

ARTUR WRÓBEL-ROZTROPIŃSKI

**OCENA EKSPRESJI GENÓW BIAŁEK MACIERZY
ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ METALOPROTEINAZ MMP-2,
MMP-7, MMP-9 ORAZ ICH TKANKOWEGO INHIBITORA
TIMP-2 U CHORYCH NA RAKA JAMY USTNEJ I GARDŁA**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Magdalena Józefowicz-Korczyńska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Bogna Zielińska – Kaźmierska

ZAKŁAD UKŁADU RÓWNOWAGI

I KATEDRA OTOLARYNGOLOGII

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

ŁÓDŹ 2022

1.STRESZCZENIE

Rak jamy ustnej i gardła charakteryzuje się szybką progresją i związanym z tym niekorzystnym rokowaniem. Wraz z zaawansowaniem procesu nowotworowego leczenie chirurgiczne pacjentów skutkuje znacznymi deformacjami w obrębie tkanek miękkich twarzy i kości części twarzowej czaszki, jak również powoduje znaczne zaburzenia funkcji narządu mowy i żucia. Wpływa to na obniżenie jakości życia pacjentów jak również na ich wycofanie się z relacji społecznych. Udowodniono, że wzrost i inwazja guzów nowotworowych zależą od równowagi między czynnikami wpływającymi na degradację i podtrzymanie otaczających tkanek. Za rozkład macierzy pozakomórkowej odpowiedzialne są enzymy proteolityczne, wśród których szczególną rolę wydają się odgrywać metaloproteinazy. Zdobywanie wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych i mechanizmów molekularnych leżących u podłoża choroby nowotworowej może być pomocne w indywidualizacji rokowania a także wyborze najkorzystniejszej metody leczenia zarówno podstawowego jak i uzupełniającego u chorych na raka jamy ustnej.

Cele:

1. Analiza ekspresji genów metaloproteinaz: MMP-2, MMP-7, MMP-9 oraz ich inhibitora TIMP-2 na poziomie mRNA u chorych na raka jamy ustnej i gardła oraz ocena ekspresji genów na poziomie białek metaloproteinaz MMP-2, MMP-7, MMP-9 oraz ich inhibitora TIMP-2
2. Analiza wybranych polimorfizmów w genach MMP-2, MMP-7, MMP-9 i TIMP-2
3. Analiza związków między cechami kliniczno-morfologicznymi w rakach jamy ustnej i gardła a badanymi parametrami molekularnymi

Materiały i metody

Do badania włączono 40 pacjentów (5 kobiet i 35 mężczyzn) w wieku $65 \pm 8,9$ lat leczonych chirurgicznie z powodu nowotworów złośliwych jamy ustnej i gardła. Na podstawie badania klinicznego oraz badań obrazowych oceniano rozmiar guza nowotworowego, status węzłów chłonnych oraz stopień zaawansowania nowotworu oraz zbierano wywiad dotyczący danych pacjentów.

Materiał pooperacyjny poddano badaniom histopatologicznym. Dotyczyły one oceny typu nowotworu i jego stopnia zróżnicowania histologicznego. Od wszystkich pacjentów

pobrano krew oraz fragmenty zdrowych tkanek będące grupą kontrolną. Materiał badawczy został poddany analizie molekularnej.

Analiza ekspresji genów metaloproteinaz MMP-2, MMP-7, MMP-9 oraz ich inhibitora TIMP-2 na poziomie mRNA została wykonana metodą ilościową PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy od ang. polymerase chain reaction) w czasie rzeczywistym (real time PCR).

Ocena ekspresji krążących w surowicy krwi białek metaloproteinaz oraz ich inhibitora wykonana została za pomocą testu immunoenzymatycznego podwójnego wiązania - sandwich ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Badania te wykonano w dwóch grupach – u pacjentów z rozpoznaniem nowotworem złośliwym jamy ustnej lub gardła oraz w grupie kontrolnej osób zdrowych. DNA ekstrahowano z tkanki nowotworowej zgodnie ze standardową metodą kwas-guanidyna-fenol-chloroform (GTC). Zebrane wyniki poddano analizie statystycznej.

Wyniki

W badanej grupie pacjentów przeanalizowano dane epidemiologiczne. Dokonano oceny ekspresji genów metaloproteinaz MMP-2, MMP-7, MMP-9 i inhibitora TIMP-2 na poziomie mRNA, oceny stężenia ich białek, analizę wybranych polimorfizmów oraz związków między cechami kliniczno-morfologicznymi w rakach jamy ustnej i gardła a badanymi parametrami molekularnymi. Trzydziestu pacjentów (75%) zgłosiło w wywiadzie rodzinnym obciążenie genetyczne:

Najliczniejszą grupę 23 osób (57,5%) stanowiły osoby, które wypalały więcej niż 21 sztuk papierosów/dzień. Biorąc pod uwagę czas trwania nałogu, najliczniejsza grupa, 32 osoby (80%) które paliły papierosy dłużej niż 21 lat. Informacje dotyczące picia alkoholu wskazały, że 27 osób (67,5%), spożywało alkohol raz lub więcej razy w tygodniu.

U 32 pacjentów (80%) na podstawie wyniku badania histopatologicznego określono stopień złośliwości nowotworu jako G2. Była to najliczniej reprezentowana grupa chorych. U 6 osób (15%) rozpoznano nowotwór złośliwy, o stopniu złośliwości G3, a tylko u 2 chorych (5%) o stopniu G1. W badanej grupie wznowa dotyczyła 10 osób (25%).

Najliczniej rozpoznano nowotwór złośliwy języka u 26 osób (65%). Mniej liczna grupa obejmowała chorych z nowotworem złośliwym bocznej ściany gardła – 9 badanych (22,5%), a u 5 osób (12,5%) zdiagnozowano nowotwór złośliwy w innej okolicy jamy ustnej. U 19 osób rozpoznano przerzuty raka płaskonabłonkowego do węzłów chłonnych w badaniu histopatologicznym pooperacyjnego preparatu.

Podczas oceny ekspresji genów analizowanych metaloproteinaz na poziomie mRNA zaobserwowano, że ich średni poziom w tkankach nacieku nowotworowego był istotnie statystycznie wyższy niż w tkankach zdrowych, grupy kontrolnej ($p < 0.0001$). Największy średni poziom ekspresji dotyczył MMP-2 i wynosił $0,55 \text{ ng/ml} \pm 0,17$. Drugi co do wielkości średni poziom ekspresji genu w tkankach nowotworowych odnotowano dla metaloproteinazy MMP-9 – $0,27 \text{ ng/ml} \pm 0,14$. W tkankach zdrowych był on istotnie niższy i wynosił $0,14 \text{ ng/ml} \pm 0,04$ ($p < 0,0001$). Dla metaloproteinazy MMP-7 średnia wartość ekspresji w tkankach pobranych z guzów i w grupie kontrolnej wynosiła odpowiednio: $0,25 \text{ ng/ml} \pm 0,06$ i $0,14 \text{ ng/ml} \pm 0,06$. Tutaj również zaobserwowano istotnie statystyczną różnicę pomiędzy poziomem ekspresji MMP-7 w tkankach z naciekiem nowotworowym i bez zmian patologicznych ($p < 0.0001$).

W przypadku tkankowego inhibitora proteinaz TIMP-2 średnie wartości ekspresji genów w tkankach pobranych z guzów nowotworowych wynosiły $0,24 \text{ ng/ml} \pm 0,08$, a w tkankach zdrowych – $0,49 \text{ ng/ml} \pm 0,16$. Odwrotnie niż w przypadku metaloproteinaz, poziom ekspresji genów dla TIMP-2 na poziomie mRNA był niższy w tkankach nacieku nowotworowego niż w tkankach zdrowych ($p < 0.0001$).

Po przeanalizowaniu średniego stężenia białek metaloproteinaz MMP-2, MMP-7, MMP-9 w grupie chorych z płaskonabłonkowymi nowotworami złośliwymi jamy ustnej i gardła okazało się, że w ich surowicy było ono istotnie statystycznie wyższe niż w surowicy osób zdrowych ($p < 0,0001$).

W grupie osób chorych najwyższe średnie stężenie metaloproteinaz zaobserwowano dla MMP-2, które wynosiło $865,83 \text{ ng/ml} \pm 238,52$. W grupie kontrolnej osób zdrowych było ono równe $483,58 \pm 94,49$ i było istotnie statystycznie niższe niż u badanych z rozpoznanym nowotworowym ($p < 0,0001$).

Średnie stężenie metaloproteinazy MMP-9 wynosiło $302,15 \text{ ng/ml} \pm 90,61$. Natomiast w surowicy osób zdrowych stężenie MMP-9 było równe $166,83 \text{ ng/ml} \pm 36,57$ ($p < 0,0001$).

Średnia wartość stężenia białek MMP-7 w surowicy chorych z nowotworami wynosiła $238,73 \pm 48,40$, a w grupie kontrolnej osób zdrowych wynosiła $148,08 \pm 38,02$. Również w tym przypadku odnotowano istotnie statystycznie różnicę pomiędzy średnim stężeniem białek MMP-7 w surowicy chorych z rozpoznanym nowotworem i w surowicy osób zdrowych ($p < 0,0001$).

Dla tkankowego inhibitora TIMP-2 średnie wartości stężenia białek dla surowicy grupy badanej i osób zdrowych wynosiły odpowiednio – $65,70 \pm 24,45$ i $129,68 \pm 77,21$. Również dla inhibitora TIMP-2 wykazano istotnie statystycznie różnicę - we krwi pacjentów

leczonych z powodu nowotworów złośliwych jego stężenie było niższe niż we krwi osób zdrowych ($p < 0,0001$).

Podczas analizy wybranych polimorfizmów w genach metaloproteinaz i ich inhibitora tkankowego nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności. Na podstawie dokonanych analiz związków między cechami kliniczno-morfologicznymi w rakach jamy ustnej i gardła a parametrami molekularnymi wykazano istnienie istotnego statystycznie ($p = 0,0238$) związku między wiekiem pacjentów włączonych do badania a ekspresją mRNA MMP-2. Wraz ze wzrostem wieku pacjentów zmniejszała się wartość mRNA MMP-2.

Istotna statystycznie okazała się również zależność między długością palenia a ekspresją mRNA MMP-2 ($p = 0,019$). Niższa wartość mRNA MMP-2 występuje w przypadku osób, które paliły papierosy dłużej niż 20 lat.

Zebrane dane wykazały, że istotny statystycznie związek występuje między liczbą przerzutów do węzłów chłonnych (parametr N) a wartością mRNA MMP-7 ($p = 0,100$). Im większą liczbę przerzutów wykryto u pacjentów, tym mniejsza była ekspresja mRNA MMP-7.

Zebrane dane wskazują także związek między płcią a białkiem MMP-7 ($p = 0,0045$). Wyższe wartości tego białka MMP-7 obserwowane są u kobiet.

Wnioski

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Stwierdzono nadmierną ekspresję genów metaloproteinaz: MMP-2, MMP-7 i MMP-9, jak również obniżoną ekspresję genów ich inhibitora TIMP-2 na poziomie mRNA oraz białek, co sugeruje ich znaczącą rolę w procesie nowotworzenia u chorych z rakiem jamy ustnej i gardła. Pomiar stężenia MMP-2, MMP-7, MMP-9 i TIMP-2 w surowicy może być pomocny w diagnozowaniu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej i gardła
2. Występowanie analizowanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach metaloproteinaz MMP-2, MMP-7, MMP-9 i ich inhibitora TIMP-2 nie było związane z występowaniem raka jamy ustnej lub gardła, a zatem świadczy to o tym, iż mogą być funkcjonalnie neutralne.
3. Wraz z zaawansowaniem procesu klinicznego poziom ekspresji genów metaloproteinaz MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 na poziomie mRNA i białka nie wzrasta. Zaobserwowano, iż wzrost liczby węzłów chłonnych z przerzutami związany jest z niższą ekspresją metaloproteinazy MMP-7 na poziomie mRNA.

2. ABSTRACT

Squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx are characterized by rapid progression and associated with unfavourable prognosis. Along with the advancement of the neoplastic process, surgical treatment of patients results in significant deformations of the soft tissues of the face and bones of the facial part of the cranium, as well as significantly disturbs the functions of the speech and chewing organs. This affects the quality of life of patients as well as it result in their withdrawal from social relations. It has been proven that the growth and invasion of neoplastic tumors depend on the balance between the factors influencing the degradation and maintenance of the surrounding tissues. Proteolytic enzymes are responsible for the decomposition of the extracellular matrix, among which metalloproteinases seem to play a special role. It seems that the obtained data will provide knowledge on the genetic determinants and understanding the molecular mechanisms underlying the neoplastic disease, and would be helpful in individualizing the prognosis and choosing the most beneficial method of both primary and adjuvant treatment in patients with oral cavity cancer.

Objectives:

1. Analysis of the expression of genes of metalloproteinases: MMP-2, MMP-7, MMP-9 and their TIMP-2 inhibitor at the mRNA level in patients with squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and evaluation of gene expression of metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9, and their inhibitor TIMP-2 at the protein level ,
2. Analysis of selected polymorphisms in MMP-2, MMP-7, MMP-9 and TIMP-2 genes
3. Analysis of the relationship between clinical and morphological features in squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and the investigated molecular parameters

Material and methods

The study included 40 patients (5 women and 35 men) aged 65 ± 8.9 years treated surgically for squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx. The clinical examination and imaging tests assessed the tumour size, lymph node status, and tumour stage. Also, the patient's data was collected.

The postoperative material was subjected to histopathological examination, where the tumour type and its degree of histological differentiation were assessed. Blood samples and healthy tissue fragments were collected from all patients. The collected materials were subjected to molecular analysis.

Analysis of the expression of genes of metalloproteinases MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-2, at the mRNA level was performed by quantitative PCR (polymerase chain reaction) in real-time (real-time PCR).

The expression of circulating proteins of metalloproteinases and their inhibitor was assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Examinations were performed in two groups - in patients with diagnosed squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and the control group of healthy people. DNA was extracted from tumour tissue according to the standard acid-guanidine-phenol-chloroform method (GTC). The collected results were analyzed statistically.

Results

Epidemiological data, were analyzed in the studied group of patients. In addition, mRNA genes expression of metalloproteinases MMP-2, MMP-7, MMP-9, and the inhibitor TIMP-2, the concentration of their proteins, the analysis of selected polymorphisms, and the relationship between clinical and morphological features in squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and the investigated molecular parameters were also performed.

Thirty patients reported a genetic burden in their family history, constituting 75% of all people. The most numerous group (23 people) were people who smoked more than 21 cigarettes a day - 57.5% of patients. Considering the duration of addiction, the most numerous group, 32 people, smoked for more than 21 years (80%). Information on drinking alcohol indicated that 27 people (67.5%) consumed alcohol once or more times a week.

In 32 patients (80%), the grade of malignancy was defined as G2 based on the histopathological examination results. It was the most numerous group of patients. The malignant neoplasm was diagnosed in 6 (15%) patients, the grade of malignancy was assessed as G3, and only in 2 patients (5%), the malignancy was classified as G1. In the studied group, recurrence occurred in 10 people, constituting 25% of all patients.

Squamous cell carcinoma of oral cavity was diagnosed most frequently (in 26 people), constituting 65% of all patients. A smaller group consisted of patients with squamous cell carcinoma of the side of pharynx - 9 subjects (22.5%) and five subjects (12.5%) were diagnosed with malignant neoplasms elsewhere in the oral cavity. Nineteen subjects were diagnosed with metastases of squamous cell carcinoma to the lymph nodes in the histopathological examination of the post-resection sample.

During the evaluation of mRNA gene expression of the analyzed metalloproteinases, it was observed that their average level in the tissues of the neoplastic infiltration was statistically significantly higher than in the healthy tissues constituting the control group ($p < 0.0001$). The

highest mean expression level was for MMP-2 and was $0.55 \text{ ng/ml} \pm 0.17$. The second-largest mean value of gene expression in neoplastic tissues was recorded for MMP-9 - $0.27 \text{ ng/ml} \pm 0.14$. In healthy tissues, it was significantly lower, and it was $0.14 \text{ ng/ml} \pm 0.04$ ($p < 0.0001$). For the MMP-7 metalloproteinase, the mean value of the expression in tissues collected from tumours and in the control group was $0.25 \text{ ng/ml} \pm 0.06$ and $0.14 \text{ ng/ml} \pm 0.06$, respectively. Here, too, a statistically significant difference was observed between the expression level of MMP-7 in tissues with neoplastic infiltration and without pathological changes ($p < 0.0001$). In the case of the TIMP-2 proteinases inhibitor, the mean values of gene expression in tissues collected from neoplastic tumours were $0.24 \text{ ng/ml} \pm 0.08$, and in healthy tissues - $0.49 \text{ ng/ml} \pm 0.16$. Contrary to the case of metalloproteinases, the level of mRNA gene expression for TIMP-2 was lower in the tissues of the neoplastic infiltration than in healthy tissues ($p < 0.0001$).

After analysing the mean concentration of the MMP-2, MMP-7, and MMP-9 metalloproteinases in the group of patients with squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, it turned out that in their serum, concentration was statistically significantly higher than that of healthy subjects ($p < 0.0001$).

In the group of patients, the highest mean concentration of metalloproteinases was observed for MMP-2, which was $865.83 \text{ ng/ml} \pm 238.52$. Also, the average concentration of this metalloproteinase among healthy people was high compared to the other analyzed protein concentrations. In the control group, it was equal to 483.58 ± 94.49 and was statistically significantly lower than in the patients diagnosed with cancer ($p < 0.0001$).

A much lower mean concentration was observed for the MMP-9 metalloproteinase. It was $302.15 \text{ ng/ml} \pm 90.61$. However, in the serum of healthy subjects, the concentration of MMP-9 was $166.83 \text{ ng/ml} \pm 36.57$. The comparison of the mean MMP-9 concentration values in group of patients with neoplasms and healthy people turned out to be statistically significant ($p < 0.0001$).

The mean concentration value of MMP-7 protein in the serum of cancer patients was 238.73 ± 48.40 , and in the control group of healthy people, it was 148.08 ± 38.02 . Also, in this case, there was a statistically significant difference between the mean concentration of MMP-7 proteins in the serum of patients with diagnosed cancer and the serum of healthy people ($p < 0.0001$).

For the tissue inhibitor TIMP-2, the mean values of protein concentration for the serum of the study group and healthy subjects were 65.70 ± 24.45 and 129.68 ± 77.21 , respectively. Also,

for the inhibitor TIMP-2, a statistically significant difference was shown. Its concentration in patients' blood was lower than in the blood of healthy people ($p < 0.0001$).

No statistically significant relationships were observed during the analysis of selected polymorphisms in the genes of metalloproteinases and their tissue inhibitor.

Based on the analysis of the relationship between the clinical and morphological features in squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and the molecular parameters, a statistically significant ($p = 0.0238$) relationship between

the age of the patients included in the study and the expression of MMP-2 mRNA was demonstrated. The value of MMP-2 mRNA decreased with the increasing age of the patients. The relationship between the duration of smoking and the expression of MMP-2 mRNA ($p = 0.019$) also turned out to be statistically significant. Lower MMP-2 mRNA values occur in people who have smoked for more than 20 years.

The collected data showed a statistically significant relationship between the number of lymph node metastases (parameter N) and the value of MMP-7 mRNA ($p = 0.100$). The greater the number of metastases detected in patients, the lower the expression of MMP-7 mRNA.

The collected data also indicate a relationship between gender and the MMP-7 protein ($p = 0.0045$). Higher values of this MMP-7 protein are observed in women.

Conclusions:

1. Overexpression of the genes of metalloproteinases: MMP-2, MMP-7 and MMP-9, as well as reduced mRNA and protein genes expression of their inhibitor TIMP-2 suggests their significant role in the neoplastic process in patients with oropharyngeal cancer. Measurement of serum concentrations of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-2 may be helpful in the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma
2. The occurrence of the analyzed single nucleotide polymorphisms in the genes of the metalloproteinases MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and their inhibitor TIMP-2 was not associated with the occurrence of squamous cell carcinoma of oral cavity and pharynx, and therefore it indicates that they may be functionally neutral.
3. With the advancement of the clinical process, the expression level of the metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 genes at the mRNA and protein level does not increase. It has been observed that the increase in the number of lymph nodes with metastases is associated with a lower expression of the MMP-7 metalloproteinase at the mRNA level.