

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**IMPLICAREA GENELOR MMR (MSH2, MSH6, EXO1)  
ÎN CANCERUL ESO-GASTRIC**

**(REZUMAT)**

CONDUCĂTOR DOCTORAT:  
PROF. UNIV. DR. MIHAI CRUCE

STUDENT-DOCTORAND:  
SANDA-AMELIA ENEA  
(DRĂCEA)

CRAIOVA  
2014

## Introducere

*Cancerul gastric (CG) reprezintă și în zilele noastre o problemă importantă de sănătate, patogeneza acestei afecțiuni fiind rezultatul interacțiunii dintre factorii de mediu, epidemiologici și genetici.*

*În cancerul gastric se produc alterări genetice și epigenetice care definesc caracteristicile biologice ale celulei canceroase și care ar putea servi și ca ținte terapeutice.*

*La acumularea acestor alterări contribuie instabilitatea genomică, clasificată în instabilitatea microsateliților (MSI) și instabilitate cromozomială.*

*Apariția de substituții nucleotidice sau deleția ori inserția unor unități repetitive din structura microsateliților, fenomen ce caracterizează instabilitatea acestora este consecința deteriorării genelor MMR, implicate în repararea erorilor de replicare ADN.*

*Instabilitatea microsateliților (MSI) creată de deficiența MMR reprezintă un fenotip mutator legat de acumularea unor mutații secundare, fiind un biomarker al pierderii activității MMR în celulele tumorale. (Shah și colab., 2010; Yamamoto și colab., 2012; Zhang și colab., 2013)*

*Descoperirea legăturii directe dintre genele MMR și sindromul cancerului colo-rectal non-polipozic ereditar (HNPCC sau sindromul Lynch) a demonstrat că aceste gene necesită investigații suplimentare și în alte neoplazii.*

Cuvinte cheie: cancer gastric, expresie genică, MMR, MSH2, MSH6, EXO1

## I. STADIUL CUNOAȘTERII

**Capitolul 1.**, intitulat „**Considerații generale privind etiopatogenia cancerului gastric**” descrie epidemiologia cancerului gastric, factorii de risc implicați, precum și morfopatologia acestei afecțiuni.

**Capitolul 2.**, intitulat „**Mecanisme moleculare implicate în carcinogeneza gastrică**” sintetizează principalele alterări genetice și epigenetice întâlnite în neoplasmul gastric, precum și implicarea factorilor de creștere, citokinelor, factorilor angiogenici în carcinogeneză.

**Capitolul 3.**, numit „**Genele MMR**” descrie principalele componente ale sistemului de reparare a erorilor de replicare ADN (sistemul MMR) și modul lor de acțiune.

## II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Acest studiu și-a propus compararea expresiei genelor MMR: MSH2, MSH6 și EXO1 în țesutul tumoral și în cel peritumoral al pacienților cu cancer eso-gastric, ca și analiza corelațiilor dintre nivelul expresiei acestor gene, localizarea și evoluția patologiei.

### **Capitolul 4. Material și metodă.**

Au fost prelevate biopsii din formațiuni tumorale gastro-esofagiene de la 45 de pacienți supuși endoscopiei digestive superioare și ecoendoscopiei la Centrul de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie din Craiova, România, în perioada 2008-2010, dintre care 15 au fost femei și 30 bărbați.

Media de vârstă a fost de 62 de ani.

Localizarea tumorală a fost în majoritatea cazurilor non-cardială (n=23), urmată de cardinală (n=14) și esofagiană (n=8).

Tipul histologic a fost reprezentat de adenocarcinom pentru cancerele gastrice și de carcinom scuamos pentru cele esofagiene.

De la fiecare pacient au fost prelevate probe pereche, atât din țesutul tumoral, cât și din țesutul peritumoral.

Toți pacienții incluși în studiu au prezentat infecție cu *Helicobacter pylori*.

Țesutul peritumoral a fost analizat din punct de vedere histo-patologic și nu s-au identificat celule transformate malign.

Am obținut consimțământ informat pentru studii moleculare de la fiecare pacient.

Unele dintre probe s-au colectat în formalină, alte probe au fost colectate în soluție de stabilizare a ARN-ului, Ambion și păstrate la - 80° C până la izolarea ARN, după care a urmat analiza histopatologică, izolarea ARN total, evaluarea calității ARN (concentrație, puritate), revers-transcripția ARN total în ADN complementar, qRT-PCR și analiza rezultatelor.

### **Izolarea ARN total**

Kit-ul utilizat a fost reprezentat de SV Total RNA Isolation System (Promega) pentru izolarea și purificarea ARNului total din țesuturile tumorale și peritumorale biopsiate.

Concentrația și puritatea ARN total din probele studiate au fost măsurate spectrofotometric cu ajutorul Eppendorf Biophotometer, calitatea ARN fiind stabilită prin intermediul Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., US) și prin electroforeză în gel de agaroză.

### **qRT-PCR**

Pentru a doza expresia genică, am utilizat tehnologia Real-Time PCR cantitativ în două trepte: 1μg de ARN a fost revers-transcris în ADN

complementar monocatenar (ADNc) utilizând kit-ul High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems); apoi, am utilizat Real-Time PCR cu ajutorul TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) cu primeri și sonde TaqMan® pentru genele țintă și pentru gena de referință. Reacțiile de amplificare au fost realizate în volume de 20 μl, în triplicat, utilizând un sistem Mastercycler®ep realplex (Eppendorf).

În vederea evaluării expresiei genelor țintă s-a utilizat ca și control endogen GAPDH, atât pentru tumoră, cât și pentru mucoasa adiacentă.

Datorită faptului că eficiența primerilor și a probelor folosite în toate reacțiile a fost de 100%, proporția dintre valoarea inițială și valoarea finală în probele pereche s-a calculat prin metoda  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . (Livak și colab., 2001)

### **Datele de statistică**

Pentru probele pereche, am considerat semnificativă diferența expresiei genice dacă fracția valorilor obținute a fost mai mare de 1,8 sau mai mică de 0,55 și ne semnificative valorile cuprinse între acestea.

Am utilizat testul Chi pătrat pentru a observa dacă diferența între numărul de pacienți din fiecare grup e semnificativă.

Când variabilele nu au urmat o distribuție normală, am folosit teste statistice neparametrice (testul Wilcoxon al rangurilor pereche, testul Mann-Whitney, testul Kruskal-Wallis, testul Dunn's).

Datele obținute au fost analizate cu ajutorul GraphPad Prism 5 și al programelor GraphPad InStat.

Pentru a observa dacă există corelații între genele studiate, s-au aplicat coeficienții Spearman.

### **Capitolul 5. Rezultate.**

Evaluarea comparativă a expresiei relative a fiecărei gene analizate, atât pentru tumoră, cât și pentru țesutul peritumoral este prezentată în **tabelul 1**.

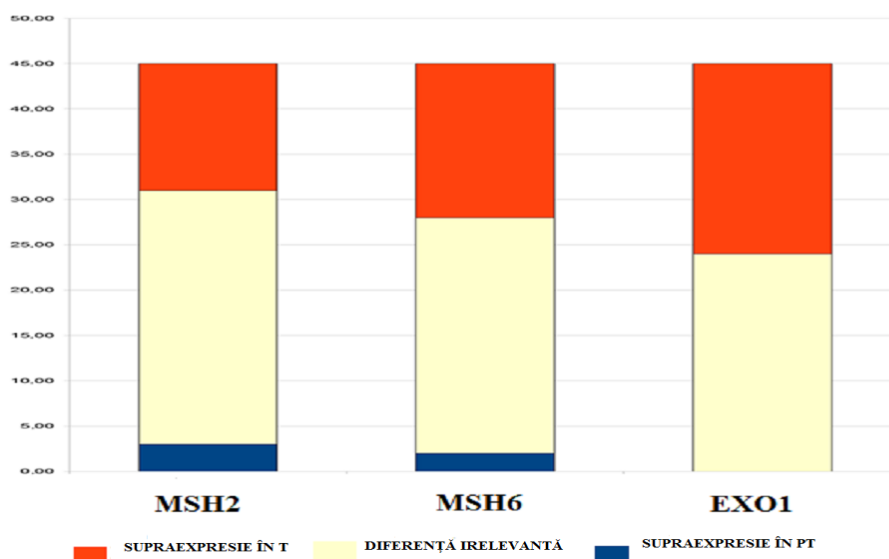
**Tab.1 Profilul expresiei genelor MSH2, MSH6, EXO1 pentru lotul analizat**

MSH2	MSH6	EXO1	
14 (31,11%)	17 (37,78%)	21 (46,67%)	>1,8 supraexpresie în T
31	28	24	< 1,8
0	0	0	0/0
3 (6,67%)	2 (4,44%)	0 (0,00%)	<=0,55 supraexpresie în PT
28 (62,22%)	26 (57,78%)	24 (53,33%)	0,55-1,8 diferență irelevantă

Am aplicat testul Chi pătrat pentru a vedea dacă diferența dintre numărul de pacienți din fiecare grup este semnificativă, remarcând că, pentru fiecare gena analizată, p a fost < 0,0001.(Fig.1)

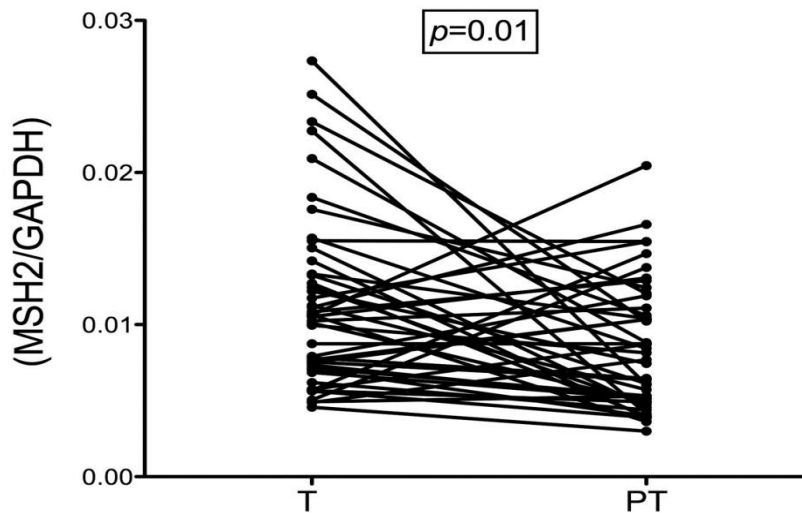
**Fig. 1 Nivelul expresiei genelor analizate**

(Pe abscisă sunt notați pacienții, pe ordonată expresia genică)



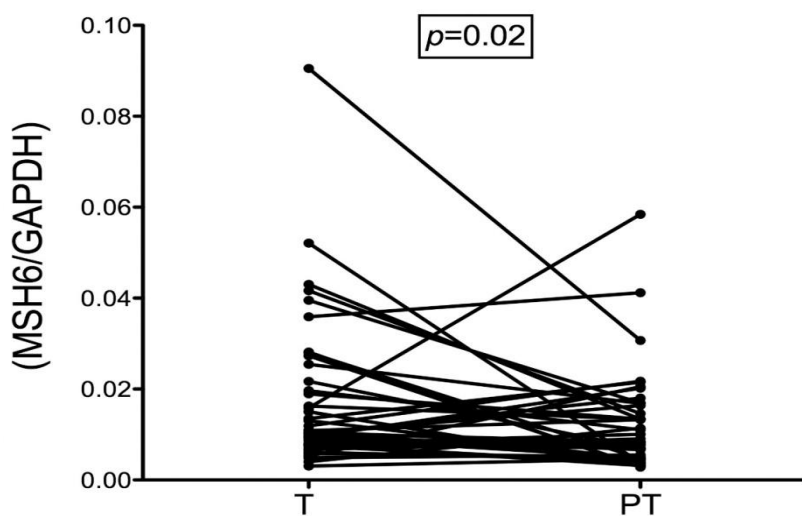
Evaluarea expresiei fiecărei gene de interes s-a efectuat prin paralelism în probele pereche, datele fiind prezentate ca expresie relativă a ARNm pentru fiecare genă, raportată la GAPDH ( Wilcoxon matched-pairs signed rank test). (Fig.2,3,4)

**Fig. 2** Expresia comparativă a MSH2ARNm la nivel tumoral/ peritumoral



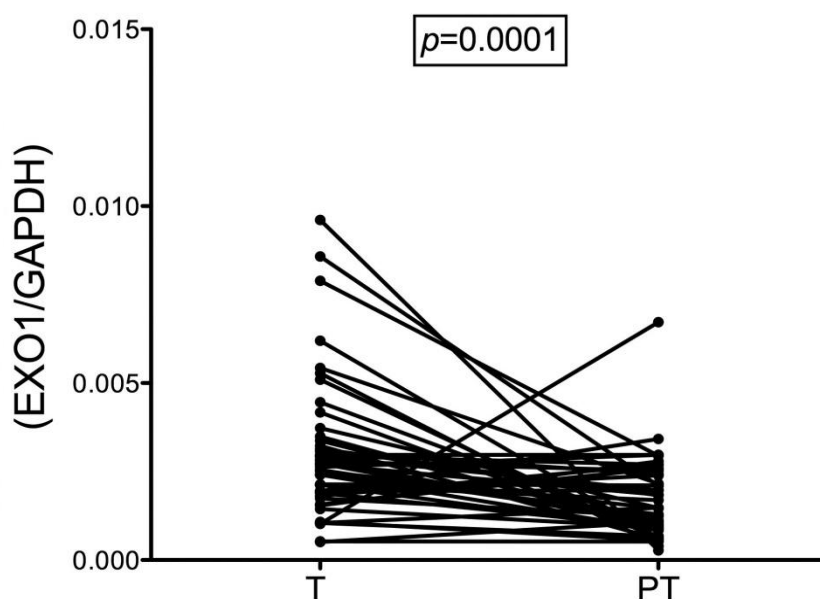
Se observă că expresia relativă a MSH2 a fost semnificativ crescută la nivel tumoral, comparativ cu nivelul peritumoral.

**Fig. 3** Expresia comparativă a MSH6ARNm la nivel tumoral/ peritumoral



Este de remarcat că și expresia relativă a MSH6 a fost semnificativ crescută la nivel tumoral comparativ cu cel peritumoral.

**Fig. 4** Expresia comparativă a EXO1ARNm la nivel tumoral/ peritumoral



Ca și în cazul MSH2, MSH6, expresia EXO1 evaluată în probele pereche a fost semnificativ mai mare la nivel tumoral, față de cel peritumoral.

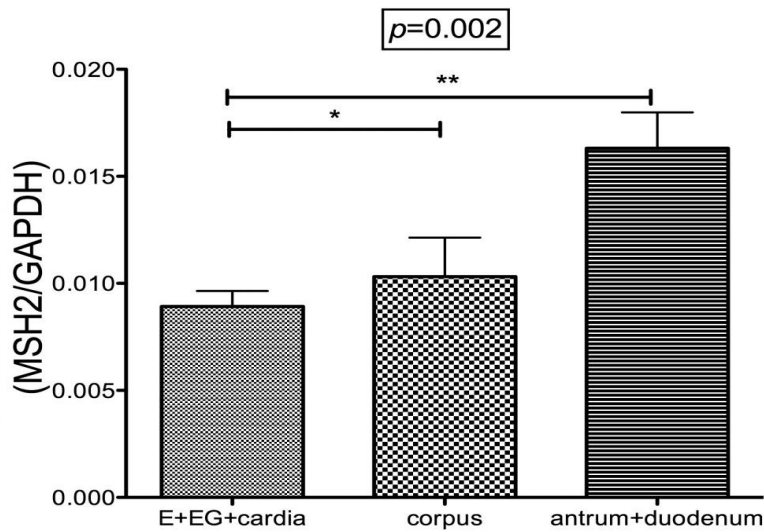
Am analizat gradul de corelare între genele studiate folosind coeficienții Spearman și am observat că:

- între MSH2 și MSH6 la nivel tumoral există o asociere pozitivă puternică ( $p < 0,0001$ );
- între MSH2 și MSH6 la nivel peritumoral există o asociere pozitivă puternică ( $p < 0,0001$ );
- între MSH2 și EXO1 la nivel peritumoral există asociere pozitivă ( $p < 0,0001$ ).

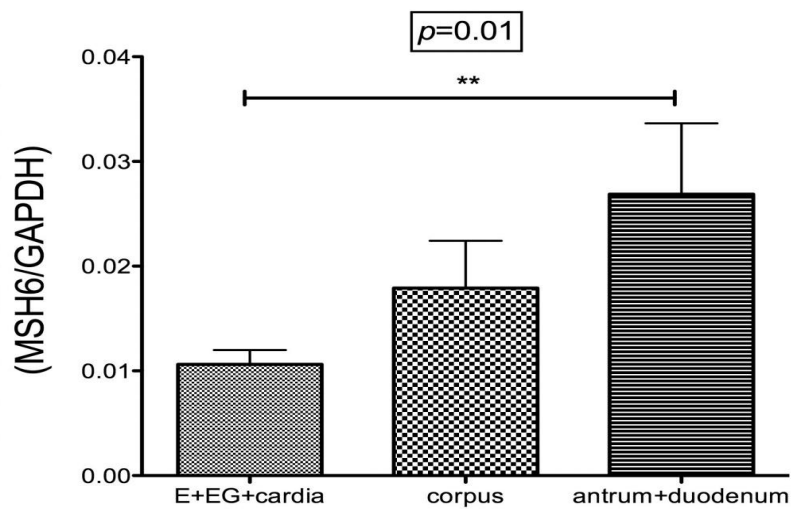
Referitor la corelarea expresiei genice relative cu localizarea tumorală (aplicând Kruskal Wallis Test și apoi Dunn's Multiple Comparison Test), am observat că că expresiile relative ale MSH2 și MSH6 s-au asociat semnificativ cu localizarea tumorală distală. (**Fig.5, 6**)



**Fig. 5** Expresia relativă a MSH2 în raport cu localizarea tumorală



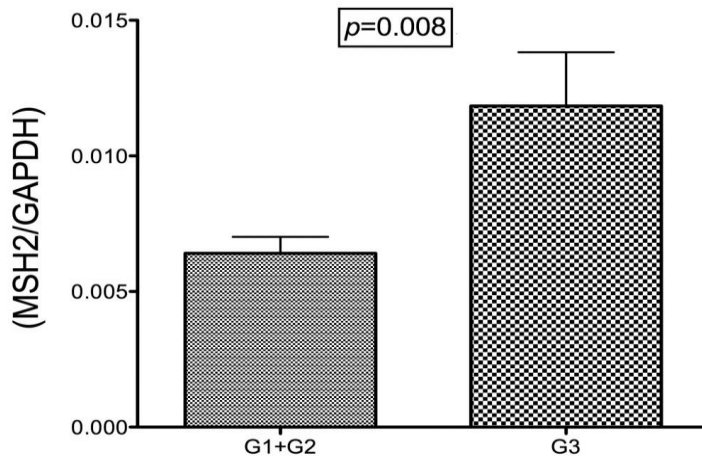
**Fig. 6** Expresia relativă a MSH6 în raport cu localizarea tumorală



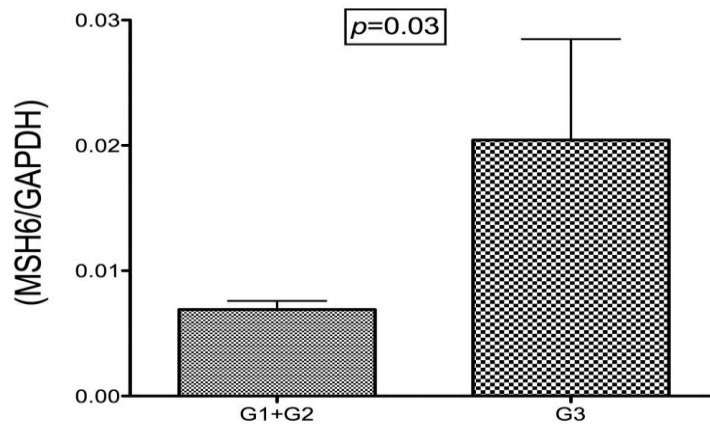
Tipul histologic și stadiul tumoral nu au influențat nivelurile expresiei relative ale genelor studiate.

În schimb, gradul 3 de diferențiere tumorală s-a corelat semnificativ cu expresia MSH2 și cu cea a MSH6. ( **Fig.7, 8** )

**Fig. 7** Expresia relativă a MSH2 în raport cu gradul tumoral



**Fig. 8** Expresia relativă a MSH6 în raport cu gradul tumoral



## Capitolul 6. Discuții.

Dacă în literatura de specialitate în privința sindromului Lynch apare un deficit MMR la nivel tumoral, modelul expresiei genice pe care l-am obținut indică tendința activării superioare a genelor MMR în neoplazie (supraexpresie), asocierea pozitivă a nivelului MSH2 și MSH6 la nivel tumoral și corelarea acestora cu localizarea distală a tumorii.

O posibilă explicație ar putea fi aceea că, având în vedere rolul EXO1 în excizia ADN dublu-catenar și al MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) de reparare a erorilor singulare de tip bază-bază și IDL de 1-2 baze, supraexpresia acestor gene în

cancerul gastric ar putea reprezenta un răspuns al organismului la creșterea rapidă a numărului greșelilor de replicare din carcinogeneză, luând în considerare și capacitatea de proliferare crescută a celulelor tumorale.

Rezultatele acestui studiu sunt în concordanță cu cele obținute de Li și colaboratorii săi (2008) privind supraexpresia MSH2 la nivel tumoral.

Pe lângă studiul efectuat de noi, Li și colaboratorii (2008) au analizat valorile expresiei genice și în raport cu markerul de proliferare celulară Ki67 fără a obține rezultate statistice semnificative.

De asemenea, datele menționate de Li și colaboratorii nu au sugerat existența unor corelații cu anumiți parametri cum ar fi : vârstă, sex, gen, infecție cu H.pylori, grad de diferențiere sau metastazare în ganglionii limfatici.

Pe de altă parte s-a observat că supraexpresia MMR în cancer nu se traduce printr-o reparare a erorilor de replicare mai eficientă.

S-ar putea ca valorile crescute ale proteinei MMR în celulele neoplazice să fie determinate de acumularea acesteia la nivel tumoral, dar fără ca proteina să mai prezinte funcțiile originale.

Este cunoscut faptul că mutația unei gene poate determina supraexpresia produsului proteic. ( Li și colab.2008)

Shin și colaboratorii săi (2002) au raportat într-un caz de HNPCC cu cancer gastric că mutația promoterului MSH2 ( transversia G la C la poziția -225) a crescut eficiența transcripțională cu 466%, sugerând că mutația MSH2 poate duce la creșterea expresiei produsului proteic.

Analizând aceste date în raport cu asocierea supraexpresiei MMR la nivel tumoral cu potențialul metastatic crescut și supraviețuirea scăzută, observată de Sarasin și Kauffmann (2008) în cazul mai multor tipuri de neoplazii (melanom malign, cancer mamar, vezical), poate fi emisă și ipoteza conform căreia această creștere are rolul de a conferi celulei neoplazice un anumit grad de stabilitate genetică necesară pentru a putea invada și a produce metastaze la distanță.

Distrugerea capacității celulelor metastatice de a-și asigura repararea genomului poate să conducă la scăderea capacității de invazie și a agresivității.

Referitor la rezultatele studiului nostru privind corelația existentă între supraexprimarea tumorală a MSH2 și gradul 3 de diferențiere al cancerului gastric, numeroase studii efectuate de alți autori au evidențiat mai degrabă asocierea statusului MSI cu tumorile slab diferențiate.

Bacani și colaboratorii (2005) au expus corelarea existentă între MSI, tipul intestinal de cancer gastric și gradul de diferențiere slab, rezultate similare cu cele obținute anterior și de Seruca și colaboratorii săi (1995).

Deși datele diverselor studii nu sunt similare, putem privi implicarea MMR în cancerul gastric ca pe o certitudine.

Toți pacienții incluși în lotul pe care l-am analizat au prezentat infecție cu H.pylori.

Prezența H.pylori duce la inflamația mucoasei gastrice, ulterior producându-se modificări ale ciclului celular care stimulează replicarea celulelor epiteliale și cresc astfel rata apoptotică și eliberarea substanțelor oxidative. ( De la Riva și colab., 2004)

Secundar acestor evenimente și a epuizării apărării antioxidante, apariția mutațiilor ADN este favorizată determinând intensificarea activității sistemului MMR.

Deoarece infecția cu H.pylori apare mai frecvent la indivizii ce prezintă status MSI, ar exista posibilitatea unei interacțiuni directe cu MMR. ( Leung și colab., 2000; Kim și colab., 2002)

În plus, celulele epiteliale gastrice inoculate cu H.pylori au prezentat scăderea expresiei proteinelor MutS și MutL. (Kim și colab., 2002)

Park și colaboratorii (2005) au studiat nivelul expresiei MLH1 și MSH2 la pacienții infectați cu H.pylori înainte și după eradicare și au raportat creșterea

expresiei proteinelor MMR după ce infecția a fost eliminată, rezultate ce susțin această teorie.

Halling și colaboratorii (1999) au remarcat că neoplaziile gastrice MSI- pozitive prezintă frecvent pierderea activității MLH1 și mai rar pe cea a MSH2.

Rezultate similare privind nivelul acestor proteine au fost obținute și de Mirzae și colaboratorii săi (2008).

Având în vedere că în studiul nostru am constatat expresia crescută a celor trei gene din grupul MMR, la pacienții infectați cu H.pylori, putem considera că, în această privință, rezultatele noastre nu sunt în concordanță cu studiile prezentate anterior.

## **Capitolul 7. Concluzii.**

- Creșterea expresiei celor 3 gene MMR analizate (MSH2, MSH6, EXO1) la nivel peritumoral poate fi considerată un marker al unei neoplazii incipiente;
- Supraexprimarea acestor gene la nivel tumoral poate fi interpretată ca fiind:
  - răspunsul organismului la înmulțirea erorilor de replicare implicate în carcinogeneză;
  - rezultatul mutațiilor genice care cresc sinteza proteinelor, lipsite însă de funcțiile inițiale;
  - calea prin care celula neoplazică și-ar putea asigura stabilitatea genomică necesară pentru a putea invada;
- Coexistența infecției cu H.pylori nu a influențat negativ nivelul de expresie al celor 3 gene;
- Asocierea supraexpresiei MSH2 și a MSH6 cu G3 poate fi considerată ca un factor de prognostic negativ.

## Bibliografie selectivă

1. Bacani J., Zwingerman R., Di Nicola N., Spencer S., Wegrynowsky T., Mitchell K., Hay K. et al. Tumor Microsatellite Instability in Early Onset Gastric Cancer. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7 (4): 465-477
2. De la Riva S., Muñoz-Navas M. , Sola J.J. Gastric carcinogenesis. *Rev Esp Enferm DIG (Madrid)* 2004; 96 (4) : 265-276
3. Halling K.C., Harper J., Moskaluk C.A., Thibodeau S.N., Petroni G.R., Yustein A.S, Tosi P., Minacci C., Roviello F., Piva P., Hamilton S.R., Jackson C.E., Powell S.M. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 205-211
4. Kim J.J., Tao H., Carloni E., Leung W.K., Graham D.Y., Sepulveda A.R. Helicobacter pylori impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 542-553.
5. Leung W.K., Kim J.J., Kim J.G., Graham D.Y., Sepulveda A.R. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-43.
6. Li M., Liu L., Wang Z., Wang L., Liu Z., Xu G., Lu S. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep.* 2008 Feb;19(2):401-6.
7. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec; 25(4): 402-8.
8. Mirzaee V., Molaei M., Shalmani H.M., Zali M.R. Helicobacter pylori infection and expression of DNA mismatch repair proteins *World J Gastroenterol* 2008 noiembrie 21; 14(43): 6717-6721

9. Park D., Park S.H., Kim S.H., Kim J.W., Cho Y.K., Kim H.J. et al. Effect of *Helicobacter pylori* Infection on the Expression of DNA Mismatch Repair Protein. *Helicobacter* 2005; 10 (3): 179-184
10. Sarasin A., Kauffmann A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: A new hypothesis *Mutation Research* 2008; 659; 49–55
11. Seruca R., Santos N.R., David L., Constancia M., Barroca H., Carneiro F., Seixas M., Peltomaki P., Lothe R., Sobrinho-Simoes M. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J Cancer* 1995; 64: 32–36
12. Shah S.N., Hile S.E., Eckert K.A. Defective Mismatch Repair, Microsatellite Mutation Bias, and Variability in Clinical Cancer Phenotypes *Cancer Res* 2010; 70: 431-435
13. Shin K.H., Shin J.H., Kim J.H., Park J.G: Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: indentification of three noval germ-line mutations in promoter of hMSH2 gene. *Cancer Res* 2002; 62: 38-42
14. Yamamoto H., Adachi Y., Taniguchi H. et al. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2012 ; 18(22): 2745-55
15. Zhang Y.W, Eom S.Y, Yim D.H., Song Y.J., Yun H.Y., Park J.S., Youn S.J., Kim B.S., Kim Y.D., şi Kim H. Evaluation of the relationship between dietary factors, CagA-positive *Helicobacter pylori* infection, and RUNX3 promoter hypermethylation in gastric cancer tissue. *World J Gastroenterol*. Mar 21, 2013; 19 (11): 1778–1787.