

AUTOR: Marek Łuciuk

TYTUŁ:

OCENA WYSTĘPOWANIA BIAŁKA CAŁKOWITEGO P53 I JEGO
UFOSFORYLOWANYCH FORM W POZYCJI SERYNA 15 I SERYNA 20 W
NOWOTWORACH JAMY USTNEJ: KORELACJA Z WYBRANYMI
PARAMETRAMI KLINICZNO-PATOLOGICZNYMI

Rozprawa doktorska

Promotor:
prof. dr hab. n. med. Tomasz Kręcick

Wrocław 2017

STRESZCZENIE

Każdego roku rozpoznaje się na świecie około 600 tys. nowych zachorowań na nowotwory złośliwe głowy i szyi, a około 400 tys. osób umiera z tego powodu. Obserwuje się tendencję do wzrostu zapadalności na te nowotwory. Wyniki leczenia tych schorzeń są jednak w naszym kraju wysoce niezadowolające, co jest skutkiem m.in. późnego zgłaszania się chorych na leczenie.

Nowotwory nabłonkowe (raki) regionu głowy i szyi stanowią około 5% wszystkich zarejestrowanych w Polsce nowotworów złośliwych. Zdecydowanie częściej występują u mężczyzn – około 7% i rzadziej u kobiet – około 1%. O skali zagrożenia świadczy fakt, że w Polsce w 2012 odnotowano ponad 3200 nowych przypadków zachorowań na złośliwe nowotwory jamy ustnej i warg. Liczba zgonów natomiast wyniosła ponad 1300 przypadków. Najczęstsza lokalizacja raka jamy ustnej to: język oraz dno jamy ustnej, znacznie mniej przypadków dotyczy wyrostka zębodołowego, trójkąta zatrzonowcowego żuchwy, policzka czy podniebienia twardego. Ponad 95% przypadków stanowią raki płaskonabłonkowe.

Cechy biologiczne raka jamy ustnej określane są między innymi poprzez obecność różnorodnych białek pełniących w komórce różne funkcje. Jednym z nich, mogącym mieć istotne znaczenie prognostyczne jest białko p53 biorące udział w naprawie uszkodzeń DNA lub wyzwalaniu apoptozy. Procesy te zachodzą tylko wówczas, jeżeli prawidłowe białko p53 jest białkiem aktywnym. Jednym z mechanizmów aktywacji p53 i skierowania komórki nowotworowej na drogę apoptozy jest jego fosforylacja w wybranych pozycjach. Białko to może podlegać fosforylacji zarówno w obrębie N- jak i C-końca terminalnej domeny tego białka. W prawidłowych warunkach białko p53 utrzymywane jest w komórkach na niskim poziomie.

Po zadziałaniu czynnika wywołującego uszkodzenia DNA, aktywowana kinaza fosforyluje białko p53 na reszcie seryny 15 i/lub seryny 20 – w obrębie końca N. W rezultacie, dochodzi do zahamowania degradacji białka p53, wzrostu jego aktywacji, stabilizacji i w konsekwencji wysokiej akumulacji w komórce. W komórce z uszkodzeniami DNA w prawidłowych warunkach wzrasta fosforylacja białka p53 i przez to ogranicza się szansa na rozwój nowotworu. W różnego rodzaju zaburzeniach, gdy w warunkach z

uszkodzonym DNA w komórkach nie dochodzi do fosforylacji i aktywacji białek p53 rozwija się proces nowotworowy.

Celem pracy jest immunohistochemiczna ocena występowania białka p53 oraz jego ufosforylowanych form w pozycji seryna 15 i seryna 20 w nowotworach jamy ustnej a także ich korelacja z cechami histopatologicznymi i parametrami kliniczno-patologicznymi u tych pacjentów.

Materiał do badań stanowiły utrwalone w formaldehydzie i zatopione w parafinie fragmenty tkankowe pobrane od 66 pacjentów z rozpoznaniem nowotworu złośliwego jamy ustnej. W badanej grupie było 43 (65%) mężczyzn i 23 (35%) kobiety. Wyróżniono 3 grupy ze względu na lokalizację ogniska pierwotnego: język, dno jamy ustnej i region przedsionka jamy ustnej. Wszyscy pacjenci poddani zostali zabiegowi chirurgicznemu wycięcia ogniska pierwotnego raka. W zależności od wskazań, w wybranych przypadkach przeprowadzono jednocześnie operacje usunięcia regionalnych węzłów chłonnych. Część pacjentów otrzymała leczenie uzupełniające w postaci: radioterapii, chemioterapii czy radiochemioterapii.

Grupę porównawczą stanowiło 20 przypadków nowotworów łagodnych błony śluzowej jamy ustnej.

Dla wszystkich przypadków zebrano obszerne dane kliniczne i demograficzne. Część eksperymentalną przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. We wszystkich przypadkach wykonano badania immunohistochemiczne. Zbadano ekspresję całkowitego białka p53 oraz jego form p53ser15 i p53ser20 dla wszystkich przypadków. Oceniono ponadto zależności pomiędzy ekspresją tych markerów a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi nowotworów złośliwych i łagodnych. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

W przypadkach raka płaskonabłonkowego jamy ustnej obecność białka p53 wykazano w 32 na 66 co stanowi 48,5% przypadków. Białka p53ser15 i p53ser20 wykazano odpowiednio w 62 (94%) oraz 26 (39,5%) raków jamy ustnej. W przypadku nowotworów łagodnych relacje te przedstawiały się następująco: dla białka p53 dodatnie formy stanowiły 0 na 20 przypadków (0%), białka p53ser15 i p53ser20 stwierdzono odpowiednio w 20 (100%) i 2 (10%) przypadkach.

Porównując stopień ekspresji poszczególnych markerów w grupie porównawczej (nowotwory łagodne) i badanej (nowotwory złośliwe) wykazano następujące zależności. Dla białka całkowitego p53 ($p < 0,0001$) oraz p53ser20 ($p = 0,03$) wykazano znacząco wyższe wartości dla chorych z nowotworem złośliwym. Odwrotną zależność ($p < 0,0001$) stwierdzono

dla białka p53ser15, gdzie wykazano wyższe wartości z łagodną postacią choroby nowotworowej.

W przypadku białka p53ser15 wykazano istotne statystycznie zależności ze stopniem zaawansowania klinicznego raka ($p=0,011$). Brak fosforylacji lub przypadki z immunoreaktywnością p53ser15 równej lub niższej od 20% były obserwowane w zaawansowanych stadiach choroby (III i IV stopień). Wartości pośrednie (20-40%) charakteryzowały przypadki o niskim stopniu zaawansowania (I, II) choroby. 100% przypadków o zakresie immunoreaktywności na poziomie powyżej 40% był stwierdzany w nowotworach łagodnych.

Zależności istotne statystycznie stwierdzono pomiędzy zakresem immunoreaktywności dla białka p53ser15 a okresem wolnym od choroby. Chorzy z grupy, w której ekspresja p53ser15 była obecna w tkance guza w ilości powyżej 40%, charakteryzują się w częstszych czasami wolnymi od choroby w wymiarze powyżej 12 miesięcy. Grupę pacjentów, u których zakres immunoreaktywności dla p53ser15 wahał się w granicach do 40%, charakteryzowały czasy wolne od choroby krótsze niż 12 miesięcy ($p=0,00146$).

W grupie pacjentów z nowotworem złośliwym jamy ustnej wykazujących poziom ekspresji białka p53ser15 poniżej 40% wykazano znamienne częstsze ryzyko wystąpienia zgonu w 3 letnim okresie obserwacji ($p=0,05$).

Odnotowano również zależność pomiędzy ekspresją białka p53ser15 a obecnością przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych szyi. Niskie wartości białka p53ser15 (poniżej 40%) cechują grupę pacjentów z wysokim prawdopodobieństwem obecności przerzutu węzłowego w chwili rozpoznania. Wartość ekspresji p53ser15 wyższa niż 40% określa grupę chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej o znacznie niższym prawdopodobieństwie jednoczesnego posiadania przerzutu węzłowego ($p=0,014$).

W grupie pacjentów z dodatnią wartością białka p53 znamienne częściej wykrywano raka jamy ustnej o niskim (G3) stopniu zróżnicowania histopatologicznego ($p=0,041$). Dla grupy chorych, u których nie wykazano obecności całkowitego białka p53 w komórkach nowotworowych znamienne częściej wykazano obecność raka o wysokim lub średnim stopniem zróżnicowania histopatologicznego (G1 lub G2).

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że niskie wartości ekspresji białka p53ser15 wiążą się z gorszym rokowaniem, krótszym czasem wolnym od choroby, krótszym przeżyciem, wyższym stopniem zaawansowania oraz występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych w chwili rozpoznania. Takie wartości tego białka mogą świadczyć o wyjątkowej agresywności raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Białko to wydaje się być niezależnym

czynnikiem prognostycznym dla raków jamy ustnej. Brak takich zależności dla całkowitego białka p53 i p53ser20.

Na podstawie otrzymanych wyników wydaje się, że poziom ekspresji białka p53ser15 może stanowić dodatkowy parametr pomocny w planowaniu leczenia u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej. Wytypowanie grupy chorych z agresywną postacią raka jamy ustnej i wyjściowo gorszym rokowaniem może stanowić podstawę do podjęcia bardziej radykalnych i złożonych metod leczenia. Postępowanie takie najprawdopodobniej ograniczyć by mogło wystąpienie wznowy choroby w przyszłości.

ABSTRACT

Each year, around 600k patients are diagnosed with malignant head and neck cancers worldwide and around 400k of them die worldwide. The incidence rate for head and neck cancers tends to grow. The treatment results in Poland are highly unsatisfactory due to late treatment initiation.

Head and neck neoplasm (cancers) constitute around 5% of all malignant cancers registered in Poland. They occur more frequently in men than in women (7% and 1% respectively). 3200 new cases of malignant mouth and oral cancers were registered in 2012 in Poland. The number of deaths reached 1300 that year. The most frequent location of oral cancer is the tongue and the bottom of the mouth. Less frequent locations include the alveolar bone, the submandibular triangle, the cheek and the hard palate. Squamous cell cancers constitute 95% of cases.

The biological traits of oral cancer are determined by the presence of various proteins which play different roles in cells. One of the proteins which could take a prominent part in cancer diagnostics is protein p53. This protein takes part in DNA repair process and starts an apoptosis. The aforementioned processes take place only if protein p53 is active. One of the mechanisms driving the process of p53 activation and making the cell enters the path of apoptosis is phosphorylation in selected position. This protein can undergo phosphorylation within N- and C- terminal domains. Under normal conditions, protein p53 is expressed at a low level in cells.

Once the factor causing DNA damage has worked, protein p53 is phosphorylated at serine 15 and/or serine 20 within domain N. As a result, the degradation of protein p53 stops. In addition, protein p53 is activated and stabilized which leads to its high accumulation in a cell. Under normal conditions, phosphorylation of protein p53 in cell with DNA damage increases and limits the chances of cancer growth. In different types of disorders if there is no phosphorylation and activation in cells with DNA damage, the cancerous process takes place.

The aim of this paper is to discuss the immunohistochemical analysis of protein p53 occurrence and its phosphorylated forms at serine 15 and serine 20 in oral cancers as well as their connection to patients' histopathological traits and clinicopathological parameters.

Samples included tissue fragments fixed in formaldehyde and paraffin extracted from 66 patients diagnosed with malignant oral cancer. The group consisted of 43 (65%) men and

23 (35%) women. The patients were divided into three groups based on cancer location: tongue, bottom of the mouth and oral cavity. All patients had their cancer surgically removed. In some instances, depending on recommendations, certain patients had their lymph nodes removed. Certain patients also received additional treatment, e.g. radiotherapy, chemotherapy, or radiochemotherapy.

The reference group consisted of 20 cases of benign oral mucous membrane tumors.

A lot of clinical and demographic data were collected for all cases. The experiment was conducted at the Division of Pathomorphology and Oncological Cytology of the University of Wrocław. Immunohistochemical exams were conducted for all patients. Expression of protein p53 and its forms p53ser15 and p53ser20 was tested for all cases. In addition, the dependencies between these markers and selected traits of clinicopathological malignant and benign tumors were tested. The results were statistically analyzed.

In cases of plasmablastic oral cavity cancer, the presence of protein p53 was identified in 32 out of 66 cases, which translates to 48.5%. Phosphorylated forms of p53 at serine 15 and serine 20 were found in 62 (94%) and 26 (39.5%) of oral cancers respectively. In benign tumors, the results were as follows: for protein p53, positive protein forms were not identified in any of the 20 cases (0%), and phosphorylated forms of protein p53 were identified at serine 15 and serine 20 in 20 (100%) and 2 (10%) cases respectively.

While comparing the expressions of different markers within the reference group (benign cancers) and the examined group (malignant cancers), the following dependencies were noted: for protein p53 ($p < 0.0001$) and p53ser20 ($p = 0.03$) significantly higher values were recorded for patients with malignant cancers. The opposite dependencies were noted for protein p54 ser15 ($p < 0.0001$) and the values were higher for patients with benign tumors.

For protein p53ser15, significant statistical dependencies were noted in the stage of clinical advancement of cancer ($p = 0.011$). The lack of phosphorylation or cases with immunoreactivity p53ser15 equal or less than 20% were observed in advanced stages of cancer (stage III and IV). Average values (20-40%) were cases characterized by early stages of cancer (I and II). 100% of cases where the level of immunoreactivity was higher than 40% were benign tumors.

Statistically significant dependencies were noted between the level of immunoreactivity for p53ser15 and disease-free time. Patients from the group where protein p53ser15 expression was found in cancer tissue in the amount greater than 40% tended to be disease-free time for more than 12 months. Patients whose level of immunoreactivity for p53ser15 was up to 40% were disease-free time for less than 12 months ($p = 0.00146$)

A significantly higher risk of death during the 3-year observation ($p=0.05$) was noted in patients with malignant oral cancer who had expression of protein p15ser15 below 40%. Dependence between expression of protein p53ser15 and the presence of metastasis was noted. Low levels of protein p53ser15 (below 40%) are characteristic for patients with high probability of metastasis. The value of expression of p53ser15 greater than 40% is characteristic for patients suffering from squamous oral cancer with lower probability of metastasis ($p=0.014$).

Patients with positive value of protein p53 were more likely to be diagnosed with oral cancer with a low (G3) level of histopathological differences ($p=0.041$). The lack of protein p53 in cancerous cells was linked to cancer with high or medium level of histopathological differences.

The analysis performed showed that lower values of protein p53ser15 expression are related to less favorable diagnosis, shorter disease-free time, shorter life expectancy and higher chances of advancement and metastasis. Lower values of protein can also mean that the squamous oral cancer is aggressive. Protein seems to be an independent prognostic factor for oral cancers. There are no such dependencies for p53ser20.

Based on the results, the level of expression of protein p53ser15 may be used as an additional parameter that would help to improve the treatment planning process for patients suffering from squamous oral cancer. Identification of the patients with unfavorable prognosis can help to take more complex and radical treatment measures. This approach could potentially increase the number of patients with better prognosis.