

Алтерације онкогена *c-myc* и *c-erbB-2* у малигним туморима јајника

Тибор Пастор¹, Бранка Поповић¹, Ана Гвозденовић¹, Александар Боро¹, Бојана Петровић², Ивана Новаковић³, Драгана Пузовић¹, Љиљана Луковић³, Јелена Милашин¹

¹Институт за судску медицину, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

²Институт за гинекологију и акушерство, Клинички центар Србије, Београд, Србија;

³Институт за хуману генетику, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Клиничке и епидемиолошке студије су показале да је канцер јајника пети по реду узрочник смрти жена. Иако постоје многи предиспонирајући фактори, као што су старосна доб, породична историја канцера, стерилност, број рођене деце и др., тачни узроци настанка тумора јајника још нису познати. Зна се, међутим, да је канцер јајника резултат акумулације различитих генских алтерација, од којих су најзначајније мутације, односно повишена експресија одређених онкогена, као што су *c-myc*, *c-erbB-2* и *K-ras*, и тумор-супресорских gena, од којих је најважнији *p53*.

Циљ рада Циљ истраживања је био да се испитају алтерације *c-myc* и *c-erbB-2* (пре свега њихове амплификације), најчешћег механизма активације ових онкогена, у епителним карциномима јајника, и утврде њихове потенцијалне улоге у патогенези овог типа неоплазми у нашој популацији.

Методе рада ДНК је изолована из 15 узорака малигнух тумора и пет узорака бенигнух тумора јајника. Амплификације онкогена *c-myc* и *c-erbB-2* установљаване су методом диференцијалне реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. *differential polymerase chain reaction – dPCR*). Ниво амплификације одређен је након дензитометријског мерења трака на гелу применом програма *Scion image*.

Резултати Амплификација и gena *c-myc* и *c-erbB-2* откривена је у четири узорка (26,7%) епителног карцинома јајника. Један од испитиваних узорака је имао симултану амплификацију оба gena. Већина узорака била је високог стадијума према критеријумима Међународне федерације за гинекологију и акушерство (*International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO*). Занимљиво је да је поред амплификације независно установљена и делеција gena *c-erbB-2* у 26,7% карцинома. Сви карциноми са делецијама су такође припадали високим клиничким стадијумима.

Закључак Амплификовани онкогени *c-myc* и *c-erbB-2* су одлика касних стадијума епителних малигнитета и вероватно један од разлога њиховог агресивног биолошког понашања. Слично томе, и делеција gena *erb* обележава узнапредовале стадијуме болести и указује на геномску нестабилност која се јавља у епителним карциномима као резултат еволуције и селекције различитих туморских клонова.

Кључне речи: онкоген *c-myc*; онкоген *c-erbB-2*; амплификација; делеција; *dPCR*, епителни карцином јајника

УВОД

У развијеном свету канцер јајника је пети по реду узрок смрти жена од малигнитета, а водећи узрок смрти ако се имају у виду гинеколошки малигнитети, међу којима је трећи по учесталости дијагностиковања [1]. У факторе ризика за настанак канцера јајника се, пре свега, убраја старосна доб. Ризик се повећава са старашћу, тако да се у највећем броју случајева ова болест јавља код жена које су прошле кроз природну менопаузу, при чему се 50% свих случајева јавља код жена старијих од 65 година [2]. Породична историја канцера јајника је такође фактор ризика. Ако је неко од блиских сродника боловао од канцера јајника, то значајно повећава ризик, поготово ако је у питању први степен сродства (мајка, сестра, ћерка) [3].

Најчешћи малигни тумори јајника су епителни тумори (90% свих малигнитета јајника), који обухватају неколико подтипова, од којих су главни серозни, ендометриоидни, муцинозни и светлоћелијски. Уопштено посматрајући, ови карциноми имају лошу прогнозу због релативно касног постављања дијагнозе. Упркос помацама у дијагностичким и терапијским методама и протоколима, петогодишње преживљавање болесница се није значајно побољшало. Велике наде се по-

лажу у молекуларну медицину и откривање нових биолошких показатеља помоћу којих би се прецизније могло предвидети понашање ове релативно хетерогене групе тумора.

Многе молекуларногенетичке студије покушавају да доведу у везу развој различитих типова неоплазми јајника са специфичним генским алтерацијама [4]. У палети gena укључених у патогенезу тумора јајника налазе се и гени *c-erbB-2* и *c-myc* [5]. Протеински производ gena *c-erbB-2* је трансмембрански протеин који је укључен у генезу пролиферативног сигнала од плазмамембране до једра. До онкогене активације gena *c-erbB-2* најчешће долази услед повећања броја његових копија, тј. генске амплификације, која за последицу има активацију трансмембранског онкопротеина, односно иницирање пролиферативног сигнала у одсуству фактора раста.

Активација онкогена *c-erbB-2* доводи до имортализације и трансформације ћелија у условима *in vitro* и откривена је у многим случајевима спонтано насталих тумора код људи, као што су карцином млечне жлезде, аденокарцином плувачних жлезда и карцином дојке и јајника [6-8]. Сматра се да је активација онкогена *c-erbB-2* касни догађај у процесу канцерогенезе јајника и доводи се у везу с лошом прогнозом болести [9].

Експресија гена *c-тус* је такође промењена у великом броју различитих малигнитета код људи. Протеински производ овог гена је нуклеусни протеин који везује ДНК. Он врши функцију експресионог модулятора, и то углавном гена који стимулишу или инхибирају напредовање ћелије кроз ћелијски циклус [10]. У основне функције овог протеина које произлазе из његове транскрипционе регулаторне активности убрајају се: стимулација пролиферације, инхибиција диференцијације и повећање осетљивости на проапоптотске стимулусе [11]. Експресија гена *c-тус* у нормалним ћелијама је строго регулисана спољњим сигнаlima (фактори раста и контакти с ванћелијским матриксом), као и унутрашњим часовником, односно ћелијским циклусом. Ћелије у миновању експримирају врло мало *c-тус*, експресија је практично немерљива, док ћелије које су стимулисане факторима раста драстично повећавају његово испољавање.

Података о амплификацији гена *c-erbB-2* и *c-тус* у туморима јајника има много, али су већином контроверзни. Наведене учесталости амплификације ових гена су у широком распону (7-25% за *c-erbB-2* и 30-70% за *c-тус*), а не постоји ни консензус у погледу корелације, те амплификације с појединим подтипovima карцинома [12-15].

ЦИЉ РАДА

Циљ студије је био да се испитају алтерације онкогена *c-erbB-2* и *c-тус* у туморима јајника, а пре свега њихове амплификације, применом методе диференцијалне реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. *differential polymerase chain reaction – dPCR*). Такође, желело се утврдити да ли постоји корелација између амплификације ових гена и стадијума болести, односно

која би била њихова потенцијална улога у патогенези ове неоплазме.

МЕТОДЕ РАДА

У истраживању су коришћени узорци ткива тумора јајника који су добијени после операција у Институту за гинекологију и акушерство Клиничког центра Србије у Београду. Укупно је анализирано 15 узорака малигних карцинома и пет узорака бенигних тумора (цистаденома). Подаци о старости болесница с карциномом, хистопатолошком налазу, градусу и клиничком стадијуму тумора према класификацији Међународне федерације за гинекологију и акушерство (*International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO*) приказани су у табели 1. Испитанице су у просеку биле старе 56 година.

У молекуларногенетичкој анализи коришћена је геномска ДНК изолована из замрзнутих узорака ткива тумора јајника. За изолацију ДНК примењена је метода екстракције фенол-хлороформом [16]. Да би се утврдила заступљеност амплификованог гена *c-erbB-2*, односно *c-тус*, коришћена је метода *dPCR*, која представља симултану амплификацију фрагмената два различита гена – испитиваног (*c-erbB-2*, односно *c-тус*) и контролног (допамин-рецептор гена – *D2R*) – који постоји у једнострукој дози у геному [17].

У модификованој реакцији дуплекс *PCR* коришћена су два сета прајмера (за гене *c-erbB-2* и *D2R*, односно за *c-тус* и *D2R*) исте концентрације (0,4 μM), *dNTP* (0,2 mM), 1 mM MgCl_2 , 2,5 μl *PCR* пуфера, 1 *U Taq* полимеразе (*Fermantas, Litvania*) и 300 ng туморске ДНК. Услови *PCR* били су следећи: иницијална денатурација на 94°C три минута, затим током 30 циклуса денатурација на 95°C један минут, хибридизација прајме-

Табела 1. Старост болесница, хистопатолошки типови, градуси и *FIGO* стадијуми тумора јајника и односи *c-тус/D2R* и *c-erbB-2/D2R* производа *PCR*

Table 1. Patients' age, histopathological types, grades, clinical stages (*FIGO*) of ovarian tumors and ratio of *c-тус* and *c-erbB-2* versus *D2R* *PCR* products

Број Number	Старост (године) Age (years)	Хистолошки тип Histological type	Градус Grade	Стадијум <i>FIGO</i> FIGO stadium	Однос <i>c-тус/D2R</i> Ratio <i>c-тус/D2R</i>	Однос <i>c-erb/D2R</i> Ratio <i>c-erb/D2R</i>
1.	80	<i>Adenocarcinoma mucinosum ovarii metastaticum</i>			1.96*	1.00
2.	72	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G2	IIIc	1.98*	0.24 del
3.	69	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G2	IIIc	1.04	0.74 del
4.	29	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii metastaticum</i>			1.01	0.98
5.	79	<i>Adenocarcinoma metastaticum</i>			0.98	1.08
6.	54	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G3	IIIc	0.95	2.33*
7.	36	<i>Adenocarcinoma metastaticum</i>			1.50*	1.07
8.	70	<i>Adenocarcinoma solidum ovarii</i>	G3	IIIc	0.76	0.96
9.	59	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G2	IIIb	0.95	1.78*
10.	58	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G2	IIIc	0.89	0.40 del
11.	74	<i>Adenocarcinoma endometrioides ovarii</i>	G2	Ic	1.45*	1.57*
12.	75	<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	G2	IIIc	0.96	0.60 del
13.	54	<i>Adenocarcinoma metastaticum</i>	G2		1	1.08
14.	68	<i>Adenocarcinoma mucinosum ovarii</i>	G1	IIIc	1.01	1.00
15.	51	<i>Adenocarcinoma metastaticum</i>			1.01	2.20*

* амплификација; del – делеција / * amplified; del – deleted

ра на 55°C/50°C један минут (за гене *c-erbB-2/c-myc*), екстензија ланаца на 72°C један минут и финална екстензија на 72°C седам минута. Секвенце коришћених прајмера биле су:

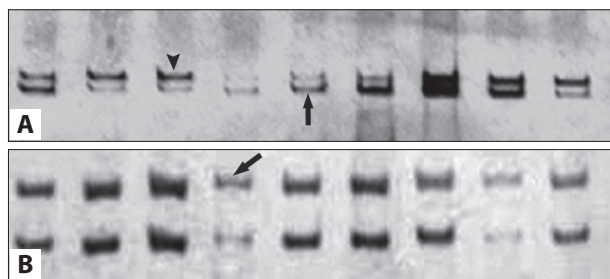
- *c-erbB-2* 5' CCT CTG ACG TCC ATC ATC TC 3'
5' ATC TTC TGC TGC CGT CGC TT 3'
- *c-myc* 5' GCT CCA AGA CGT TGT GTG TTC G 3'
5' GGA AGG ACT ATC CTG CTG CCA A 3'
- *D2R* 5' CCA CTG AAT CTG TCC TGG TAT G 3'
5' GTG TGG CAT AGT AGT TGT AGT GG 3'

Ови прајмери генеришу производе дужине 98 базних парова (бп) за ген *c-erbB-2* и 112 бп за *D2R*, односно 150 бп за ген *c-myc* и 112 бп за *D2R*. После *PCR* је урађена електрофореза на дванаестопроцентном полиакриламидном гелу, у *1xTBE* пуферу, при константном напону струје од 200 V. *PCR* амплификати гена *c-erbB-2* и *D2R* су визуелизовани путем бојења гела у $AgNO_3$.

Да би се проценио степен амплификације гена *c-erbB-2*, односно *c-myc*, обављено је дензитометријско мерење помоћу програма *Scion image*. Применом овог програма поређен је интензитет *PCR* амплификата испитаног (*c-erbB-2/c-myc*) и контролног гена (*D2R*), при чему *D2R* трака представља интерну контролу за сваки појединачни узорак у једној електрофоретској стази. Узимајући у обзир визуелни утисак и конкретне нумеричке вредности, сви анализирани карциноми код којих је процентуални однос броја пиксела *c-erbB-2/c-myc* траке био већи или мањи од 25% у односу на *D2R* траку категорисани су као карциноми с амплификацијом, односно делецијом.

РЕЗУЛТАТИ

Поређењем интензитета трака, амплификација онкогена *c-myc* установљена је у четири узорка карцинома јајника (26,7%), од чега два метастатска, од укупно 15 анализираних узорака. Амплификација гена *c-erbB-2* је такође утврђена у четири узорка од 15, од чега је само један био метастатски. Амплификација је била у распону од 50% до 250%. У једном узорку *adenocarcinoma endometriodes* нађене су симултано амплификације и *myc* и *erb* гена (Табела 1, Сlike 1a и 1b). Занимљиво



Слика 1. Репрезентативни гелови бојени $AgNO_3$ с резултатима *dPCR* (a) *c-erbB-2/D2R* гена; (b) *dPCR c-myc/D2R* гена (пример амплификације означен је стрелицом, а делеције врхом стрелице).
Figure 1. Representative $AgNO_3$ stained gels with the differential *PCR* results of (a) *dPCR c-erbB-2/D2R*; (b) *dPCR c-myc/D2R* (examples of amplification marked with a black arrow, of deletion with an arrowhead).

је и то што је поред амплификације утврђена и делеција гена *c-erbB-2* (интензитет траке испитиваног гена мањи од интензитета траке контролног гена); *erb* је био делетиран у четири узорка (26,7%). Добијени резултати потврђени су у два независна поступка *PCR*.

Ниједан од пет анализираних бенигнух тумора није показивао промене у неком од испитиваних гена.

ДИСКУСИЈА

Познат је низ различитих промена на нивоу наследног материјала које могу да доведу до развоја тумора јајника. Неки од гена за које се данас са сигурношћу може тврдити да доприносе развоју ове неоплазме су: *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *Rb*, *c-myc*, *c-erb*, *K-ras*, као и многи други. У овом истраживању анализирана су два значајна онкогена, *c-myc* и *c-erbB-2*, односно испитана је њихова амплификација у различитим фазама канцерогенезе јајника.

Ген *c-myc*, лоциран на хромозому 8 (*8q24*), испољава се прекомерном експресијом у широком спектру канцера код људи: у 80% рака дојке, 70% канцера дебелог црева, 90% гинеколошких канцера и 50% хепатоцелуларних карцинома [18]. Откада је први пут установљен значај амплификације *c-myc* у канцерогенези код људи, научници широм света покушавају да нађу одговор на питање важности амплификације овог протоонкогена у развоју тумора јајника. Без обзира на варирања у учесталости амплификације гена *c-myc*, која је од 29,4% у истраживању Бејкера (*Baker*) и сарадника [14] до 65,9% у раду Чена (*Chen*) и сарадника [15], амплификација онкогена *c-myc* је општа појава код карцинома јајника. И резултати нашег истраживања потврђују да је амплификација *c-myc* релативно чест догађај код карцинома јајника, будући да је откривена у више од четвртине узорака. Већа учесталост амплификације код карцинома високог стадијума, односно метастатских карцинома, наводи на закључак да је активација овог онкогена везана за касније ступење канцерогенезе.

Попут *c-myc*, и ген *c-erbB-2* је амплификован у 26,7% узорака, што је такође у складу с подацима из литературе [12-13]. Узорци су углавном били високог стадијума (једна метастаза), па тако и ова генска алтерација највероватније припада групи касних догађаја у канцерогенези. Једини узорак у којем је забележена амплификација оба гена истовремено био је узорак ендометриоидног карцинома ниског стадијума. Симултано повећање експресије два онкогена вероватно означава лошу прогнозу, што би се морало потврдити пажљивим надгледањем ове болеснице.

Веома је занимљив податак да је поред амплификације утврђена и делеција, односно смањени број копија гена *c-erbB-2*, у 26,7% узорака карцинома. Смањење броја копија гена се може објаснити феноменом кохерентне геномске нестабилности ћелија тумора. Цитогенетске анализе тумора јајника показују постојање различитих, али специфичних, хромозомских аберација које доводе до губитка наследног материјала у

неколико региона, укључујући и регион на којем је лоциран ген *c-erbB-2* [19]. Важно је још нагласити да сви карциноми са делецијом овог гена припадају трећем стадијуму према класификацији *FIGO*.

Збирни подаци говоре да су алтерације ових гена код наших болесница изузетно честе. И амплификација и делеција углавном корелирају с инвазивном природом карцинома. Међутим, упркос постојећој корелацији, тешко је говорити о јединственом механизму патогенезе тумора јајника.

ЗАКЉУЧАК

Амплификација онкогена *c-myc* и *c-erbB-2* понаособ јавља се код једне четвртине епителних карцинома јајника (26,7%). Сем амплификације, у релативно високом проценту забележена је и делеција *c-erbB-2*. Оба типа генских алтерација су највероватније касни догађаји у патогенези, корелирају с високим стадијумом болести и сматрају се неповољним прогностичким параметром.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tortolero-Luna G, Mitchell MF. The epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1995;23:200-7.
2. Yancik R. Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer.* 1993;71(2):517-23.
3. Piver MS, Goldberger JM, Tsukada Y, Mettlin CJ, Jishi MF, Natarajan N. Characteristics of familial ovarian cancer: a report of the first 1000 families in the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1996;17(3):169-76.
4. Launonen V, Mannermaa A, Stenbäck F, Kosma VM, Puistola U, Huusko P, et al. Loss of heterozygosity at chromosomes 3, 6, 8, 11, 16 and 17 in ovarian cancer: correlation to clinicopathological variables. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;122(1):49-54.
5. Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1990;1(3):181-93.
6. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science.* 1985;229(4717):974-6.
7. Semba K, Kamata N, Toyopshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related proto-oncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(19):6497-501.
8. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244(4905):707-12.
9. Afify AM, Werness BA, Mark HFL. HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 1999;66(2):163-9.
10. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999;19(1):1-11.
11. Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-Myc. *Arch Biochem Biophys.* 2003;416(2):129-36.
12. Vogt U, Falkiewicz B, Bielawski K, Bosse U, Schlotter CM. Relationship of c-myc and erbB oncogene family gene aberrations and other selected factors to ex vivo chemosensitivity of ovarian cancer in the modified ATP-sensitivity assay. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(1):157-64.
13. Lassus H, Leminen A, Vayrynen A. ERBB-2 amplification is superior to protein expression status in predicting patient outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;92(1):31-9.
14. Baker VV, Borst MP, Dixon D, Hatch KD, Shingleton HM, Miller D. c-myc amplification in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1990;38(3):340-2.
15. Chen CH, Shen J, Lee WJ, Chow SN. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15(5):878-83.
16. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, et al. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J Forensic Sci.* 1994;39:1254-69.
17. Gramlich TL, Cohen C, Fritsch C, DeRose PB, Gansler T. Evaluation of c-erbB-2 amplification in breast carcinoma by differential polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol.* 1994;101(4):493-9.
18. Gardner L, Lee L, Dang C. The c-Myc Oncogenic transcription factor adapted from myc oncogene. *Encyclopedia of Cancer.* 2002;1-13.
19. Thompson FH, Emerson J, Alberts D, Liu Y, Guan XY, Burgess A, et al. Clonal chromosome abnormalities in 54 cases of ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;73(1):33-45.

Alterations of c-Myc and c-erbB-2 Genes in Ovarian Tumours

Tibor Pastor¹, Branka Popović¹, Ana Gvozdenović¹, Aleksandar Boro¹, Bojana Petrović², Ivana Novaković³, Dragana Puzović¹, Ljiljana Luković³, Jelena Milašin¹

¹Institute of Forensic Medicine, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

²Institut of Gynecology and Obstetrics, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia;

³Institute of Human Genetics, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction According to clinical and epidemiological studies, ovarian cancer ranks fifth in cancer deaths among women. The causes of ovarian cancer remain largely unknown but various factors may increase the risk of developing it, such as age, family history of cancer, childbearing status etc. This cancer results from a succession of genetic alterations involving oncogenes and tumour suppressor genes, which have a critical role in normal cell growth regulation. Mutations and/or overexpression of three oncogenes, c-erbB-2, c-Myc and K-ras, and of the tumour suppressor gene p53, have been frequently observed in a sporadic ovarian cancer.

Objective The aim of the present study was to analyse c-Myc and c-erbB-2 oncogene alterations, specifically amplification, as one of main mechanisms of their activation in ovarian cancers and to establish a possible association with the pathogenic process.

Methods DNA was isolated from 15 samples of malignant and 5 benign ovarian tumours, using proteinase K digestion, fo-

llowed by phenol-chloroform isoamyl extraction and ethanol precipitation. C-Myc and c-erbB-2 amplification were detected by differential PCR. The level of gene copy increase was measured using the Scion image software.

Results The amplification of both c-Myc and c-erbB-2 was detected in 26.7% of ovarian epithelial carcinoma specimens. Only one tumour specimen concomitantly showed increased gene copy number for both studied genes. Interestingly, besides amplification, gene deletion was also detected (26.7% for c-erbB-2). Most of the ovarian carcinomas with alterations in c-Myc and c-erbB-2 belonged to advanced FIGO stages.

Conclusion The amplification of c-Myc and c-erbB-2 oncogenes in ovarian epithelial carcinomas is most probably a late event in the pathogenesis conferring these tumours a more aggressive biological behaviour. Similarly, gene deletions point to genomic instability in epithelial carcinomas in higher clinical stages as the result of clonal evolution and selection.

Keywords: c-Myc oncogene amplification; c-erbB-2 oncogene amplification; dPCR; ovarian tumours