

STUDII GENETICE ÎN DIAGNOSTICAREA ȘI STABILIREA STRATEGIILOR TERAPEUTICE ADECVATE ALE CANCERULUI ESOFAGIAN

BOGDAN SANDOLACHE¹, CĂTĂLINA MARIANA LUCA², LAURA BUBURUZAN³, CĂTĂLIN GABRIEL SMARANDACHE⁴, CRISTINA VERONICA ANDREESCU⁵, ALEXANDRU SABĂU⁶, VASILE SÂRBU⁷

¹Spitalul Universitar de Urgență București, ^{2,3}Universitatea din București, ^{4,5}Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, ⁶Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu, ⁷Spitalul Clinic Constanța

Cuvinte cheie: cancer, gene, imunofluorescența, MLPA, p53

Rezumat: Cancerul este o maladie complexă care apare ca rezultat al acumulării progresive de aberații genetice și modificări epigenetice care reușesc să scape de sub controlul celular normal. Celulele neoplazice pot avea numeroase aberații genetice dobândite (aneuploidia, rearanjări cromozomiale, amplificări, deleții, recombinări genice și mutații care duc la pierderea sau câștigul unei funcții). Aberațiile conduc la o comportare anormală comună tuturor celulelor neoplazice: creștere neregulată, lipsa inhibiției de contact, instabilitate genomică și probabilitatea de metastază. Genele care pot suferi mutații în cancer pot fi împărțite în două clase principale: gene care prezintă în ambele alele mutații de tip „gain of function” (mutații activatoare), cunoscute ca oncogene; și gene care prezintă în ambele alele mutații de tip „loss of function” (mutații inactivatoare), cunoscute ca gene supresoare de tumori. Cancerul poate apărea prin aberații ale diferitelor combinații de gene, care pot fi mutante, supraexprimate sau eliminate. În mai multe tipuri de cancer, biomarkerii au îmbunătățit capacitatea noastră de diagnostic, prognostic, tratament și predicție. În general, un biomarker adecvat ar trebui să fie util în definirea și identificarea riscurilor în primele stadii ale carcinogenezei. În plus, biomarkerii pot fi analizați într-un mod non-invaziv și economic și, prin urmare, este de mare valoare să investim în căutarea mai multor biomarkeri. Metodele folosite în determinarea prezenței și stadializării cancerului sunt: Imunofluorescența, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), Imunohistochimie (secvențiere p53).

Keywords: cancer, genes, immunofluorescence, MLPA, p53

Abstract: Cancer is a complex disease which appears as a result of the progressive accumulation of genetic aberrations and epigenetic modifications which manage to escape from normal cellular control. Neoplastic cells can have numerous acquired genetic aberrations (aneuploidy, chromosomal rearrangements, amplifications, deletions, genetic recombinations and mutations leading to loss or gain of function). Aberrations lead to an abnormal behaviour common to all neoplastic cells: irregular growth, absence of contact inhibition, genomic instability and likelihood of metastasis. The genes which can undergo mutations in cancer can be divided into two main classes: genes which undergo „gain of function” mutations, known as oncogenes, and genes which present in both alleles „loss of function” mutations, known as tumour suppressor genes. Cancer may appear due to aberrations of the various genetic combinations, which can be mutant, overexpressed or eliminated. In several types of cancer, the biomarkers have improved our capacity of diagnosis, prognosis, treatment and prediction. In general, an adequate biomarker should be useful for the definition and identification of the risks during the first stages of carcinogenesis. Moreover, biomarkers can be analysed in a non-invasive, economical manner and, consequently, we should invest the search for more biomarkers. The methods used to determine the presence and staging of cancer are: immunofluorescence, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), immunohistochemistry (p53 sequencing).

Imunofluorescența este un test biologic care combină utilizarea de anticorpi și molecule fluorescente pentru depistarea unor obiective specifice în celule și țesuturi. Tehnica este foarte sensibilă și versatilă și găsește numeroase aplicații în domeniile imunologiei, morfologiei celulelor, diagnosticare genetică și histopatologie.

Markeri moleculari informativi: oncogene și gene supresoare de tumori

În cancer, oncogenele și genele supresoare de tumori pot evidenția o asociere specifică cu tipul de tumoră. Aceste gene pot fi alterate în timpul carcinogenezei de către diferite tipuri de mutații cum ar fi mutațiile punctiforme, translocațiile cromozomale, amplificările genice sau delețiile. Mai mult, aceste gene pot fi analizate la diferite nivele – ADN, ARN sau proteine.(1)

¹Autor corespondent: Bogdan Sandolache, Str. Splaiul Independenței, Nr. 169, Sector 6, București, România, E-mail: bogdans67@yahoo.com, Tel: +40722 666308

Articol intrat în redacție în 30.04.2013 și acceptat spre publicare în 05.08.2013
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2013;2(4):54-57

Oncogenele sunt ținte terapeutice în medicina translațională. Proteinele oncogenice din celule canceroase pot fi ținta unor molecule mici, iar atunci când sunt exprimate pe suprafața celulară pot fi ținta unor anticorpi monoclonali.

În urma studierii datelor din literatura de specialitate care permit corelarea rezultatelor histologice și imunohistochimice au fost selectați următorii markeri moleculari pentru analizele de imunofluorescență: i) *EGFR* și *HER2/neu* ca oncogene; ii) *p53* și *APC* ca gene supresoare tumorale; *p53* este o genă care codifică pentru o proteină implicată în procesul de control al ciclului celular și a fost foarte utilă pentru identificarea modificării genetice la nivelul ciclului celular.

Evidențierea modificărilor moleculare la nivelul activării oncogenelor (studii imunohistochimice)

Analiza imunohistochimică a țesutului esofagian tumoral evidențiază o infiltrare neoplazică de celule epiteliale în țesutul conjunctiv în cazul pacientului P1. Colorația cu hematoxilina-eozină este caracterizată histopatologic printr-o infiltrare neoplazică în țesutul celulo-adipos perivisceral de la nivelul esofagului terminal.

Majoritatea oncogenelor codifică proteine care fac parte din căile de semnalizare. Ele pot fi clasificate în două grupuri principale: protein kinaze non-receptor și proteine de legare guanozin trifosfat.(2,3)

Pentru realizarea acestei activități au fost desemnați doi markeri moleculari (oncogene): *HER2* și *EGFR*, care au fost analizate în probele de țesut tumoral și de țesut normal de esofag prin imunofluorescență.

HER2/neu (cunoscută și ca **ErbB-2**) este gena codificatoare pentru "Human Epidermal growth factor Receptor 2". Este membră a familiei de proteine ErbB, fiind o tirozin-kinază implicată în căi de semnalizare pentru creștere celulară și diferențiere. Este o proto-oncogenă localizată pe brațul cromozomal lung 17 (17q21-q22).

Supraexpresia *HER2* a fost raportată doar în 7.7% din carcinoamele de esofag și doar 1 din 6 cazuri de adenocarcinom de esofag.(4) Activarea *Neu* potențează motilitatea celulelor tumorale, secreția de proteaze, invazia și de asemenea modulează funcția de *checkpoint* a ciclului celular.

În cazurile de cancer de esofag de tip scuamos studiate este evidențiată o supraexpresie a *HER2* (figura nr. 2), comparativ cu probele de țesut normal provenite de la același pacient (figura nr. 1). În figurile nr. 3 și 4 sunt prezentate imagini de imunofluorescență pe țesut esofagian provenite de la pacientul 5. *HER2* are o dispoziție perimembranară continuă.

Figura nr. 1. Imunofluorescența pentru HER2/neu în țesut normal

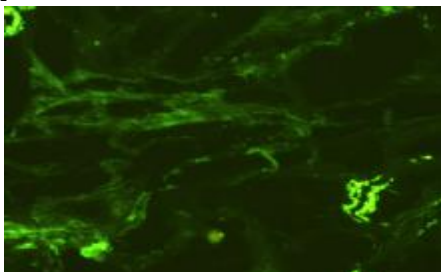
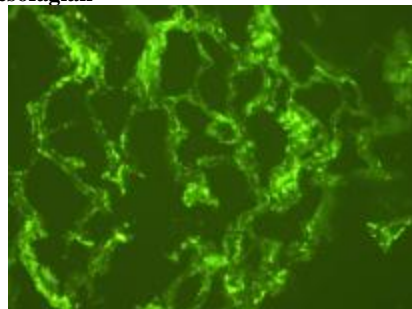


Figura nr. 2. Imunofluorescența pentru HER 2/neu în cancerul esofagian



Prin tehnica de imunofluorescență se pot obține informații care pot permite aprecierea continuității colorării de-a lungul membranelor celulelor tumorale, dar și a numărului de celule imunocolorate, care vor fi utile oncologului în tratamentul anti-EGFR.

EGFR (epidermal growth factor receptor) denumit și ErbB-1; *HER1* la om este un receptor de suprafață, făcând parte din familia receptorilor factorilor de creștere epidermali (EGF-family) care au ca liganzi proteinele extracelulare.(5) Este strâns corelat cu receptori tirozin-kinazici: *HER2/c-neu* (ERB2), *HER3*(ERB3) și *HER4* (ERB4). În cancer, gena *EGFR* prezintă mutații care afectează atât expresia, cât și activitatea sa.(6)

Dispoziția perimembranară continuă a proteinei *EGFR* și reacția pozitivă a țesutului tumoral de esofag la tratamentul cu anticorp *EGFR* este evidențiată și în cazul pacienților studiați (figura nr. 4). În cazul țesuturilor normale de esofag reacția de imunofluorescență a fost negativă (figura nr. 3).

Figura nr. 3. Imunofluorescența pentru EGFR în țesut normal de esofag

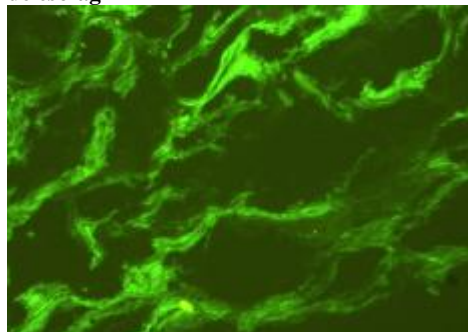
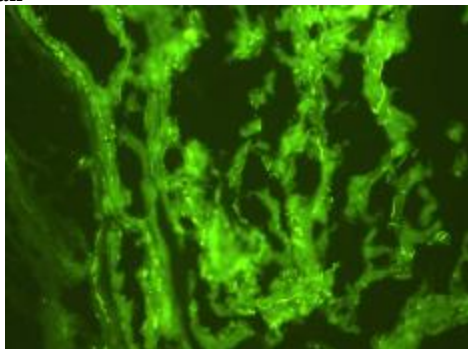


Figura nr. 4. Imunofluorescența pentru EGFR în cancer esofagian



Identificarea eventualelor modificări genetice la nivelul procesului de control al ciclului celular (studii imunohistochimice)

Cele mai frecvente modificări genetice observate în tumorile umane afectează o fosfoproteină nucleară de 393 de

ASPECTE CLINICE

aminoacizi, cunoscută ca proteina p53, după greutatea sa moleculară. Mutații ale genei p53 au fost observate în peste 50% din tumorile umane. Defecte ale genei p53 în linia de germinare conduc la o tendință de a dezvolta diverse tumori, în special a țesutului conjunctiv.

Există strânse corelații între formarea tumorilor și mutațiile genei p53, care indică faptul că proteina p53 are o funcție centrală în patogeniza tumorală.(7,8) Mulțumită cercetărilor intense asupra structurii și funcțiilor genei și proteinelor codificate, proteina p53 este o componentă importantă a rețelei reglatorii în care controlul ciclului celular, integritatea ADN și moartea celulară programată joacă un rol central.

Mutațiile de la nivelul genei p53 sunt printre cele mai cunoscute leziuni genetice descrise în cancer. P53 funcționează în complex homotetrameric ca și factor de transcripție care induce expresia genică și poate facilita oprirea ciclului celular, repararea ADN și apoptoza.

Mărirea concentrației intracelulare de p53 poate fi evidențiată prin imunohistochimie. Numeroase studii de imunohistochimie evidențiază că mai mult de 50% din adenocarcinoamele esofagiene au o pronunțată supraexpresie de p53.(9,10)

Supraexpresia p53 detectată în cazurile analizate prin imunofluorescență este corelată cu prognosticul, gradul de diferențiere, gradul de proliferare și se susține prin numărul de celule imunomarcate și prin intensitatea marcajului.

A fost izolat ADN genomic de la pacienți cu cancer de esofag. ADN total a fost extras cu ajutorul kitului *Wizard Genomic DNA Purification Kit* de la Promega.

Prođușii PCR purificați au fost secvențiați cu ajutorul analizorului genetic ABI 3130 (Applied Biosystems). Secvențele obținute atât din probe de țesut tumoral și sânge au fost comparate cu secvența din p53 din baza de date GenBank. Numeroase polimorfisme nucleotidice au fost identificate. Din zece pacienți analizați, patru (40%) au prezentat polimorfisme în gena p53.

În exonul 5 a fost observat un polimorfism în pacientul 7. Acest polimorfism corespunde unei mutații missense punctiforme heterozigote localizată în codonul 175 (CGC" CAC). Codonul normal codifică pentru arginină, codonul modificat codifică pentru histidină.

În exonul 6 au fost identificate două mutații punctiforme heterozigote: i) una silențioasă în codonul 213 CGA" CGG; această mutație a fost găsită atât în proba tumorală cât și în sângele pacientului 6, și aminoacidul codificat de ambii codoni este arginina; ii) o mutație missense în codonul 220 TAT" TGT, în proba de țesut tumoral de la pacientul 11, codonul TAT codifică pentru tirozină, iar codonul TGT pentru cisteină. Cisteina și tirozina sunt aminoacizi neutri, dar cisteina este un aminoacid slab polarizat, în timp ce tirozina nu este. Această ultimă modificare identificată în exonul 6 poate influența polaritatea proteinei.

Prin corelarea datelor genetice cu datele clinice ale pacienților se observă că modificările din gena p53 apar în stadii timpurii (I-II) ale cancerului de esofag de tip scuamos. Stadiile mai avansate de cancer pot fi asociate cu modificări de polaritate ale proteinei, care pot conduce schimbări de conformație proteică și alterarea capacității acesteia de răspuns la nivelul tumorii.

Analiza eventualelor duplicații sau deleții apărute la pacienții diagnosticați cu cancer de esofag prin tehnica MLPA

În secvența cromozomială apar frecvent modificări ale numărului de copii, ceea ce determină predispunerea organismului uman la variate sindroame și boli. Deleția sau

duplicația a unuia sau a mai multor exoni la nivelul unor gene de referință, cum este și gena BRCA2, predispun inclusiv la boli de natură neoplazică.(11)

Tehnica MLPA pentru investigarea unor posibile corelații între gena de interes selecționată anterior, BRCA2 și prezența cancerului de esofag.

Genă BRCA2 aparține clasei de gene cunoscute drept supresoare tumorale. Proteina genei BRCA2 ajută la prevenirea creșterii celulare și a diviziunii accelerate sau necontrolate. BRCA2 este implicată și în procesele de reparare a ADN, având un rol important în menținerea stabilității informației genetice a celulei.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) este o metodă dezvoltată pentru a determina numărul de copii pentru până la 50 secvențe de ADN genomic într-o singură reacție bazată pe PCR de tip multiplex. MLPA e o metodă de analiză de tip multiplex a numărului de copii de ADN folosit pentru a identifica mutațiile de dimensiuni mari în investigațiile clinice și cercetare.(12)

Există un număr de gene care s-au dovedit a fi implicate în dezvoltarea, progresia și răspunsul la terapie al cancerului de esofag. Unicitatea fenotipică și în consecință heterogenitatea comportamentului clinic al tumorilor unor pacienți diferiți pot fi urmărite prin determinarea variației numărului de copii la nivelul acestor gene.(13) Printre acestea, BRCA2 este una dintre cele mai importante supresoare tumorale.

Genă BRCA2 (Breast Cancer 2 susceptibility protein) (13q12-13) aparține familiei de gene supresoare tumorale (14), [15] și codifică o fosfoproteină nucleară care e alcătuită din 3,418 aminoacizi.(16,17,18)

Principiul metodei

ADN a fost extras din probele de țesut tumoral și din leucocite (pentru martor) cu Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). Spre deosebire de izolarea prin metoda clasică cu cloroform/alcool izoamilic, acest kit conține toate soluțiile necesare purificării rapide și ușoare a ADN (genomic, mitocondrial, viral) dintr-o gamă largă de țesuturi, culturi de celule, sânge, drojzii și bacterii, având la bază un proces de extracție salină în patru etape.

Rezultatele obținute în urma analizei delețiilor prin tehnica MLPA

Au fost investigați 5 pacienți prin tehnica MLPA, pentru evidențierea unor posibile corelații între mutațiile cromozomiale existente la nivelul genei BRCA2 (deleții sau amplificări) și cancerul de esofag.

Analiza rezultatelor MLPA pornește de la profilul genetic neprelucrat rezultat în urma migrării și separării produșilor de amplificare pe analizorul genetic ABI Prism 310. Prin prelucrarea acestuia cu ajutorul programului „GeneMapper ID v3.1” se va obține în final amprenta genetică a indivizilor.

Toți cei 5 pacienți au prezentat cel puțin o modificare de tip deleție sau amplificare la nivelul genei BRCA2. Se remarcă o posibilă corelație între existența unor deleții la nivelul exonilor 4 și 5 și cancerul de esofag, această modificare apărând la toți cei 5 pacienți studiați. Alte deleții posibil corelate cu dezvoltarea cancerului de esofag au fost evidențiate la nivelul exonilor 23, 24 și 27A în cazul a 3 din cei 5 pacienți investigați. Amplificări care ar putea fi corelate cu prezența cancerului de esofag se întâlnesc la nivelul exonilor 8 și 10 la 3 din cei 5 pacienți analizați.

Concluzii:

Pe baza datelor din literatura de specialitate au fost selectați următorii markeri moleculari pentru analizele de imunofluorescență.

• EGFR și HER2/neu ca oncogene;

Ü p53 și APC ca gene supresor tumorale;

În cazurile de cancer de esofag de tip scuamos studiate este evidențiată o supraexpresie a EGFR și HER2, comparativ cu probele de țesut normal.

Ü Pacienți la care s-a detectat supraexpresie a acestor tipuri de oncogene pot fi potențiali candidați pentru tratament cancerigen cu ținte moleculare (ex. medicamente anti-EGFR).

Metodele de evaluare a imunofluorescenței, a expresiei genice, pot fi utile în stabilirea și/sau confirmarea diagnosticului tumorilor prezente la nivelul tractului gastrointestinal și în același timp pot fi folosite și pentru selectarea și orientarea strategiilor terapeutice adecvate.

Mutațiile din gena p53 (polimorfisme, deleții) sunt printre cele mai comune modificări genetice descoperite în cancerul uman. La pacienții analizați au fost identificate mutații punctiforme în exonul 5, codonul 175, în exonul 6 codonii 213 și 220 și în intronul 7 în pozițiile +18437, T/C și +18457, T/G.

S-a aplicat tehnica MLPA pentru investigarea unor posibile corelații între gena de interes selecționată anterior, BRCA2 și prezența cancerului de esofag. În urma investigațiilor au fost descoperite anumite regiuni aparținând acestor gene care ar putea fi corelate cu cancerul de esofag.

Este vorba despre existența unor deleții la nivelul exonilor 4 și 5 aparținând genei BRCA2 întâlnite la toți cei 5 pacienți investigați pentru această genă, a unor deleții la nivelul exonilor 23, 24 și 27A, întâlnite la 3 din cei 5 pacienți investigați și a unor amplificări la nivelul exonilor 8 și 10 la 3 pacienți.

REFERINȚE

1. Boultonwood J, Fidler C. Molecular analysis of cancer Humana Press Inc.999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, New Jersey 07512; 2002. p. 1-7.
2. Yoshito Kaziro, Hiroshi Itoh, Tooru Kozasa, Masato Nakafukll and Takaya Satoh, Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins Annu. Rev. Biochem 1991;60:349-400.
3. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer, Journal of Clinical Oncology 1998;16:1207-1217.
4. Qichun W. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases, Int J Oncol 2007;31:493-9.
5. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;59(2 Suppl):21-6.
6. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Ramachandran M, Greene MI. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies, J Clin Invest. 2007;117(8):2051-2058.
7. Duan W, Ding H, Subler MA, Zhu WG, Zhang H, Stoner GD, Windle JJ, Otterson GA, Villalona-Calero MA. Lung-specific expression of human mutant p53-273H is associated with a high frequency of lung adenocarcinoma in transgenic mice. Oncogene 2002;21:7831-7838.
8. Duan W, Gao L, Jin D, Otterson GA, Villalona-Calero MA. Lung specific expression of a human mutant p53 affects cell proliferation in transgenic mice. Transgenic Research 2008;17:355-366.
9. Lozano G. The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models. Current opinion in genetics & development 2007;17:66-70.
10. Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophagus. J Pathol 1995;175(2):175-80.
11. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, Tubbs RR, Kirby TJ, Casey G. p53 immunoreactivity in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma. J Thorac Cardiovasc Surg 1994;108:1132-1137.
12. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 30:e57; 2002.
13. Marcinkowska M, Wong KK, Kwiatkowski DJ, Kozlowski P. Design and generation of MLPA probe sets for combined copy number and small-mutation analysis of human genes: EGFR as an example. Scientific World Journal 2010;10:2003-18.
14. Moelans CB, de Weger RA, Monsuur HN, Vijzelaar R, van Diest PJ. Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. ModPathol 2010;23(7):1029-39.
15. Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG. "BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease". Molecular pathology: MP 1998;1(5):237-47.
16. Yoshida and Miki. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage". Cancer science 2004;95(11):866-71.
17. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994;66:66-71.
18. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion SL, Quirk Y, Ford D, Collins et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 1994;265:2088-2090.
19. Chen Y, Farmer AA, Chen C-F, Jones DC, Chen P-L, Lee W-H. BRCA1 is a 200 kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. Cancer Res 1996;56:3168-3172.