

Cyclin D1, p27 és p63 prognosztikai jelentősége orális leukoplakiában

Kövesi György,¹ Szende Béla²

Semmelweis Egyetem, ¹Parodontológiai Klinika, ²I. számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet és MTA-SE EKSZ Molekuláris Patológiai Kutatócsoport, Budapest

Az orális leukoplakia súlyosságának és malignizálódásának jobb felderítése érdekében fontos lépés az apoptózist és a sejtproliferációt szabályozó gének kifejeződésének meghatározása. A jelen vizsgálatban a cyclin D1, a p27 és a p63 szöveti megjelenítésével folytattuk a korábban a Ki-67-, p53-expresszióra és apoptózisindexre vonatkozó tanulmányokat. 18 beteg orális leukoplakiájának klinikai és patológiai – immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. Klinikailag homogén, non-homogén, vagy noduláris és erythroleukoplakiát különböztettünk meg, patológiailag a dysplasia súlyossága szerint végeztük a besztást. A biopsziás mintákon a cyclin D1, p27 és p63 immunhisztokémiai vizsgálatát hajtottunk végre, és 1000 hámséjtet értékelve százalékban fejeztük ki a pozitivitást. Megállapítottuk, hogy a leukoplakia súlyosságával párhuzamosan nőtt a cyclin D1 expressziója. A p27-expresszió index homogén és noduláris leukoplakiában 14-16%-os, míg erythroleukoplakiában 1-2%-ra csökkent. A p63-expresszió homogén leukoplakiában átlagban 10%, noduláris formában 5%, míg erythroleukoplakiában megközelelti a 20%-ot. Lehetségesnek tartjuk, hogy a cyclin D1-, p27- és p63-expresszió jellegzetes változása prognosztikai jelentőséggel bír orális leukoplakia esetében. *Magyar Onkológia* 48:309–313, 2004

Studies on the expression of genes regulating cell proliferation and apoptosis is of importance in relation to understanding the severity of the process and the possibility of malignant transformation. In the present study immunohistochemical demonstration of cyclin D1, p27 and p63 has been added to our previous investigations on Ki-67, p53 and apoptosis index. Clinical and pathological-immunohistochemical studies on oral leukoplakias of 18 patients were performed. Clinically homogenous, non-homogenous or nodular, and erythroleukoplakia were distinguished. Pathologically the grading was made according to the degree of dysplasia. Immunoperoxidase reactions for cyclin D1, p27 and p63 were carried out, and the positivity was expressed in per cent, considering 1000 epithelial cells. Expression of cyclin D1 increased in parallel with the severity of leukoplakia. p27 expression was 14-16% in homogenous and nodular leukoplakias, whereas in erythroleukoplakia it decreased to 1-2%. p63 expression was 10% in average in homogenous, and 5% in nodular leukoplakias. While in erythroleukoplakias it increased to 20 per cent. The characteristic cyclin D1, p27 and p63 phenotype in various forms of leukoplakia may be considered as prognostic factors. *Kövesi G, Szende B. Prognostic significance of cyclin D1, p27 and p63 expression in oral leukoplakia. Hungarian Oncology* 48:309–313, 2004



Bevezetés

A leukoplakia a szájüregben leggyakrabban előforduló praecancerosus állapot (4). A világon mindenhol csökken a leukoplakia alapján kialakuló rosszindulatú daganatok száma, kivéve Magyarországot, ahol az elmúlt 15 évben a szájüregi rák 1,84%-ról 2,15%-ra emelkedett az összes tumoros megbetegedés arányában.

Bár rendelkezésre állnak nem invazív módszerek, mint pl. a jódos, vagy toluidinkék O vizsgálata (OraTest, 14), biztosan elkülöníteni a leukoplakiát és a rosszindulatú daganatot csak hisztológiai módszerrel lehet. A mindennapi gyakorlatban alkalmazott rutin szövettani vizsgálat azonban nem alkalmas a betegség prognosztizálására, illetve a betegség súlyosságának és tendenciájának megállapítására (1).

A sejtproliferáció és a programozott sejthalál kvalitatív vizsgálata, továbbá az ezeket szabályozó gének expressziójának meghatározása közelebb vihet a fenti kérdések megoldásához. Az orális leukoplakia és carcinomák vonatkozásában számos, főleg a cyclin D1, a p53 és Ki-67 expressziójára irányuló vizsgálat eredménye ismeretes (2, 3, 10, 12, 16, 17, 18, 21, 29, 30, 34).

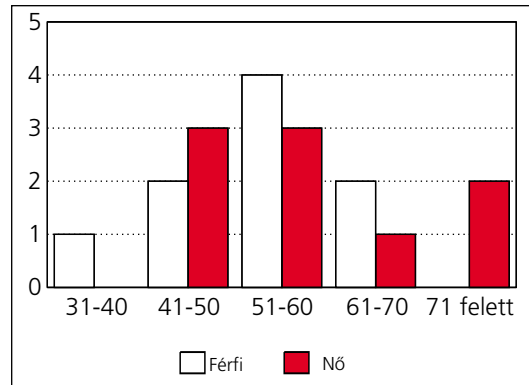
Közlésre érkezett: 2004. augusztus 30.
Elfogadva: 2004. november 30.

Levelezési cím: Dr. Szende Béla,
SE I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. Telefon-Fax: 1-266-0451

Készült a T 32711 sz. OTKA Pályázat támogatásával

Korábbi vizsgálatunkban az apoptózis index, valamint a Ki-67- és p53-expresszió meghatározását végeztük el az orális leukoplakia különböző formáiban (15). Jelen munkánkban a cyclin D1,

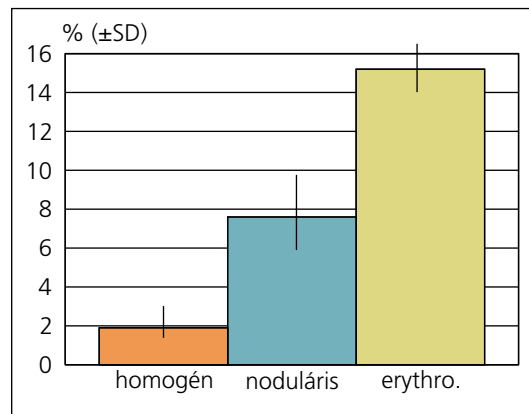
1. ábra.
A betegek kor és nem szerinti csoportosítása



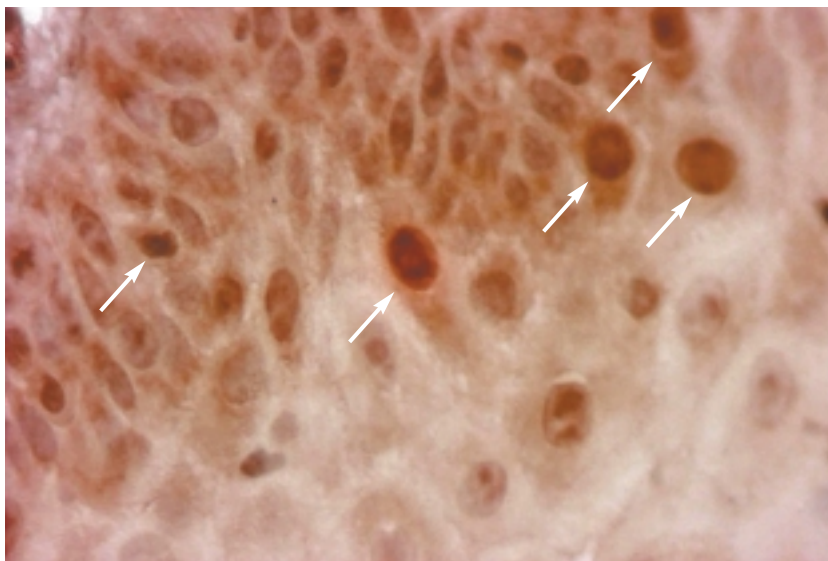
1. táblázat.
A leukoplakia súlyossága és a dysplasia közötti összefüggés

Dysplasia	Nincs	Mérsékelt	Súlyos
Leukoplakia			
Homogén	7	2	
Noduláris		5	
Erythro			4

2. ábra.
A cyclin D1-expresszió változása a leukoplakia súlyosságával párhuzamosan



3. ábra. Cyclin D1-pozitív és erősen pozitív (nyilak) sejtek egy erythroleukoplakia metszetében (anti-cyclin D1, immunperoxidáz, 600X)



p27 és p63 szöveti megjelenítésével kívántunk teljesebb képet kapni az apoptózist és sejtprolifrációt befolyásoló gének kifejeződéséről orális leukoplakiában.

Tashio és mtsai (32) szerint a cyclin D1-overexpresszió génátrendeződés eredménye, aminek következtében a génamplifikáció gyakran megjelenik humán malignus tumorokban (7). Garattumorokban a cyclin D1 és az epitheliális növekedési faktor (EGF) receptor amplifikációja ismert az esetek 1/3-ában (2, 19).

Nyelvcarcinómák esetén azokban a betegekben, ahol a cyclin D1 overexpresszált, a tumor-növekedés agresszívebb, azaz az öt éves túlélés 39%, míg azokban az esetekben, amelyekben a cyclin D1 nem overexpresszált, az öt éves túlélés 62% (20).

A nemrég klónozott p63^{p73/p40/CUSP/Ket} egy korábban klónozott, p53-kapcsolt gén, melyet a 3q27-29 kromoszómán lokalizáltak, és ami strukturális és funkcionális homológiát mutat a p53 transzkripció faktor-családdal (28). A p63 képes DNS-t kötni és transzaktiválni a p53-reszponzív géneket, valamint apoptózist indukálni, azaz a szuppresszor géncsalád tagja.

Orális praecancerosus és rákos állapotokban a p63-at eddig még nem vizsgálták, de alulszabályozottnak találták a garat elszarusodó leghámrákjában és előrehaladott praemalignus lézióiban (11).

A p27^{Kip1} egy cyclindependens kináz enzimgátló, melynek mennyiségi csökkenése inkább csökkent fehérje stabilitás, mint géndeleció, vagy -mutáció eredménye (25). A p27 számos humán carcinómában megjelenik (5, 6).

Beteganyag és módszer

A Semmelweis Egyetem Parodontológiai Klinikájának beteganyagából 18 beteg orális leukoplakiáját vizsgáltuk. Klinikailag homogén, non-homogén, vagy noduláris és erythroleukoplakiát különböztettünk meg. A betegek átlagéletkora 55,6 év (33 és 73 év között) volt. A vizsgált személyek közül 10 nő és 8 férfi. A betegek kor és nem szerinti megoszlását az 1. ábra mutatja. A 18 beteg közül 15 dohányzott, 7 férfi és három nő adott igenlő választ arra a kérdésre, hogy fogyaszt-e rendszeresen alkoholt.

A beteg területről szövettani vizsgálathoz mintát vettünk, melyet 4%-os neutrális formalinban fixáltunk, paraffinba ágyasztunk és 8 mm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket hematoxilin-eosin módszerrel festettük és a cyclin D1, p27 és p63 meghatározásához immunperoxidáz vizsgálatot végeztünk. A metszeteket proteínáz-K-val előkezeltük, hogy a sejtek átjárhatóak legyenek a specifikus monoklonális antitestek számára. Minden, a vizsgálatban alkalmazott antitest DAKO (Glostrup, Dánia) termék volt, melyekkel 1:100 hígításban, egy éjszakán át kezeltük a metszeteket. A proteínáz-K mellett a metszeteket methanollal és H₂O₂-vel inkubáltuk az endogén peroxidáz inaktíválására. A következő napon anti-egér IgG-t alkalmaztunk másodlagos antitest-

ként, ugyancsak 1:100 hígításban. Az előhívószert diaminobenzidin volt.

A szöveti dysplasia mértékét két egymástól független patológus vizsgálta meg a hematoxilín-eosinnal festett metszeteken a Porter által meghatározott kritériumok szerint (15). A cyclin D1-, p27- és p63-pozitivitást 1000 hámsejt figyelembevételével határoztuk meg és százalékban fejeztük ki.

A statisztikai analízist egy mintás Student „t”-próbával végeztük.

Eredmények

A dysplasia mértékét az 1. táblázat tünteti fel. Látható, hogy a dysplasia mértéke a betegség súlyosságával párhuzamosan nő.

A 2. ábra a cyclin D1-expresszió változását jelzi a leukoplakia klinikai típusai szerint. Az ábrán látható, hogy a leukoplakia súlyosságával párhuzamosan nő a cyclin D1 expressziója. A 3. ábra a cyclin D1 szöveti expressziójának szövettani megjelenését mutatja egy erythroleukoplakiás esetben.

A 4. ábra a p27^{Kip1} kifejeződésének változását mutatja. Megállapítható, hogy nincs különbség a p27-expresszióban a homogén és noduláris leukoplakiák között, míg az érték az erythroleukoplakiában statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb, mint az előző két klinikai típusban ($P < 0,05$). Az 5. ábra p27-pozitív noduláris leukoplakia szöveti képét mutatja.

A 6. ábra a p63-expresszió változását jelzi a leukoplakia különböző klinikai típusaiban. A p63-expresszió homogén leukoplakiában viszonylag magas, noduláris leukoplakiában a felére csökken, míg erythroleukoplakiában statisztikailag szignifikánsan emelkedik ($p < 0,001$). A p63 gyakrabban jelenik meg a parabasalis, mint a basalis rétegben. Ezt mutatja a 7. ábra, mely egy erythroleukoplakiás betegből nyert anyagból készült.

Megbeszélés

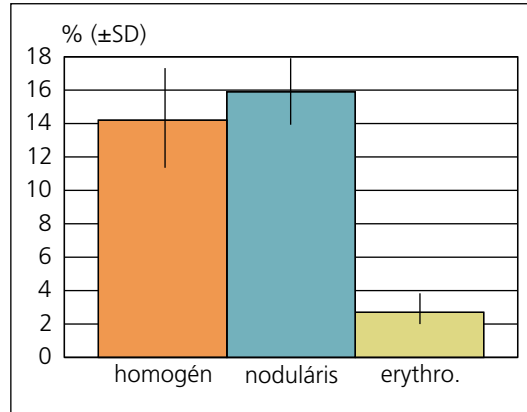
Az irodalmi adatok szerint malignus transzformáció főleg olyan leukoplakiás esetekben fordul elő, ahol a szöveti dysplasia megjelenik (4,17, 33, 35). Az enyhe és mérsékelt dysplasiás esetek 5%-ából, míg a súlyos dysplasiás esetek 43%-ából alakul ki intraepitheliális vagy invazív malignus folyamat. Az általunk vizsgált génproduktumokra vonatkozóan – orális leukoplakiát illetően – kevés adat áll rendelkezésre. A cyclin D1 azokban a hámsejtekben expresszálódik, melyek a G1/S fázis átmenetben vannak (2). A cyclin D1-festődés is érdekes módon nem annyira a basalis, hanem a parabasalis rétegben található (12).

Ugyanakkor azt is megállapították, hogy vannak olyan rendszerek, ahol a cyclin D1 apoptózist indukál. A légutakban a cyclin D1 növekvő expressziója preinvazív állapotokban a malignitás növekvő veszélyének jele (10, 11).

Saját vizsgálataink alátámasztják a fenti eredményeket. Orális praeblastomatosis állapotban a betegség súlyosságával párhuzamosan nő a cyc-

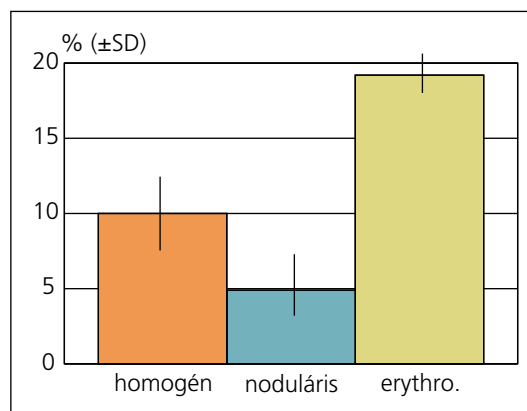
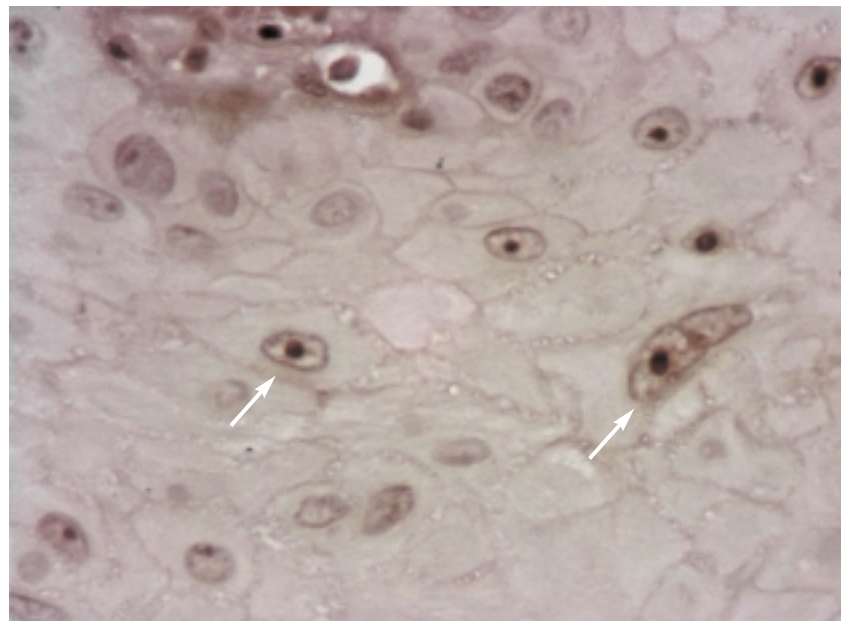
lin D1-et overexpresszáló sejtek száma. Ez az expresszió növekedés felhasználható a betegség súlyosságának megítélésére és kimenetelének megjelölésére.

A szabályos sejtciklus-progressziót számos komplex fehérje interakciója ellenőrzi, mint pl. a cyclindependens kinázok (threonin foszforiláció) és a cyclindependens kináz inhibitor p27^{Kip1} (CDKI). A p27^{Kip1} nyugalmi állapotú sejtekben található, mitotikusan nem aktív, de differenciáló-



4. ábra.
A p27-expresszió változása a leukoplakia súlyosságával párhuzamosan

5. ábra. Elnyomott p27-pozitív sejtek (nyílak) egy erythroleukoplakia metszetében (anti-p27, immunperoxidáz, 600X)



6. ábra.
A p63-expresszió változása a leukoplakia klinikai típusai szerint

dó keratinocytákban a basalis és parabasalis rétegben kimutatható (28).

A p27^{Kip1}-ről kimutatták, hogy gátolja több cyclindependens kináz (Cdk) aktivációját (5). A p27^{Kip1}-expresszió szintje fordított arányban van a humán emlő (27) és tüdőcarcinoma (8) kialakulásával. A p27^{Kip1}-kifejeződésének csökkenése agresszív neoplasticus tulajdonságra és rossz prognózisra utal (5, 13, 26).

Saját anyagunkban erythroleukoplakiában a sejtek p27^{Kip1}-expressziója statisztikailag szignifikánsan csökkent ($p < 0,005$), aminek prognosztikus jelentőséget tulajdoníthatunk.

Az irodalmi adatok szerint a p63 gén nem játszik jelentős szerepet, mint tumorszuppresszor, mert primer tumorokban ritkán található mutáció (23, 31). Azonban a p63 mRNS és protein több humán tumorban overexpresszálódik, ami génamplifikáció eredménye. Bizonyított, hogy a p63 overexpressziója gyakori fej-nyaki carcinómákban is (9).

Weinstein és mtsai (34) megállapították, hogy a p63 gén jelenléte sok humán szervben játszik fontos szerepet a hámszövet fejlődésében. Prostatarákos betegeken végzett vizsgálataik során azt találták, hogy a p63 alkalmas a prostatacarcinómák diagnosztizálására, valamint a benignus és malignus tumorok elkülönítésére.

Azt is kimutatták, hogy a garat praecancerosus állapotokban a p63 overexpresszál (28). A p63-expressziót vizsgálták magasan differenciált laryngealis elszarusodó laphámrákos betegeken és megállapították, hogy a p63 központi szerepet játszik az ektodermális differenciálódásban (22). Nylander (24) kimutatta, hogy normális szájnyálkahártyán a p63 a basalis és a parabasalis rétegre korlátozódik.

Vizsgálatunkban a p63 normális expressziója homogén leukoplakiában még megfigyelhető volt. Noduláris leukoplakiában downregulációt tapasztaltunk. Véleményünk szerint ez is egy, a malignus transzformáció elleni védekező mechanizmus. Amikor a védekezés már nem képes

egyensúlyt tartani – mint erythroleukoplakiában – a p63-expresszió statisztikailag szignifikánsan emelkedik ($p < 0,01$).

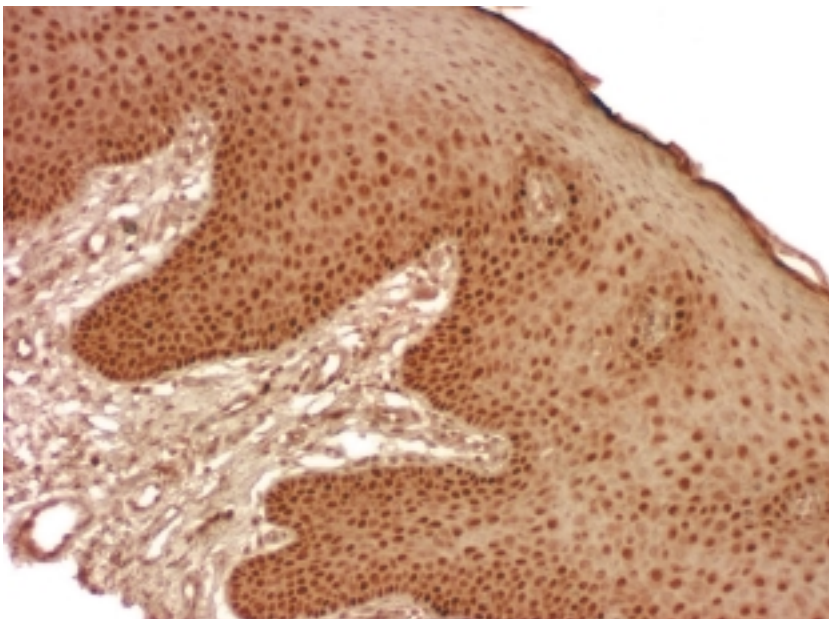
A szájban kialakuló rosszindulatú daganatok aránya Magyarországon a meghozott dohányzás elleni lépések és a cigaretta árának drasztikus emelése ellenére emelkedik. Mivel a helyzet nagyon hasonlít ahhoz, amit az alkoholfogyasztásnál tapasztaltunk, hogy az alkoholisták inkább nem eszik, de iszik, úgy gondoljuk, hogy ezen régió daganatos problémáit nem lehet törvényi módszerekkel megoldani. E megoldásához jobb felvilágosító munka, rendszeres szűrővizsgálatok, és az így kiszűrt betegek korai kezelése szükséges.

Az általunk végzett cyclin D1-re, p27-re és p63-ra vonatkozó vizsgálatok eredményei, így a cyclin D1, és p63 fokozott megjelenése, a p27 csökkenése a leukoplakia súlyosságával párhuzamosan arra utalnak, hogy a fenti génproduktumok immunhisztokémiai kimutatása prognosztikai jelentőséggel bír orális leukoplakia esetében.

Irodalom

1. Bánóczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *Dental Educ* 65:322-327, 2001
2. Bratkowa J, Lukas J, Muller H, et al. Pattern of D type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res* 55:949-956, 1995
3. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Eng J Med* 332:712-717, 1995
4. Burkhard A. Premaligne Veränderungen der Mundschleimhaut. *Der Pathologe* 6:126-132, 1985
5. Chairle R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:91-94, 2001
6. Davison EA, Lee CSL, Naybor MJ, et al. The cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 regulates both DNA synthesis and apoptosis in mammary epithelium but not required for functional development during pregnancy. *Mol Endocrinol* 17:2436-2447, 2003
7. Diehl JA, Yang W, Riemerman RA, et al. Hsc-70 regulates accumulation of cyclin D1 and cyclin D1 dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 23:1764-1774, 2003
8. Eposito V, Baldi A, DeLuca A, et al. Prognostic role of cyclin dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57:3381-3384, 1997
9. Hibi K, Trink B, Pattunajan M, et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5462-5467, 2000
10. Izzo JG, Papadimitropoulou VA, Liu DD, et al. Cyclin D1 genotype response to biochemoprevention and progression rate to upper aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:198-205, 2003
11. Janson FL. Management of advanced premalignant laryngeal lesions. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11:462-466, 2003
12. Kotelnikov VM, Coon JS, Mundle S, et al. Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res* 3:95-101, 1997
13. Katner A, Gootam P, Hoang QB, et al. Recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and apoptosis in human 780-0 renal cancer. *J Urol* 168:766-773, 2002
14. Kövesi G. OraTest: A new method for differentiating between benign and malignant tumors (in Hungarian). *Fogorv Szle* 91:107-116, 1998
15. Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology* 65:331-336, 2003

7. ábra.
P63-pozitivitás egy erythroleukoplakia metszetében (anti-p63, immunperoxidáz, 150X)



16. Kyomoto R, Kumazawa H, Iwanaga M, et al. Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 74:576-581, 1997
17. Liu SC, Klein-Szántó AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 36:145-151, 2000
18. Mathew R, Arora S, Khanna R, et al. Alteration in cyclin D1 expression in oesophageal squamous cell carcinoma in the Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol (Suppl)* 127:251-257, 2001
19. Matsuda M, Hitokawa N, Nokashima T, et al. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer* 78:390-395, 1996
20. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 36:194-198, 2000
21. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipskind RA. Activation of cyclin D1 expression by ERK5 cascade. *Oncogene* 22:5387-5398, 2003
22. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 442:1-7, 2003
23. Nishi H, Izaka K, Sagawa Y, et al. Mutation and transcription analyse of the p63 gene in cervical cancer. *Int J Oncol* 15:1149-1155, 1999
24. Nylander K, Coates PJ, Hall PA. Characterisation of the expression pattern of p63(alpha) and (delta) Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer* 87:368-372, 2000
25. Oh CW, Penneys N. p27 and Mib expression in actinic keratosis, Bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 26:22-26, 2004
26. Philip-Staheli J, Kyung-Hoon QB, Denny L, et al. Distinct roles for p53, p27Kip1, and p21 during tumor development. *Oncogene* 23:905-913, 2004
27. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3:2228-2236, 1997
28. Pruneri G, Pignataro L, Manzotti M, et al. p63 in laryngeal squamous cell carcinoma: Evidence for a role of TA-p63 down-regulation, in tumorigenesis and lack of prognostic implications of p63 immunoreactivity. *Lab Invest* 82:1327-1334, 2002
29. Sauter ER, Cleveland D, Trock B, et al. p53 is overexpressed in fifty percent of pre-invasive lesions of head and neck epithelium. *Carcinogenesis* 15:2269-2274, 1994
30. Shin DM, Kim J, Ro JY, et al. Activation of p53 expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54:321-326, 1994
31. Shumara M, Shishikura T, Kimura H, et al. Mutational analysis of p51/Ta p63 gamma a p53 homolog in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene* 18:3761-3765, 1999
32. Tashiro E, Maruki H, Minato Y, et al. Overexpression of cyclin D1 contributes to malignancy by upregulation of fibroblast growth factor receptor 1 via pRb/E2F pathway. *Cancer Res* 63:424-431, 2003
33. Warnakulasuriya KAAS, McDonald DG. Epithelial kinetics in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 24:163-169, 1995
34. Weinstein M, Sigoretti S, Lada M. Diagnostic utility in immunochemical staining for p63 sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod Pathol* 15:1302-1308, 2002
35. Weinstein IB. Relevance of cyclin D1 and other molecular markers to cancer chemoprevention. *J Cell Biochem* 25:23-28, 1996