



Igor M. Tomo

NOVÉ TRENDY V BIOMEDICÍNE

**Bratislava
2014**

Nové trendy v biomedicíne

Editor: prof. RNDr. Igor M. Tomo, CSc, MPH

Vydala: Slovenská biologická spoločnosť SAV Bratislava, 2014

Recenzenti: prof. RNDr. Milan Melník, DrSc.
Prof. MUDr. Ladislav Badalík, DrSc.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

ISBN 978 - 90 - 928 - 02 - 42

Imunohistochemická verifikácia epigenetickej regulácie génov asociovaných s karcinómom prsníka

Ivana Fridrichová¹, Ľudovít Danihel², Vanda Repiská³

¹Laboratórium genetiky nádorových ochorení, Ústav experimentálnej onkológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava², Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, ³Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Úvod

Nádorové ochorenia predstavujú veľkú skupinu chorôb s rôznou lokalizáciou nádorov a variabilnými klinickými prejavmi. Nádorového tkanivo v porovnaní normálnym vykazuje početné molekulové zmeny, ktoré umožňujú predovšetkým nekontrolované bunkové delenie, ako aj ďalšie prejavy nádorového procesu. *Genetické zmeny* v sekvenciách DNA (mutácie a polymorfizmy) zapríčínajú expresiu zmenených alebo skrátených génov, alebo sa expresia vôbec nerealizuje, čo vedie v konečnom dôsledku k produkcii nefunkčných proteínov, alebo k ich chýbaniu. *Epigenetické alterácie* zahŕňujú zmeny metylácie DNA v CpG regiónoch a tiež modifikácie v komplexe histónov, ktoré sú príčinou anomálnej expresie génov. To znamená, že bunka obsahuje v aktuálnom stave zmenené hladiny génových produktov a výsledkom je významné narušenie regulovaného bunkového metabolizmu. V nádorovej bunke je fatálne najmä utlmenie expresie tumor supresorových génov, ktorých úlohou je zabrániť vzniku nádorov a tiež aktivácia onkogénov, ktoré potom prispievajú k nádorovému procesu. Poznatky o epigenetických zmenách v nádoroch boli zosumarizované viacerými autormi (Jones a Baylin, 2002; Fraga a Esteller, 2005).

Zameranie štúdie

V súbore pacientok s karcinómom prsníka sme sa zamerali na 11 génov, ktoré majú CpG ostrovčeky v promótoroch, preto sú s vysokou pravdepodobnosťou epigeneticky regulované. Inaktivácia týchto génov vedie k nezávislosti rastových signálov (*ESR1*, *PGR*, *RASSF1A*, *SOCS1*, *SYK* a *APC*) alebo k invazivite buniek a vzniku metastáz (*CDH1*, *TIMP3*, *ADAM23*, *CXCL12* a *BRMS1*). V karcinómoch prsníka boli pozorované rôzne hladiny metylácie uvedených génov, čo predpokladá rôzne stupne zníženej produkcie proteínových produktov. Estrogénový receptor α (*ER α*) je hormonálne aktivovaný jadrový proteín s funkciou transkripčného faktora, ktorý kontroluje expresiu iných receptorov rastových faktorov, napríklad progesterónového receptora (*PGR*) v normálnom epiteli prsníka, preto epigenetická deregulácia môže prispieť k vzniku nádoru (Lapidus a spol., 1996). Izoforma A z rodiny 1 proteínov s RAS asociovanou doménou, ktorá je kódovaná *RASSF1A* tumor supresorovým génom, patrí do skupiny RAS efektorov regulujúcich bunkovú proliferáciu a apoptózu. Zníženie alebo strata expresie *RASSF1A* proteínu lokalizovaného v cytoplazme aj membráne môže zapríčiniť zlyhanie regulácie rastu nezávislého od uchytenia buniek, inhibície tvorby nádorov alebo apoptózy v rozličných neopláziách (Damman a spol. 2001). Supresor cytokínovej signalizácie, *SOCS1* proteín, bol identifikovaný ako negatívny regulátor signalizácie prolaktínu v mliečnych žľazách myši (Lindeman a spol. 2001). Epigenetická inaktivácia *SOCS1* génu v nádoroch prsníka môže zvýšiť proliferáciu epitelu a prežitie buniek ako odpoveď na cytokíny a rastové faktory. Naopak, zvýšená expresia *SOCS1* a *SOCS2* proteínu v cytoplazme vedie k redukcii transformačného a metastatického potenciálu (Rottapel a spol. 2002). Slezinná tyrozín kináza *Syk* je intracelulárny receptor, ktorý je zahrnutý v bunkovej proliferácii, diferenciácii a fagocytóze. Štúdie tohto proteínu naznačili jeho supresívnu funkciu v tumorigenéze a tvorbe metastáz, preto epigenetické vyradenie relevantného génu môžu prispieť k agresívnejšiemu prejavu nádorového ochorenia (Coopman a Mueller, 2006). *APC* gén kóduje membránový a cytoplazmatický tumor supresorový proteín, ktorý účinkuje ako antagonist Wnt signálnej dráhy, v procesoch bunkovej migrácie a adhézie, aktivácii transkripcie a apoptóze. Strata *APC* proteínu a s tým súvisiaca zvýšená hladina β katenínu, transkripčného aktivátora, ktorá vedie s strate kontroly bunkového rastu, bola pozorovaná aj v nádoroch prsníka (Van der Auwera a spol., 2008). Početné zmeny v kadherín - katenín adhézných komplexoch sa podieľajú na iniciácii, progresii a metastázovaní nádorov. Membránový proteín pre

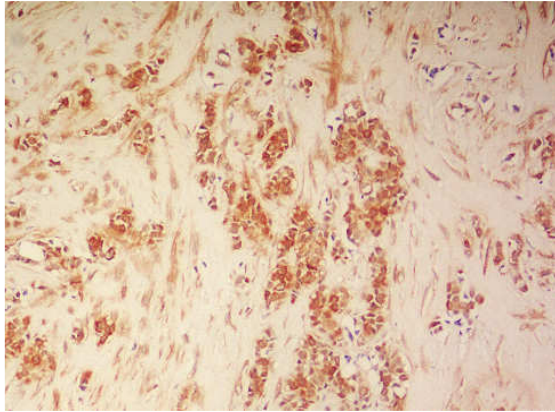
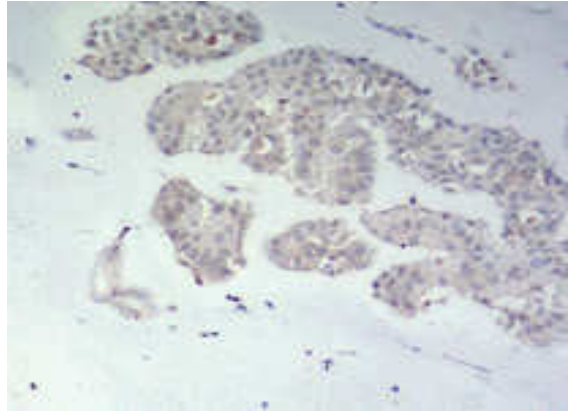
bunkovú adhéziu E-kadherín (produkt *CDH1* génu) zabraňuje invázii buniek a metastázovaniu. V neinvazívnych aj invazívnych štádiách nádorov prsníka bola pozorovaná variabilná strata expresie E-kadherínu, ktorá korešpondovala s heterogenitou metylačného profilu *CDH1* génu (Graff a spol., 2000). Tkanivové inhibítory metaloproteáz (TIMP) chránia extracelulárnu matrix pred degradáciou týmito proteázami. TIMP3 je väzobný proteín pre matrix, ktorý reguluje jej štruktúru, čím ovplyvňuje rast nádoru, angiogenézu, invazivitu a metastázovanie. Metylácia promotóru *TIMP3* génu a následná znížená expresia cytoplazmatického proteínu pri invazívnych duktálnych karcinómoch asocjuje s vysokým gradingom a metastázovaním v lymfatických uzlinách (Lui a spol., 2005). ADAM rodina združuje povrchové proteíny ukotvené v bunkovej membráne a zahŕňa metaloproteázy, disintegrín, oblasti bohaté na cysteín, proteín podobný epidermálnemu rastovému faktoru, transmembranovú a cytoplazmatickú doménu. ADAM23 má typickú štruktúru tejto rodiny, avšak nemá aktívnu metaloproteázovú doménu, čo predpokladá jeho významnú úlohu v bunkovej adhézii. Hypermetylácia *ADAM23* génu, znížená expresia mRNA a relevantného proteínu korelovala s pokročilejšími štádiami ochorenia (Costa et al., 2004). Chemokín CXCL12 interaguje s receptorom CXCR4 je, čím zabezpečuje adhéziu, proliferáciu a fyziologickú migráciu buniek. V nádorovom tkanive je sekretovaný bunkami strómy. Bolo dokázané, že CXCL12 moduluje metastatický potenciál v karcinómoch prsníka a metylácia relevantného génu korelovala s histologicky pokročilým ochorením, prítomnosťou metastáz a úmrtím (Ramos a spol., 2010). Nukleárny BRMS1 proteín bol pôvodne identifikovaný ako inhibítor metastázovania pri vysoko metastázujúcich bunkových líniiach odvodených z nádoru prsníka, ktoré boli injikované do nahých myší. Epigenetická inaktivácia *BRMS1* génu bola pozorovaná v primárnych nádoroch prsníka a metastázach z lymfatických uzlín (Metge a spol., 2008).

Imunohistochemická metóda

Vzorky z nádorového tkaniva z prsnej žľazy boli fixované vo formaldehide a následne konvenčne spracované a zaliate do parafínu. Následne boli z bločkov vypichnuté 3mm v priemere veľké vzorky pomocou prierazníka Harris Uni-Core (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), ktoré boli následne zoradené do jedného parafínového bloku. Z bloku boli narezané 4mm hrubé rezy, ktoré boli montované na podložné sklíčka. Po odparafíňovaní preparátov boli preparáty opláchnuté vo fosfátovom pufrí (pH 7.2). Ako primárne protilátky boli použité protilátky ADAM 23 (Abcam, Cambridge, UK), BRMS1 (Abcam, Cambridge, UK), SOCS1 (Abcam, Cambridge, UK), Syk (Abcam, Cambridge, UK), TIMP 3 (Abcam, Cambridge, UK), APC (Abcam, Cambridge, UK), RAS1 (Abcam, Cambridge, UK), Cdh 1 Ab-1 (Thermo Scientific, Fremont, USA), CXCL 12 (Life Span BioSciences). Taktiež boli použité protilátky proti estrogénovému a progesterónovému receptoru (Dako, Glostrup, Denmark). Preparáty boli inkubované s primárnymi protilátkami podľa návodu výrobcu. Na vizualizáciu sme použili En Vision systém s chrenovou peroxidázou, ako chromogén roztok diaminobenzidínu. Preparáty boli dofarbené hematoxylín-eozínom. Preparáty boli prikryté krycím sklíčkom za pomoci Solakrylu. Všetky preparáty boli vyšetrené vo svetelnom mikroskope Nikon, Eclipse E 400, Japan.

Predbežné výsledky

V rôznych typoch nádorov boli nájdené variabilné metylačné profily v promotórových oblastiach nádorovo asociovaných génov. Výsledky početných epigenetických štúdií v nádorových tkanivách ukázali, že hypermetylácia DNA v tumor supresorových génoch je nádorovo špecifická a mohla by slúžiť na rozpoznávanie nádorových buniek (Duffy a kol., 2009). Zatiaľ však nie je možné posúdiť, aká hladina DNA metylácie a metylácia ktorého regiónu promotórovej sekvencie v nádorovo špecifických génoch je kauzálna pre patologicky významné zníženie expresie génu a následnej produkcie proteínu. Z tohto pohľadu prinesú podrobnejšie štúdie hladiny metylácie DNA a lokalizácie metylovaných cytozínov vo vzťahu k imunohistochemicky stanovenou expresiou relevantných proteínov nové poznatky o biológii nádorov, čo môže pomôcť vývoju nových diagnostických postupov a cielenejšej liečbe. V našom laboratóriu v súčasnosti analyzujeme 11 proteínov a doterajšie výsledky poukazujú na variabilitu expresie skúmaných proteínov v nádorovom tkanive u pacientok s karcinómom prsníka. Proteínové expresie budeme korelovať s metylačnými profilmi v nádorovom tkanive a klinickými údajmi. Na obrázku 1. sú uvedené príklady imunohistochemickej analýzy duktálneho karcinómu prsníka.

A.**B.**

Obr.1

A. Duktálny karcinóm prsníka, výrazná pozitívna reakcie s protilátkami proti TIMP3, zväčšenie 350x

B. Duktálny karcinóm prsníka, negatívna reakcie s protilátkami proti ADAM 23, zväčšenie 400x

Pod'akovanie

Táto štúdia je podporovaná projektom č. APVV-0076-10 financovanom Agentúrou na podporu výskumu a vývoja a projektom č. 2/0120/13 financovanom Agentúrou VEGA.

Použitá literatúra

1. Coopman PJ, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett.* 2006;241:159-173
2. Costa FF, Verbisck NV, Salim AC et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene.* 2004, 23:1481-1488.
3. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.* 2001;61:3105-3109.
4. Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW et al. Methylated genes as new cancer biomarkers. *Eur J Cancer.* 2009, 45:335-346.
5. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modification. *Cell Cycle.* 2005;4:144-148.
6. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H et al. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem.* 2000;275:2727-2732.
7. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet.* 2002;3:415-428.
8. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res.* 1996;2:805-810.
9. Lindeman GJ, Wittlin S, Lada H et al. SOCS1 deficiency results in accelerated mammary gland development and rescues lactation in prolactin receptor-deficient mice. *Genes Dev.* 2001;15:1631-1636.
10. Lui EL, Loo WT, Zhu L, Cheung MN, Chow LW. DNA hypermethylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2005;59 Suppl 2: 363-365.
11. Metge BJ, Frost AR, King JA et al. Epigenetic silencing contributes to the loss of BRMS1 expression in breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2008, 25:753-763.
12. Ramos EAS, Camargo AA, Braun K et al. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer* 2010, 10:23.
13. Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C et al. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene.* 2002;21:4351-4362.
14. Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Bosch SM et al., Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype. *Br J Cancer.* 2008, 99:1735-1742.