

Artykuły przeglądowe • Review articles

Niestabilność mikrosatelitarna w raku płuca

Liliana Krasieńska

Uważa się, że zaburzenia molekularne odgrywają zasadniczą rolę w patogenezie raka płuca. Najlepiej dotychczas poznanymi zmianami są mutacje w obrębie genów supresorowych, protoonkogenów oraz zaburzenia działania białek regulujących procesy apoptozy i naprawy DNA. Szereg badań przeprowadzonych w ostatniej dekadzie wykazało, że w raku jelita grubego z wysoką częstością występują zaburzenia w działaniu produktów genów grupy MMR (mismatch repair genes), w tym hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1 i hPMS2, zaangażowanych w naprawę błędów powstających w czasie replikacji DNA. Efektem tych zmian jest występowanie niestabilności mikrosatelitarnej (MSI). Nieprawidłowość tę stwierdzono następnie w innych nowotworach, w tym także w raku płuca. Kolejne lata badań pozwoliły lepiej poznać zmiany molekularne występujące w obrębie genów MMR oraz ich ekspresję w tym nowotworze. Zwrócono uwagę na znaczenie kliniczne MSI oraz związek z patologicznymi cechami raka płuca. Stwierdzono także, że MSI wiąże się z podwyższoną częstością występowania innych mutacji, charakterystycznych dla raka płuca. W ostatnich latach wykryto występowanie zmian MSI typowych dla komórek nowotworowych w DNA płynów ustrojowych, co stwarza nadzieję rozwoju nowych metod przesiewowych.

Microsatellite instability in lung cancer

Molecular alterations are considered a key factor in lung cancer pathogenesis. Mutations in suppressor genes and protooncogenes, as well as the malfunction of proteins involved in apoptosis and DNA repair regulation, are among the most widely studied. During the recent decades numerous investigations in colorectal cancer have reported a high frequency of defective functioning of mismatch repair gene (MMR) products, such as hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1 and hPMS2, involved in DNA replication error repair. These alterations result in microsatellite instability (MSI). It has been later reported that MSI occur also in other tumors, including lung cancer. Further studies have analysed genetic alterations and expression of MMR genes in this malignancy. The correlation between MSI and clinical and pathologic features of lung cancer has been studied. It was demonstrated that MSI is associated with a higher rate of other mutations characteristic of lung cancer. Recent studies have demonstrated that MSI is detectable in soluble DNA derived from body fluids thus creating prospects for its use in the early detection of lung cancer.

Słowa kluczowe: niestabilność mikrosatelitarna, rak płuca

Key words: microsatellite instability, lung cancer

Wstęp

Rak płuca jest w skali całego świata jednym z najczęstszych i jednocześnie obarczonych największą umieralnością nowotworów złośliwych. W Polsce wskaźniki zachorowań utrzymują się od kilku lat na wyższym poziomie w porównaniu ze średnią światową – rocznie notuje się około 17.000 nowych zachorowań na raka płuca u mężczyzn i około 4.000 u kobiet [1].

Rozwój biologii molekularnej umożliwił lepsze poznanie genetycznych i epigenetycznych zaburzeń w przebiegu kancerogenezy. Uważa się, że zaburzenia te odgrywają zasadniczą rolę w patogenezie nowotworów. Najle-

piej dotychczas poznanymi zmianami są mutacje genów supresorowych (*p53*, *FHIT*, *P16INK4/MST1*), protoonkogenów (*EGFR*, *HER2/neu*) oraz genów regulujących procesy apoptozy (*Bcl2*). W ostatnich latach zwraca się uwagę na znaczenie zaburzeń naprawy DNA. Skutkiem tych nieprawidłowości może być zaburzenie wierności odtwarzania genomu.

W niniejszej pracy przedstawiono stan wiedzy dotyczący tego zagadnienia, ze szczególnym uwzględnieniem klinicznego znaczenia niestabilności mikrosatelitarnej w raku płuca.

Co to jest niestabilność mikrosatelitarna?

Niestabilność mikrosatelitarna (*microsatellite instability* – MSI) odpowiada zmianom długości krótkich, polimorficznych, tandemowo powtarzających się sekwencji DNA

(mikrosatelitów), losowo rozsianych w ludzkim genomie. Zaburzenie to związane jest z mutacjami w określonych genach naprawczych DNA, a obserwowane jest zarówno w nowotworach występujących rodzinnie, jak i sporadycznie. MSI wynika z inaktywacji obu alleli genu naprawczego DNA. W nowotworach występujących rodzinnie dziedziczona jest mutacja jednego z alleli genu naprawczego DNA; do MSI dochodzi po utracie aktywności drugiego allelu w tym samym locus. W nowotworach sporadycznych dochodzi do somatycznego unieczynnienia obu alleli w locus genu odpowiedzialnego za naprawę DNA. MSI związana jest z nieprawidłową czynnością genów naprawy DNA typu *mismatch repair* (MMR). Produkty genów MMR rozpoznają i naprawiają błędy powstałe podczas replikacji DNA, zapobiegając w ten sposób gromadzeniu się zmian sekwencji w komórkach potomnych. Dotychczas u ludzi poznano sześć genów naprawy DNA typu MMR: 3 homologi bakteryjnego genu *MutS* (*hMSH2*, *hMSH3* i *hMSH6*) oraz 3 homologi bakteryjnego genu *MutL* (*hMLH1*, *hPMS1* i *hPMS2*). Inaktywacja systemu naprawy DNA typu *mismatch repair* może prowadzić do niestabilności genomu, zwiększenia częstości występowania przypadkowych mutacji oraz do mutacji w genach biorących udział w karcinogenezie, w obrębie których występują sekwencje mikrosatelitarne. Obserwowano m.in. somatyczne mutacje w sekwencjach mikrosatelitarnych w obrębie *IGFIIIR* (*insulin-like growth factor II receptor*) w guzach trzonu macicy, żołądka i jelita grubego MSI+ [2, 3]. W rakach jelita grubego MSI+ stwierdzono mutacje obu alleli genu *BAX*, biorącego udział w apoptozie oraz w genie *TGFβIIIR* (receptor typu II *transforming growth factor*, będącego inhibitorem wzrostu komórek nabłonkowych) [4, 5]. W raku jelita grubego nie obserwowano związku MSI z występowaniem mutacji w genie supresorowym *p53*, jednakże równoczesna obecność obu tych zmian genetycznych w raku wstępującej części okrężnicy związana była z przerzutami do węzłów chłonnych [6]. Istnieją także przypuszczenia, że system MMR bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, a zwiększona ekspresja białek *hMSH2* i *hMLH1* prowadzi do apoptozy [7-9].

MSI po raz pierwszy opisano i do tej pory najlepiej zbadano w rodzinnym niepolipowatym raku jelita grubego (*hereditary non-poliposus colorectal cancer* – HNPCC). W nowotworze tym MSI stwierdza się u około 90% chorych [6, 10, 11]. W sporadycznie występujących nowotworach jelita grubego MSI występuje z mniejszą częstością (13-28%) [6, 10]. W przypadku innych nowotworów skojarzonych z HNPCC, opisywanych jako zespół Lynch II, stwierdzono wyższą częstość MSI w rakach trzustki (67-75%), żołądka (17-48%), trzonu macicy (9-23%) i stercza (15-20%). MSI występuje także w wielu innych nowotworach (nowotworach mózgu, raku żołądka, jajnika, trzonu i szyjki macicy, piersi, płuca, skóry, stercza, pęcherza moczowego i chłoniakach) [10, 12].

Pod koniec 1997 roku z inicjatywy amerykańskiego Narodowego Instytutu Onkologii (NCI) ujednociono nomenklaturę oraz opracowano kryteria rozpoznawania MSI w raku jelita grubego. Wyniki zostały podsumowane

i opublikowane przez Bolanda i wsp. w 1998 roku [12]. Zalecany przez NCI panel markerów składa się z dwóch mononukleotydowych (BAT26 i BAT25) oraz trzech dinukleotydowych powtórzeń (D5S346, D2S123 i D17S256). Guzy wykazujące niestabilność w dwu lub więcej markerach spośród tego panelu określa się jako nowotwory o wysokiej częstości MSI (MSI-H), natomiast te, w których stwierdza się niestabilność w tylko jednym lub żadnym z markerów – jako, odpowiednio, guzy z niską częstością MSI (MSI-L) lub nie wykazujące MSI (*microsatellite stable* – MSS). Ten zestaw markerów referencyjnych pozwala wykryć nowotwory charakteryzujące się nieprawidłowościami pierwotnie w obrębie dwóch głównych genów MMR: *hMSH2* i *hMLH1* [11]. W przypadku, gdy w badaniu zostaje użytych ponad pięć markerów, grupę MSI-H stanowią nowotwory wykazujące MSI w $\geq 30\%$ markerów, a grupę MSI-L – gdy MSI stwierdza się w $<30\%$ badanych markerów.

W licznych badaniach potwierdzono, że wśród nowotworów zlokalizowanych poza jelitem grubym można wyodrębnić dwie grupy ze zwiększoną częstością MSI, w których niektóre loci wykazują szczególnie wysoką niestabilność [12]. Grupa pierwsza, dotycząca głównie raka żołądka i trzonu macicy, posiada fenotyp podobny do raka jelita grubego i wykazuje niestabilność w obrębie mono- i dinukleotydowych markerów. Druga grupa guzów wykazuje podwyższoną częstość niestabilności tylko w wybranych tri- i tetranukleotydowych powtórzeniach. Pewna grupa spośród zmian tetranukleotydowych ($AAAG$)_n szczególnie często ulega MSI, m.in. w raku płuca, pęcherza moczowego oraz głowy i szyi.

Dotychczasowe badania wykazują zależność pomiędzy MSI a obniżoną ekspresją białek MMR. W badaniach MSI w raku jelita grubego stwierdzono brak ekspresji *hMSH2* i *hMLH1* w guzach, w których występują mutacje w tych genach. Żaden z guzów bez MSI nie wykazywał obniżonej ekspresji białek MMR. Co więcej, obniżoną ekspresję MMR stwierdzano także przy braku mutacji w genach MMR, co sugeruje, że przynajmniej w niektórych przypadkach mogą występować inne mechanizmy unieczynnijające [6, 11-15].

W licznych badaniach próbowano określić związek pomiędzy MSI, a cechami klinicznymi i histologicznymi nowotworów. W HNPCC i raku żołądka wykazano związek MSI z lokalizacją nowotworu, jego typem histologicznym oraz innymi cechami morfologicznymi [12, 16, 17]. Nieco zaskakująco, pomimo że genetyczna niestabilność powinna prowadzić do przyspieszonego nowotworzenia i złego rokowania, MSI w HNPCC oraz raku żołądka związane jest z lepszym rokowaniem i wydłużonym przeżyciem. Z kolei w raku piersi stwierdzono znacząco krótszy czas przeżycia całkowitego wśród chorych z guzami MSI+. Co więcej, guzy MSI+ były rozpoznawane w wyższym stopniu zaawansowania i częściej tworzyły przerzuty [18].

Częstość występowania oraz mechanizmy odpowiedzialne za MSI w raku płuca

Doniesienia dotyczące występowania MSI w raku płuca są nieliczne i niejednokrotnie sprzeczne. W drobnokomórkowym raku płuca (SCLC) w 45-76% guzów pierwotnych stwierdzono MSI w postaci zmniejszenia lub zwiększenia liczby powtarzających się di- lub tetranukleotydowych sekwencji [19, 20]. W niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC) częstość występowania MSI waha się w szerokich granicach (0-69%). Tak duże różnice w wynikach badań mogą być uwarunkowane wieloma czynnikami. Sugerowano na przykład, że rozbieżności w częstości występowania MSI w NSCLC mogą być związane z różnymi typami histologicznymi i różnym zaawansowaniem choroby w badanych grupach. Być może także na występowanie MSI wpływają geograficzne i/lub etniczne czynniki. Ponadto, odmienne wyniki mogą wynikać z różnic w rodzaju i liczbie analizowanych primerów, jak również z różnic w definiowaniu MSI w poszczególnych badaniach. Do tej pory bowiem nie ustalono, jakie powinny być kryteria rozpoznawania MSI w raku płuca. Opublikowane w 1998 roku przez Bolanda i wsp. [12] międzynarodowe kryteria dotyczące nazewnictwa i rozpoznawania MSI dotyczą tylko raka jelita grubego. Dotychczas nie opracowano podobnego referencyjnego panelu markerów, pozwalających jednoznacznie rozpoznawać MSI w innych nowotworach, w tym również w raku płuca. W ostatnich pięciu latach wiele laboratoriów opracowało własne sposoby określania MSI w raku płuca, co powoduje, że porównanie wyników różnych grup badawczych jest niezwykle trudnym zadaniem. Tabela 1. stanowi próbę przedstawienia wyników dotychczasowych badań MSI w raku płuca, ze zwróceniem uwagi na zastosowane markery oraz kryteria definiowania MSI.

Ciekawą analizę przeprowadzili Ahrendt i wsp. [21, 22]. Zbadali oni występowanie nowych alleli w sekwencjach mikrosatelitarnych w NSCLC przy użyciu 73 4-nukleotydowych markerów w celu określenia loci często ulegających niestabilności w raku płuca. Zidentyfikowano panel 12 markerów, przy użyciu których można było wykryć niestabilność mikrosatelitarną przynajmniej w jednym z badanych loci wśród 55% pierwotnych guzów. Następnie przeprowadzono analizę sekwencji mikrosatelitarnych w 88 guzach płuca. W 35% spośród nich wykazano nowy allel z przynajmniej jednym spośród badanych 13 markerów (do wybranych 12 dodano jeszcze jeden, który w innych badaniach odznaczał się częstą niestabilnością w raku płuca), a 29% z tych nowotworów miało zmiany w dwu i więcej loci. Następnie wszystkie te nowotwory były badane przy użyciu zdefiniowanego przez Bolanda i wsp. [12] referencyjnego panelu jedno- i dwunukleotydowych markerów. Tylko jeden spośród 31 MSI+ guzów (3%) wykazał niestabilność z jednym markerem (MSI-L). Ahrendt i wsp. [23] powtórzyli ostatnio analizę, wybierając 12 czteronukleotydowych markerów spośród 61 badanych; 11 z 12 wybranych zawierało powtarzającą się sekwencję AAAG. Za ich pomocą stwierdzono zmiany w sekwencjach mikrosatelitarnych w 51% guzach NSCLC, 56%

nowotworach regionu głowy i szyi oraz tylko w 21% raków pęcherza i 12% raków nerki.

Prace Ahrendt i wsp. [21, 22, 23] skupiają się na opisanej klinicznie i genetycznie, a występującej w raku płuca i innych nowotworach (rakach głowy i szyi oraz pęcherza i dróg moczowych) swoistej formie MSI, w której zmiany mikrosatelitarne zlokalizowane są w wybranych 3- i 4-nukleotydowych powtórzeniach. W tych nowotworach powtórzenia dłuższe wykazują zmiany częściej niż 1- i 2-nukleotydowe, które są charakterystyczne dla nowotworów jelita grubego i rodziny nowotworów związanych z HNPCC. Tę swoistą odmianę MSI nazwano EMAST (*elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*). Badania wskazują, że w pierwotnym raku płuca występuje binominalny rozkład niestabilności w 3- i 4-nukleotydowych powtórzeniach. Mały szczyt guzów wykazuje całkowitą częstość tego zaburzenia rzędu >10% w pewnych, najbardziej wrażliwych markerach, podczas gdy dla większości guzów płuca istnieje duży szczyt w obrębie 0-2% wrażliwych powtórzeń [12].

Mimo, że zaburzenia genetyczne, leżące u podstaw MSI, związane z nieprawidłową naprawą DNA typu *mismatch repair* są coraz lepiej poznane, mechanizm powstawania niestabilności mikrosatelitarnej typu EMAST pozostaje nadal niewyjaśniony. Niepokrywanie się rozległych zmian MSI z EMAST sugeruje udział innej drogi niż zaburzenia w systemie MMR. Uważa się, że zmiany EMAST mogą być związane z uszkodzeniem szlaków naprawy zależnych od *p53*. Białko *p53* odgrywa ważną rolę w odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA. Jego nagromadzenie w komórce prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w celu zapobieżenia replikacji uszkodzonego DNA, a kiedy DNA nie ulega naprawie, może prowadzić do apoptozy takiej komórki. Gen *p53* często ulega mutacjom w raku płuca. Podobnie do guzów EMAST, mutacje genu *p53* częściej występują w płaskonabłonkowym niż gruczolowym raku płuca. Wykazano częstsze występowanie EMAST w guzach zawierających nieprawidłowy gen *p53* [22].

Równocześnie, wyniki ostatnich badań zmieniły także wcześniejsze poglądy na temat roli genów MMR. Wykazano bowiem, że nadekspresja *hMSH2* i *hMLH1* prowadzi do apoptozy, zarówno w komórkach zdolnych do naprawy DNA, jak i z uszkodzonymi mechanizmami naprawczymi [9]. Mierząc ekspresję białek *hMSH2* i *hMLH1*, nie stwierdzono istotnych zmian w ich poziomach w przebiegu cyklu komórkowego [7]. Sugerowałoby to, że białka MMR odgrywają ważną rolę w ochronie komórki przed skutkami błędów w replikacji oraz prawdopodobnie uszkodzeniem DNA. Równocześnie, wywoływanie apoptozy w wyniku nadekspresji *hMSH2* i *hMLH1* wskazuje na ich podobieństwo raczej do genów supresorowych, takich jak *APC* czy *p53*, niż genów naprawy DNA. Wyniki tych badań pokrywałyby się z wcześniej stwierdzoną względną opornością niedrobnokomórkowych raków płuca na napromienianie oraz na niektóre cytostatyki (cisplatynę, doksorubicynę i etopozyd), co sugerowałoby udział genów MMR w aktywacji ścieżek, przekazujących sygnał do apoptozy

Tab. I. Charakterystyka dotyczyca przeprowadzonych badań MSI w raku płuca

Autor [pismienictwo]	n	Stopecn zaawansowania	No badanych loci	1-n*	2-n	3-n	4-n	% guzow MSI+ w ≥1 loci	% guzow MSI+ w ≥2 loci	Najczestsze loci MSI+	Związek z innymi mutacjami/ cechami klinicznymi
Shridhar [37]	38	np**	16	np				34%	np		Związek z innymi mutacjami <i>K-ras</i> i <i>p53</i>
Fong [30]	108	I-III	6	1	4	-	1	65%	1%		Związek MSI z mutacjami <i>K-ras</i> i <i>p53</i>
Adachi [29]	57p 35m#	I-IV	11	np				29%	np	D3S1284 D14S78 D9S162 D8S167	MSI częsciej w III i IV st. zaawansowania Związek MSI z LOH w 3p i 18q
Ryberg [32]	137	np	5	-	4	1	-	21%	5%	AR (Xq12)	
Miozzo [31]	53	I-III	4	-	2	1	1	32%	8%	AR(Xq11) D3S1351	Bez związku z mutacjami <i>p53</i>
Rosell [28]	35	I	8	np				69%	np		Związek MSI ze zlym rokowaniem
Pifarre [38]	64	I-III	np	-	wszystkie	-	-	66%	np		Związek MSI ze zlym rokowaniem Bez związku z mutacjami <i>p53</i> i <i>K-ras</i>
Pylkkanen [39]	93	np	16	-	16	-	-	0%	0%		LOH w 28%, najczęsciej w 3p
Sozzi [26]	87	I-III	4	-	3	-	1	56%	np	FHIT (3p) D21S1245	MSI częsciej u męczyzn i SQC
Ahrendt [21]	50	I-III	15	-	-	-	15	46%	np	L17686 D20S82	
Caligo [40]	52	np	6	np				35%	np		Bez związku z mutacjami <i>p53</i> Brak MSI w <i>TGFbetaRII</i> , <i>BAX</i> , <i>IGF1IR</i>
Chang [25]	68	I-IV	8	-	8	-	-	np	41% ^x	D13S170 D9S162 D17S786	Związek MSI z małymi delecjami w <i>p53</i>
Zhou [27]	91	I	6	np				3p-14% 9p-25% 10p-35%	np	D10S198 D10S192	MSI w 10p24- niezalezny niekorzystny czynnik rokowniczy MSI częsciej w SQC
Ahrendt [22]	88	I-III	13	-	-	-	13	35%	10%	L17686 D20S82	Związek EMAS T z mutacjami <i>p53</i> EMAS T częsciej w SQC
Xu [23]	47	np	12	-	-	-	12	51%	np		

*x - liczba nukleotydow w sekwencji markera

**np - nie podano

p - nowotwory pierwotne, m- guzy przerzutowe

%41% w > 3 markerach

po rozpoznaniu uszkodzenia DNA lub adduktów DNA [9].

Zmiany molekularne w genach MMR

Molekularne zmiany w jednym lub obu genach (*hMSH2* i *hMLH1*) stwierdza się w znacznej części HNPCC oraz, nieco rzadziej, w sporadycznie występujących rakach jelita grubego. Obserwuje się m.in. utratę heterozygotyczności (LOH) w obrębie loci genów MMR, metylację regionu promotorowego *hMLH1* i punktowe mutacje w obrębie sekwencji kodujących [10-12, 14, 24]. Analiza mutacji w obrębie genów *hMSH2* i *hMLH1* w przypadku raka płuca nie wykazała żadnych mutacji ani polimorfizmu w obszarze promotora i egzonów tych genów. Nie stwierdzono także związku pomiędzy ekspresją genów MMR, a utratą heterozygotyczności (LOH) na ramionach 3p i 2p chromosomów, w których zlokalizowane są te geny. Wykazano ponadto związek obniżonej ekspresji genu *hMLH1* i LOH w locus 3p21. Sugeruje to, że utrata jednego z alleli może być jedną z głównych przyczyn inaktywacji tego genu. Podobnego związku nie stwierdzono dla genu *hMSH2*. Wykazano natomiast ujemny związek ekspresji *hMSH2* z LOH w locus 3p, co mogłoby wskazywać na obecność genu regulatorowego dla *hMSH2* oraz na istnienie ujemnego sprzężenia zwrotnego [15].

Ekspresja genów MMR

Istnieją liczne badania potwierdzające związek występowania MSI w raku jelita grubego z obniżoną ekspresją białek *hMSH2* i *hMLH1*, odpowiadającą mutacjom stwierdzanym w genach MMR [6, 11, 12, 14-16, 24]. Mniej jest natomiast danych dotyczących tego zagadnienia w odniesieniu do raka płuca. W jednym z badań wykazano obniżoną ekspresję przynajmniej jednego z badanych białek w 82% guzów, w tym w 59% *hMLH1*, 58% *hMSH2* i w 34% przypadków obu białek [15]. Chang i wsp. [25] wykazali bliski związek pomiędzy ekspresją *hMLH1*, a występowaniem MSI. U 77% chorych z MSI nie stwierdzono ekspresji białka *hMLH1*.

Związek pomiędzy MSI, a patologicznymi i klinicznymi cechami raka płuca

W niektórych pracach stwierdzono częstsze występowanie MSI w raku płaskonabłonkowym, w porównaniu z rakiem gruczołowym. Wskazywało by to na istnienie różnic w rodzaju zmian genetycznych, prowadzących do rozwoju obu wymienionych typów histologicznych [22, 26, 27].

Rozbieżne są wyniki badań dotyczących związku pomiędzy częstością występowania MSI, a klinicznym stopniem zaawansowania raka płuca. W niektórych badaniach nie stwierdzono żadnej zależności pomiędzy wymienionymi cechami, co mogłoby sugerować wczesne pojawienie się MSI w procesie karcinogenezy [21, 28]. Niektórzy autorzy wykazali jednak znamienne częstsze występowanie tej zmiany genetycznej w guzach w III i IV stopniu zaawansowania [29]. Co więcej, zmiany te występowały czę-

ściej w guzach przerzutowych, w porównaniu z guzami pierwotnymi. W badaniu Adachi i wsp. [29] poddano analizie 10 par guza pierwotnego i odpowiadającego mu przerzutu. W 4 z par zarówno guz pierwotny, jak i przerzut, wykazywały MSI w tych samych loci, co wskazywałoby, że MSI pojawiła się wcześniej w procesie wzrostu guza pierwotnego i że komórki nowotworowe z MSI były tymi, które dały przerzuty. W 2 przypadkach w przerzutach stwierdzono MSI, której nie obserwowano w guzach pierwotnych. Wskazywało by to, że MSI musiała pojawić się późno w przebiegu progresji guza pierwotnego lub już w komórkach przerzutowych. Z badania tego wynika, że zmiany typu MSI gromadzą się w trakcie progresji NSCLC oraz że fenotyp MSI jest potencjalnym markerem złośliwości klinicznej NSCLC.

Związek zmian w systemie MMR z bardziej agresywnym fenotypem płaskonabłonkowego raka płuca wykazali Xinarianos i wsp. [15]. Obniżona ekspresja genu *hMLH1* (ale nie *hMSH2*) związana była z przerzutami do węzłów chłonnych. W badaniu tym obniżona ekspresja *hMLH1* miała także związek zarówno z liczbą papierosów wypalanych dziennie, jak i w ciągu całego życia. Sugerowałoby to wpływ karcynogenów dymu tytoniowego na unieczynnienie *hMLH1* oraz możliwość addytywnego działania obu tych czynników. Wynik ten wydaje się potwierdzać wysunięte poprzednio przypuszczenia, że czynniki środowiskowe biorą udział w powstawaniu niektórych zmian mikrosatelitarnych. Zwrócono zwłaszcza uwagę na prowadzące do MSI uszkodzenia DNA przez wolne rodniki tlenowe i addukty lipidowe. Sugeruje się udział palenia i diety w tym procesie. Narażenie na te czynniki może samodzielnie lub łącznie ze zmianami w ścieżkach naprawy DNA prowadzić do swoistych fenotypów w różnych rodzajach nowotworów [12].

Związek MSI z innymi mutacjami

W badaniach nad zmianami genetycznymi typu MSI w raku płuca próbowano określić ich związek z mutacjami genu *p53*, częstymi w tym nowotworze. Podobnie do MSI, mutacje genu *p53* występują częściej w płaskonabłonkowym raku płuca, w porównaniu z rakiem gruczołowym. W badaniu Ahrendt i wsp. [22] mutacje genu *p53* występowały w 81% guzów MSI+ i tylko w 44% guzów MSI-. Wyższą częstość mutacji genu *p53* w guzach MSI+ wykazali także inni autorzy [25, 30]. Z kolei Miozzo i wsp. [31] w swoim badaniu nie zaobserwowali zależności pomiędzy MSI, a nadmierną ekspresją białka *p53*. Współwystępowanie MSI i mutacji genu *p53* może skłaniać do wysunięcia dwóch różnych wniosków. Z jednej strony brak możliwości odroczenia podziału komórki i naprawy DNA, na skutek utraty funkcji supresorowego białka *p53*, zwiększa prawdopodobieństwo, że nie dojdzie do naprawy DNA uszkodzonego podczas replikacji. Może to prowadzić do proliferacji genetycznie zmienionych komórek. Alternatywna hipoteza zakłada, że zwiększona częstość zmian w sekwencjach mikrosatelitarnych, występujących w obrębie genów kontrolujących cykl komórkowy, może ułatwiać wzrost komórek ze zmutowanym genem *p53*.

Badano także związek MSI z innymi mutacjami. Wykazano m.in. zwiększoną częstość mutacji genu *K-ras*, utratę alleli na chromosomach 3p i 18q (do akumulacji tych zaburzeń dochodzi wraz z progresją NSCLC) i obecność rzadkich alleli w locus *H-ras1 VNTR* (*variable number of tandem repeats*) [29, 30, 32].

Wykorzystanie MSI w rozpoznawaniu raka płuca

Chirurgiczne leczenie wczesnego raka płuca pozwala uzyskać 60-80% 5-letnich przeżyć [33]. Na ogół jednak chorzy zgłaszają się w zaawansowanych, nieoperacyjnych stadiach choroby. Pomimo znacznej częstości zachorowań i zgonów z powodu raka płuca, nie istnieją skuteczne testy przesiewowe wśród grup wysokiego ryzyka. Tradycyjne metody, oparte na konwencjonalnej cytologii płwociny i zdjęciach radiologicznych klatki piersiowej, okazały się nieskuteczne w obniżeniu umieralności z powodu raka płuca. Większe możliwości w tej dziedzinie stwarza spiralna tomografia komputerowa, ale z uwagi na wysoki koszt tej metody, możliwości jej zastosowania w badaniach masowych są ograniczone.

Analiza mikrosatelitarna może się okazać ważną i względnie łatwą alternatywą w wykrywaniu nowotworów. W przeciwieństwie do konieczności zastosowania specyficznych wskaźników dla określenia mutacji w obrębie onkogenów (np. genu *p53* czy *ras*), ta zmiana molekularna jest łatwo rozpoznawana przy użyciu jednego zestawu primerów dla wszystkich próbek. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych od kilku lat służy wykrywaniu zmian genetycznych w różnych nowotworach. Opisuje się dwa rodzaje zmian mikrosatelitarnych: utratę heterozygotyczności (LOH) oraz niestabilność, przy czym MSI jest łatwiejsza do wykrycia w materiale biologicznym niż subtelne różnice, na podstawie których stwierdza się LOH [22]. MSI jest obecna tylko w komórkach nowotworowych. Swoiste dla guza zmiany mikrosatelitarne zostały użyte do identyfikacji komórek nowotworowych w moczu chorych na raka pęcherza moczowego oraz w surowicy chorych na nowotwory głowy i szyi [34, 35].

W NSCLC swoiste zmiany mikrosatelitarne wykryto w płwocinie, popłuczynach z drzewa oskrzelowego (BAL – *bronchoalveolar lavage*) oraz w osoczu. Ciekawe wyniki uzyskali Miozzo i wsp. [31], którzy u 29% chorych, których nowotwór nie wykazywał MSI, stwierdzili występowanie zmian mikrosatelitarnych w nabłonku oskrzelowym, odległym od nowotworu i prawidłowym w badaniu histopatologicznym. Wskazywało by to na rozrost bezimiennych klonów komórkowych, różnych od występujących w obrębie nowotworu. Można sądzić, że rozszerzenie tego rodzaju analizy na inne oskrzela pozwoli na wykrycie klonów komórkowych, charakteryzujących się potencjałem transformacji. W badaniu przeprowadzonym przez Ahrendt i wsp. [21], zmiany mikrosatelitarne okazały się najmniej czułe spośród 4 markerów molekularnych (*p53*, *K-ras*, *p16* i MSI), analizowanych w popłuczynach z drzewa oskrzelowego. Powodem było prawdopodobnie zbyt duże zanieczyszczenie badanego płynu komórkami nienowotworowymi. Stwierdzono bowiem, że progami dla wykry-

cia MSI jest obecność 5-7% komórek nowotworowych w płynie BAL. Co więcej, badanie to okazało się najmniej pomocne w sytuacjach, w których ulepszone metody diagnostyczne są najbardziej przydatne – u chorych z małymi, obwodowo położonymi guzami.

Ostatnie badania wykazały, że zmiany genetyczne mogą być wykrywane w DNA, krążącym w osoczu lub surowicy chorych z różnymi nowotworami (m.in. SCLC, jelita grubego, trzustki, głowy i szyi) [34, 35]. Sozzi i wsp. [26] przeprowadzili badanie częstości i rozległości zmian mikrosatelitarnych w DNA osocza chorych, z ograniczoną postacią NSCLC. U 61% chorych zmianom MSI w komórkach nowotworowych towarzyszyły zmiany w DNA osocza i w większości przypadków były one takie same. Ponadto u pięciu chorych wykazano MSI w DNA osocza, podczas gdy zmian tych nie było w guzie. Wyniki te stwarzają perspektywy wykorzystania analizy MSI w praktyce klinicznej. Jeśli rzeczywiście zmiany w DNA osocza występują często w I i II stopniu zaawansowania NSCLC (kiedy choroba jest potencjalnie uleczalna), a równocześnie ilość DNA, uwalnianego z nowotworu, jest w osoczu wybiórczo zwiększona, analiza genetyczna takiego DNA mogłaby być użyta w celach diagnostycznych i przesiewowych.

Podsumowanie

Niestabilność mikrosatelitarna jest częstym zjawiskiem w raku płuca, jednak rola biologiczna tego zaburzenia, jak również jej związek z cechami klinicznymi oraz innymi nieprawidłowościami genetycznymi wymaga dalszych badań. Obiecująca wydaje się możliwość zastosowania testów wykrywających MSI w badaniach przesiewowych i w rozpoznawaniu raka płuca.

Lek. med. Liliana Krasińska
Klinika Onkologii i Radioterapii
Akademii Medycznej
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

Piśmiennictwo

1. Zatoński W, Tyczyński J. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 roku*. Warszawa: Centrum Onkologii – Instytut im. M.Skłodowskiej-Curie, Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów; 1999.
2. Ouyang H, Shiwaku H, Hagiwara H et al. The Insulin-like Growth Factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach and colorectum. *Cancer Res* 1997; 57: 1851-1854.
3. Caligo M, Ghimentri C, Marchetti A et al. Microsatellite alterations and p53, TGFbetaRII, IGFIIIR and BAX mutations in sporadic non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 78: 606-609.
4. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y et al. Somatic Frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-969.
5. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al. Inactivation of the type II TGF-(receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338
6. Leonart M, Garcia-Foncillas J, Sanchez-Prieto R et al. and Ramon y Cajal S. Microsatellite instability and mutations in sporadic right and left colon carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 889-895.

7. Mayers M, Theodosiou M, Acharya et al. Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1 and hPMS2. *Cancer Res* 1997; 57: 206-208.
8. Gradiš S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 1997; 91: 995-1005.
9. Zhang H, Richards B, Wilson T et al. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 and hMLH1. *Cancer Res* 1999; 59: 3021-3027
10. Arzimanoglou I, Gilbert F, Barber H. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-1819.
11. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-4756.
12. Boland C, Thibodeau S, Hamilton S et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.
13. Curia M, Palmirotta R, Aceto G et al. Unbalanced germ-line expression of hMLH1 and hMSH2 alleles in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1991; 39: 3570-3575.
14. Thibodeau S, French A, Roche P et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56: 4836-4840.
15. Xinarianos G, Liloglou T, Prime W et al. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4216-4221.
16. Dos Santos NR, Seruca R, Constancia M et al. Microsatellite Instability at Multiple Loci in Gastric Carcinoma: Clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 38-44.
17. Ottini L, Palli D, Falchetti M et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. *Cancer Res* 1997; 57: 4523-4529.
18. Paulson T, Wright F, Parker B et al. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4021-4026.
19. Merlo A, Mabry M, Gabrielson E et al. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2098-2101.
20. Chen X, Stroun M, Magnenat J et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Genet* 1996; 2: 1033-1037.
21. Ahrendt S, Chow J, Yang S et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-339.
22. Ahrendt S, Decker P, Doffek K et al. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2488-2491.
23. Xu L, Chow J, Bonacum J et al. Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. *Int J Cancer* 2001; 91: 200-204.
24. Leach F, Polyak K, Burrell M et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 235-240.
25. Chang J, Chen Y, Chen C et al. Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1639-1646
26. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C et al. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2689-2692.
27. Zhou X, Kemp BL, Khuri FR et al. Prognostic implication of microsatellite alteration profiles in early stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 559-565
28. Rosell R, Pifarre A, Monzo M et al. Reduced survival in patients with stage I non-small cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *Int J Cancer* 1997; 74: 330-334.
29. Adachi J, Shiseki M, Okazaki T et al. Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes Chromosom. Cancer* 1995; 14: 301-306.
30. Fong K, Zimmerman P, Smith P. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 28-30.
31. Miozzo M, Sozzi G, Musso K et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56: 2285-2288.
32. Ryberg D, Lindstedt B, Zienolddiny S et al. A hereditary genetic marker closely associated with microsatellite instability in lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3996-3999.
33. Pazdur R, Coia L, Hoskins W, Wagman L. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. Medical, surgical and radiation oncology. Inc. Melville, NY PRR; 1999.
34. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 1035-1037.
35. Mao L, Schoenberg M, Scicchitano M et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271: 659-662.
36. Sidransky D. Nucleic acid- based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; 278: 1054-1058.
37. Shridhar V, Siegfried J, Hunt J et al. Genetic instability of microsatellite sequences in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 2084-2087.
38. Pifarre A, Rosell R, Monzo M et al. Prognostic value of replication errors on chromosomes 2p and 3p in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 75: 184-189.
39. Pulkkaenen L, Karjalainen A, Anttila S et al. No evidence of microsatellite instability but frequent loss of heterozygosity in primary resected lung cancer. *Environ. Mol Mutagen* 1997; 30: 217-223.
40. Caligo MA, Ghimentoni C, Marchetti A et al. Microsatellite alterations and p53, TGFbetaR2, IGFIIR and BAX mutations in sporadic non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 78: 606-609

Otrzymano: 23 lipca 2001 r.

Przyjęto do druku: 2 stycznia 2002 r.