidinkináz, timidinszintáz) transzkripcióját regulálja. Az E2F gének vizsgálata fej-nyaki daganatokban azért kiemelt jelentőségű, mivel mennyiségük a daganatok 5 Fluorouracillal szembeni érzékenységét modulálhatja.

Vizsgálatainkban E2F1-overexpressziót észleltünk azon daganatokban, melyekben a p16 gén inaktiválódik és a Ciklin D-expresszió fokozódik. Megállapítottuk, hogy a Ciklin D és E2F1 expressziójának mértéke a fej-nyaki daganatok recidíváiban szignifikánsan magasabb, mint a recidívát nem adó daganatokban. Előzetes vizsgálatok alátámasztják eredményeinket, amely szerint a Ciklin D mennyisége megemelkedett mind metasztatizáló, mind rekurrens daganatokban (19).

Vizsgálatainkban a Ciklin D- és E2F1-overexpresszió p16-downregulációval társult. A p16 inaktiválódása fej-nyaki daganatokban nagy gyakorisággal fordul elő. Az inaktiválódás homozigóta delécióval vagy a p16 gén promoter régiójának hipermetilációja útján történhet (9).

Megállapítottuk, hogy a vizsgált fej-nyaki daganatos minták 37%-ában a p16 gén promoter régiója hipermetilezett. Előzetes vizsgálatok szerint a p16 gén hipermetiláltságát a fej-nyaki daganatok 43,4%-ában detektálták (7). Bebizonyosodott az is, hogy a p16 inaktiválódása a fej-nyaki daganatok kiújulásával pozitív korrelációt mutat (15).

Vizsgálataink hozzájárulnak a fej-nyaki daganatok metasztázisképzésének, recidíva hajlamának, másodlagos tumor kialakulásának, terápiás érzékenységének predikciójához és ezáltal növelik a betegek gyógyulási esélyét.

Irodalom

1. Baek MJ, Piao Z, Kim NG, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 89:60-68, 2000
2. Birchall MA, Winterford CM, Allan PJ, Hermon BV. Apoptosis in normal, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur J Cancer* 31B:380-383, 1995
3. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-2492, 1996
4. Carey TE. Field cancerization: are multiple primary cancer monoclonal or polyclonal. *Ann Med* 28:183-188, 1996
5. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 184:360-368, 1999
6. Wei Q, Eicher SA, Guan Y, et al. Reduced expression of hMLH1 and hGTBP/hMSH6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:309-314, 1998
7. El-Naggar AK, Zai S, Clayman G, et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 151:1767-1774, 1997
8. Gallo O, Chiarelli I, Boddi V, et al. Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy. *Int J Cancer* 84:573-579, 1999
9. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. 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
10. Homann N, Nees M, Conradt C, et al. Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:290-296, 2001
11. Ilyas M, Tomlinson PM. The interaction of APC, E-cadherin and β catenin in tumor development and progression. *J Pathol* 182:128-137, 1997
12. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. 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
13. Kosmidis PA. Head and neck cancer. *Euro Cancer News* 6:9-13, 1993
14. Luce MC, Marra G, Chauhan DP, et al. In vitro transcription/translation assay for the screening of hMLH1 and hMSH2 mutations in familial colon cancer. *Gastroenterology* 109:1368-1374, 1995
15. Lydiatt MW, Pavidson B, Schantz SP, et al. 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer. *Head Neck* 20:113-118, 1998
16. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary non-polyposis colorectal cancer. An update review. *Cancer* 78:1140-1167, 1996
17. Ma L, Ronai A, Riede UN, Kohler G. Clinical implication of screening p53 gene mutations in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncology* 124:389-396, 1998
18. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299, 1995
19. Nogueira CH, Rober W, Vaughan W, et al. Inactivation of p53 and amplification of Cyclin D correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope* 108:345-350, 1998
20. Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, et al. Clinical relevance of p53 and Bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 79:263-268, 1996
21. Schipper JH, Frixen U, Behrens J, et al. E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck. *Cancer Res* 51:6328-6337, 1991
22. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, et al. p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88:519-529, 1996
23. Slaughter TP, Southwick HW, Smejkel W. Field cancerization in oral stratified epithelium. *Cancer* 6:963-968, 1993
24. Souza RF, Yin J, Smolinski KN, et al. Frequent mutation of the E2F4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 57:2350-2353, 1997
25. Tjebbes GWA, Leppers vd Straat FGJ, Tilanus MGJ, et al. P53 tumor suppressor gene as a clonal marker in head and neck squamous cell carcinoma: p53 mutations in primary tumor and matched lymph node metastases. *Oral Oncol* 35:384-389, 1999
26. Wilson GD, Richman PI, Sanders M. P53 status of head and neck cancer, relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer* 71:1248-1252, 1995
27. Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 86:913-920, 1999