

EKSPRESJA OSTEOPONTYNY I TROMBOSPONDYNY W NOWOTWORZE JELITA GRUBEGO

Marzena Łubkowska

Zakład Medycyny Molekularnej, Akademia Medyczna w Gdańsku

Rak jelita grubego należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Poszukiwanie czynników, które mogłyby być pomocne w określaniu rokowania dla pacjentów z tą chorobą, jest konieczne przede wszystkim ze względu na zróżnicowany przebieg nowotworów o tym samym stopniu zaawansowania i na niezadowalające wyniki leczenia. Obecnie najważniejszym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego jest stopień zaawansowania nowotworu, oznaczony wg klasyfikacji pTNM.

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych zaburzeń genetycznych na rokowanie w raku jelita grubego. Badania objęły określenie obecności zwiększonej liczby kopii genów *c-myc* i *c-erb-B2*, obecności mutacji w kodonie 12 genu *K-ras-2*, a także obecności mRNA dla osteopontyny i trombospondyny-1.

Osteopontyna (OPN) jest wydzielniczą, ufosforylowaną kwaśną glikoproteiną o wielkości 60 kDa, kodowaną przez gen *osp-1*, zlokalizowany na chromosomie 4 [24]. Funkcje osteopontyny związane są z wieloma procesami fizjologicznymi. Zaliczyć do nich można utrzymanie i ponowne kształtowanie spójności tkanki podczas reakcji zapalnych, modelowanie kości pod wpływem naprężenia lub ucisku, czy udział we wczesnej immunologicznej odpowiedzi komórkowej. Osteopontyna uczestniczy również w procesach zwapnienia dystroficznego, nawrotowym zwięźnieniu naczyń wieńcowych, a także w regulowaniu wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych i powstawaniu przerzutów [7].

Trombospondyny są rodziną białek wydzielniczych biorących udział w oddziaływaniach między komórkami, a także między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową [3]. Gen *tsp-1*,

kodujący białko trombospondynę-1 (TSP-1) zlokalizowano na chromosomie 15 i stwierdzono, że koduje glikozylowane, beta-hydroksylowane białko bogate w cysteinę o wielkości około 450 kDa [5]. Wykazano, że białko TSP-1 bierze udział w wielu procesach komórkowych, m.in. adhezji komórek, migracji i proliferacji. Stwierdzono również, że może wpływać na procesy angiogenezy i progresji nowotworowej [17]. Wielu badaczy sugeruje, że zarówno osteopontyna, jak i trombospondyna mogą mieć znaczenie w rozwoju nowotworów. Zwiększoną ekspresję osteopontyny zaobserwowano m.in. w raku piersi, prostaty, płuc i jelita grubego [1, 22, 23, 26]. Wykazano, że poziom ekspresji osteopontyny ma związek ze stopniem zaawansowania raka, np. jelita grubego, a także z liczbą naczyń krwionośnych, co zaobserwowano w przypadku raka gruczołowego płuc stopnia I [1, 23]. Uważa się, że obecność ekspresji osteopontyny ma związek z gorszym prognozowaniem dla pacjentów z chorobą nowotworową. Z kolei ekspresja TSP-1 jest uznawana przez wielu badaczy za pozytywny czynnik rokowniczy u pacjentów z tą chorobą. Przykładem jest rak brodawkowaty tarczycy, gdzie stwierdzono, że istnieje odwrotna korelacja między występowaniem ekspresji tego białka a stopniem inwazyjności nowotworu pierwotnego i liczbą naczyń krwionośnych w obrębie guza [25]. Stwierdzono, że TSP-1 może być czynnikiem hamującym angiogenezę, wzrost nowotworów jelita grubego i tworzenie przerzutów [16]. Behzad i wsp. wykazali natomiast, że obecność białka TSP-1 w komórkach nowotworowych jelita grubego nie ma związku z czasem przeżycia pacjentów [4]. Z kolei Jin i wsp.

uważają, że *tsp-1* może być przydatnym genem w terapii genowej raka prostaty [11]. Odmienne wyniki uzyskano, badając inwazyjnego gruczolakoraka trzustki, gdzie ekspresja TSP-1 korelowała z przerzutami do węzłów chłonnych i stopniem zaawansowania nowotworu wg pTNM [12].

Gen *c-myc* zlokalizowany jest na chromosomie 8. Białko c-Myc aktywuje transkrypcję, wpływa na aktywność proliferacyjną komórek, a w związku z tym może pośrednio wpływać na ich transformację [13]. Badania genu *c-myc* wykazały obecność zmian jakościowych i ilościowych tego genu w wielu nowotworach, m.in. jelita grubego, nerki i prostaty [18]. Amplifikację *c-myc* obserwuje się w guzach piersi cechujących się większą zdolnością do tworzenia przerzutów i zalicza się ją do czynników oznaczających gorsze rokowanie [14].

Gen *c-erb-B2* zlokalizowany jest na chromosomie 17 i koduje fosfoglikoproteinę błonową o masie cząsteczkowej 185 kDa, wykazującą aktywność kinazy tyrozynowej [8]. Amplifikację onkogenu *c-erb-B2* stwierdza się w raku piersi, jajnika, macicy, przewodu pokarmowego, ślinianek i mózgu [20, 21, 28]. Z dotychczasowych doniesień wynika, że amplifikacja i nadekspresja genu *c-erb-B2* wiążą się z gorszym rokowaniem u chorych na raka piersi, szczególnie u osób z przerzutami do węzłów chłonnych [27]. U tych pacjentów stwierdzono ponadto dodatnią korelację pomiędzy amplifikacją, aktywnością mitotyczną komórek i utratą receptorów estrogenowych i progesteronowych [10, 19].

Gen *K-ras-2* znajduje się na chromosomie 12 i koduje białko p21^{K-ras}. Mutacje w genie *K-ras-2* blokują jego aktywność GTP-azową, przez co pozostaje on stale w stanie aktywnym. Zaktywowane białko Ras aktywuje regulatory proliferacji, m.in. kinazę MAP i kinazę białkową C. W konsekwencji powstają komórki nowotworowe, w których występuje patologiczna aktywacja mitogennych ścieżek sygnalizacyjnych. Mutacje w onkogenach *ras* należą do najczęściej opisywanych zmian genetycznych w komórkach nowotworowych człowieka [15]. Zmutowane geny tej rodziny znaleziono w wielu nowotworach, m.in. płuc, trzustki, żołądka, jelita grubego, jak również w przewlekłej białaczce szpikowej [6, 9]. Udział zmutowanych genów *ras* w rozwoju nowotworu został wykazany na

różnych modelach nowotworów indukowanych związkami karcynogennymi u zwierząt [2].

Wyniki uzyskane po analizie opisanych wskaźników genetycznych (obecność mRNA dla osteopontyny i trombospondyny-1, amplifikacja genów *c-myc* i *c-erb-B2* oraz obecność mutacji w kodonie 12 genu *K-ras-2*) odniesiono do długości czasu przeżycia pacjentów i do wybranych parametrów klinicznych (stopień zaawansowania nowotworu wg klasyfikacji pTNM, obecność przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, zakres szerzenia się guza, obecność odległych przerzutów, stopień zróżnicowania nowotworu, wiek i płeć).

Badania przeprowadzono na 100 nowotworach jelita grubego i 36 tkankach prawidłowych, pochodzących z obrzeża guza [tabela 1]. Przeprowadzona analiza potwierdziła znany fakt, że stopień zaawansowania nowotworu wg pTNM i obecność przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych ma niezależną wartość rokowniczą.

Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano, korzystając z programu *STATISTICA*.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy obejmującej 100 chorych z nowotworem jelita grubego.

Cecha	Liczba chorych n=100
Zróżnicowanie	
G1+G2	85
G3	11
BD	4
Zaawansowanie wg pTNM	
I	11
II	40
III	44
IV	5
T (zakres naciekania guza)	
1 (T1 + T2)	20
2 (T3 + T4)	80
N (stan węzłów chłonnych)	
0	51
1	49
M (obecność przerzutów)	
0	95
1	5
Wiek	
≤ 67	55
> 67	45
Płeć	
K	50
M	50

BD – brak danych.

Analizując zależności między występowaniem poszczególnych zaburzeń genetycznych a określonymi cechami klinicznymi, stwier-

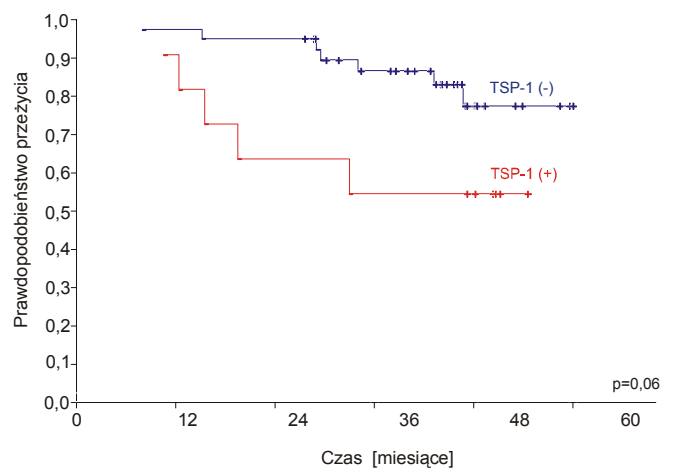
dzono, że ekspresja osteopontyny najczęściej występuje w nowotworach w III stopniu zaawansowania. Z kolei ekspresja trombospondyny-1 najczęściej spotykana jest w rakach jelita grubego o niskim stopniu zróżnicowania i u osób powyżej 67 roku życia. U tych osób znacznie częściej obserwowano również obecność mutacji w kodonie 12 genu *K-ras-2*. Obecność amplifikacji genu *c-erb-B2* nie wykazywała związku z analizowanymi cechami klinicznymi. Wykazano jedynie, że obecność amplifikacji tego genu łącznie z ekspresją osteopontyny częściej występuje w nowotworach w III stopniu zaawansowania. Podobnie amplifikacja genu *c-myc* częściej obserwowana jest w nowotworach w III stopniu zaawansowania w przypadkach, kiedy towarzyszy jej ekspresja osteopontyny.

W grupie guzów, w których z kolei stwierdzono jedynie obecność amplifikacji tego genu (bez ekspresji osteopontyny), częściej obserwowano nowotwory niskozróżnicowane.

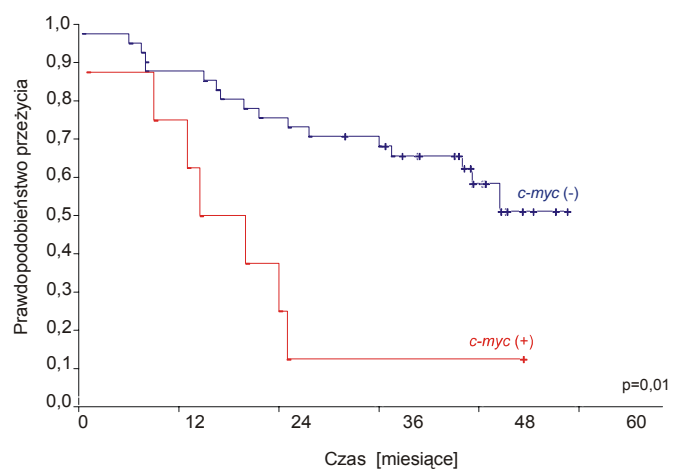
Porównanie czasu przeżycia chorych z rakiem jelita grubego z występowaniem poszczególnych zaburzeń genetycznych wykazało, że ekspresja trombospondyny-1 związana jest z blisko trzykrotnym 2,94 (95% ZU: 0,93-9,3) $p=0,06$ wzrostem ryzyka zgonu chorych z nowotworami w I i II stopniu zaawansowania [rys. 1]. Prawdopodobieństwo przeżycia trzyletniego pacjentów z nowotworami w I i II stopniu zaawansowania z ekspresją trombospondyny-1 wynosi 54% (95% ZU: 25-84%), $n=11$. Natomiast w grupie niewykazującej ekspresji trombospondyny-1 prawdopodobieństwo przeżycia takiego samego okresu czasu wynosi 87% (95% ZU: 76-98%), $n=40$. Wykazano również, że amplifikacja genu *c-myc* w nowotworach w III i IV stopniu zaawansowania jest związana z czasem przeżycia pacjentów [rys. 2]. Trzyletni okres przeżycia miało 68% (95% ZU: 54-82%) $n=41$ pacjentów z nowotworem w wyższym stopniu zaawansowania w przypadku braku amplifikacji genu *c-myc* i tylko 12% (95% ZU: 0-35%) $n=8$ chorych miało taki okres przeżycia przy obecnej amplifikacji tego genu. Ryzyko zgonu pacjentów z nowotworami w wyższym stopniu zaawansowania (III + IV), u których stwierdzono ekspresję *c-myc* wynosiło 3,75 (95% ZU: 1,51-9,28), $p=0,004$. Wieloczynnikowa analiza wg modelu regresji Coxa wykazała, że obecność mRNA dla trombospondyny-1 jest niezależnym czynnikiem rokowniczym dla chorych z rakiem

jelita grubego. Stwierdzono również, że amplifikacja genu *c-myc* nie jest czynnikiem o niezależnej wartości rokowniczej. Pozostałe analizowane w pracy zmiany genetyczne nie wykazały wartości rokowniczej i nie miały związku z czasem przeżycia pacjentów.

Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują na celowość oznaczania niektórych parametrów genetycznych u chorych na raka jelita grubego. Wydaje się, że wyniki oznaczenia obecności mRNA dla trombospondyny-1 oraz amplifikacji genu *c-myc* mogą być pomocne w podejmowaniu decyzji o wdrożeniu u chorych leczenia wspomagającego. Przydatność rokownicza oznaczania tych dwóch parametrów genetycznych powinna być jednak potwierdzona w badaniach na większej liczbie przypadków.



Rys. 1. Krzywa przeżycia wg Kaplana-Meyera w zależności od ekspresji genu *tsp-1* w grupie pacjentów z nowotworami w I i II stopniu zaawansowania, $n=51$.



Rys. 2. Krzywa przeżycia wg Kaplana-Meyera w zależności od amplifikacji genu *c-myc* w grupie pacjentów z nowotworami w III i IV stopniu zaawansowania, $n=49$.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Agrawal D., Chen T., Irby R., Quackenbush J., Chambers A.F., Szabo M., Cantor A., Coppola D., Yeatman T.J. (2002). Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J. Natl Cancer Inst.*, 94(7), 513-521.
- 2) Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arheim N., Perucho M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53, 549-554.
- 3) Baenziger N.L., Brodie G.N., Majerus P.W. (1972). Isolation and properties of a thrombin-sensitive protein of human platelets. *J. Biol. Chem.*, 247, 2723-2731.
- 4) Behzad F., Abdalla S., Gardy R., Battic E., Kumar S., Haboubi N. (2000). Thrombospondin in colorectal disease. *Colorectal Disease*, 2, 150-153.
- 5) Bornstein P., Sage E.H. (1994). Thrombospondins. *Methods Enzymol.*, 245, 62-85.
- 6) Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P., Hayflick J.S., Edman U, Levinson A.D., Goeddel D.V. (1983). Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature*, 304, 507-513.
- 7) Denhardt D.T., Noda M, O'Regan A.W., Pavlin D., Berman J.S. (2001). Osteopontin as means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.*, 107(9), 1055-1061.
- 8) Descotes F., Pavy J.J., Adessi G.L. (1993). Human breast cancer correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer Res.*, 13, 119-124.
- 9) Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.E., Perucho M. (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 327, 298-303.
- 10) Heintz N.H., Leslie K.O, Rogers L.A, Howard P.L. (1990). Amplification of the c-erbB-2 oncogene in prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 114, 160-163.
- 11) Jin R.J., Kwak C., Lee S.G., Lee C.H., Soo C.G., Park M.S., Lee E., Lee S.E. (2000). The application of an anti-angiogenic gene (thrombospondin-1) in the treatment of human prostate cancer xenografts. *Cancer Gene Ther.*, 7, 1537-1542.
- 12) Kasper H.U., Ebert M., Malfertheiner P., Roessner A., Kirkpatrick C.J., Wolf H.K. (2001). Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch.*, 438, 116-120.
- 13) Lee L.A., Dolde C., Barrett J., Wu C.S., Dang C.V. (1996). A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J. Clin. Invest.*, 97(7), 1687-1695.
- 14) Lindereau R., Mathieu-Mahul D., Escot C., Theillet C., Champeme M.H., Cole S., Mauchauffe M., Ali I., Amione J., Callahan R. (1988). Genetic variability of proto-oncogenes for breast cancer risk and prognosis. *Biochimie*, 70, 951-959.
- 15) Losi L., Benhattar J., Costa J. (1992). Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 28A, 1115-20.
- 16) Miyanaga K., Kato Y., Nakamura T., Matsumura M., Amaya H., Horiuchi T., Chiba Y., Tanaka K. (2002). Expression and role of thrombospondin-1 in colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 22, 3941-3948.
- 17) Mosher D.F. (1990) The physiology of thrombospondin. *Annu. Rev. Med.*, 41, 85-87.
- 18) Nesbit C.E., Tersak J.M., Prochownik E.V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease, *Oncogene*, 18, 3004-3016.
- 19) Paterson M.C., Dietrich K.D., Danyluk J., Paterson A.H., Lees A.W., Jamil N., Hanson J., Jenkins H., Krause B.E., McBlain W.A. (1991). Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.*, 51, 556-567.
- 20) Porter P.L., Garcia R., Moe R., Corwin D.J., Gown A.M. (1991). C-erbB-2 oncogene protein in situ and invasive lobular breast neoplasia, *Cancer*, 68, 331-334.
- 21) Press B.M., Bernstein L., Thomas P.A., Meisner L.F., Zhou J.Y., Ma Y., Hung G., Robinson R.A. (1997). HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.*, 15, 2894-2904.
- 22) Rudland P.S., Platt-Higgins A., El-Tanani M., De Silva Rudland S., Barraclough R., Winstanley J.H., Howitt R., West C.R. (2002). Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast tissue. *Cancer Res.*, 62, 3417-3427.
- 23) Shijubo N., Uede T., Kon S., Maeda M., Segawa T., Imada A., Hirasawa M., Abe S. (1999). Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160, 1269-1273.
- 24) Sodek J., Saginario C., Vignery A. (2000). Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 11, 279-303.
- 25) Tanaka K., Sonoo H., Kurebayashi J., Nomura T., Ohkubo S., Yamamoto Y., Yamamoto S. (2002). Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8, 1125-1131.
- 26) Thalmann G.N., Sikes R.A, Devoll R.E., Kiefer J.A., Markwalder R., Klima I., Farach-Carson C.M., Studer U.E., Chung L.W.K. (1999). Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin. Cancer Res.*, 5, 2271-2277.
- 27) Tiwari R.K., Borgen P.I., Wong G.Y., Cordon-Cardo C., Osborne M.P. (1992). HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res.*, 12, 419-25.
- 28) Torp S.H., Helseth E., Unsgaard G., Dalen A. (1993). C-erbB-2/HER-2 protein in human intracranial tumours. *Eur. J. Cancer*, 29, 1604-1606.