

Larenks Kanserli Hastalarımızda K-Ras Mutasyonları

K-Ras Mutations in Laryngeal Cancer Patients

Medine Kara¹, Fevzi Sefa Dereköy¹, Oğuz Güçlü¹, Öztürk Özdemir², Fatma Silan²,
Ozan Barutçu¹, Kazım Tekin¹,

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Kliniği, Çanakkale.

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik Kliniği, Çanakkale

Özet

Bu çalışmada larenks kanserli hastaların tümöral doku spesmenlerinde baş-boyun kanserlerinin gelişiminde etkili olduğu gösterilen K-ras mutasyon analizi yapılarak bölgemizdeki frekansını tespit etmek amaçlandı.Larenks kanseri tanısı konulan 41 hastanın tümör spesmeninden alınan doku örneklerinde genetik analiz yapılarak K-ras mutasyonu araştırıldı. Sonuçlar literatür bulgularıyla tartışıldı.Vakaların 40'ı (%97,5) erkek, 1'i (%2,5) kadındı. Yaş ortalaması erkeklerde 63,5 (50-81), bayanın ise 44'tü. Yapılan genetik incelemede vakalardan birinde kodon 12 (G12A), birinde kodon 13 (G13D) olmak üzere toplam 2 vakada (%4,87) K-ras mutasyonu saptandı. Kanser oluşumunda 3 gen sınıfının (proto-onkojenler, tümör supressör genler ve DNA onarım genleri) etkisi de önemli yer tutmaktadır. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunu başlatan moleküler olaylar ras mutasyonundan başka genetik olayları da içerir. Yapılan çalışmalarda K-ras mutasyonu oranlarının çok yüksek olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Larenks kanseri, k-ras mutasyonu.

Abstract

This study aimed to complete K-ras mutation analysis, effective at indicating the development of head-neck cancers, of tumor tissue samples from patients with cancer of the larynx to determine the frequency in our region.Tissue samples obtained from tumors of 41 patients with diagnosis of larynx cancer were genetically analyzed for K-ras mutation. The results are discussed in light of information in the literature.Of patients 40 were male (97.5%) and 1 was female (2.5%). The average age of males was 63.5 years (50-81) while the female was 44. K-ras mutation was observed in 2 cases (4.87%), one at codon 12 (G12A) and one at codon 13 (G13D), during genetic investigation.During development of cancer the effects of 3 classes of gene are important (proto-oncogenes, tumor suppressor genes and DNA repair genes). Molecular events beginning squamous cell carcinoma in the head and neck include other genetic events apart from ras mutations. Studies have shown that the rate of K-ras mutations is not very high.

Key words: Laryngeal cancer,k- ras mutation.

Giriş

Dünyada her yıl ortalama 540 bin yeni olgunun saptandığı ve tüm kanserlerin %5-10'unu oluşturan baş boyun skuamöz hücreli karsinomları (BBSHK) önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir [1, 2]. Baş boyun tümörleri arasında en sık görülen kanser olan larenks kanserleri tüm malign tümörlerin %2.2'sini, baş boyun tümörlerinin ise %25'ini oluşturur. Çoğunlukla 50 yaş

üzeri erkek hastalarda görülen larenks kanserlerinin son yıllarda kadınlardaki sıklığında artış görülmektedir [3]. Sigara ve alkolün larenk kanserinin etyopatogenezindeki bilinen etkilerine ek olarak genetik yatkınlığın da sorumlu faktörler arasında yer aldığı ileri sürülmüş ve yapılan çalışmalarda hücre döngüsü kontrolü, DNA onarımı ve apoptozis ile ilgili genlerdeki

Sorumlu yazar / Corresponding Author: Medine Kara,

Adres: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kulak Burun Boğaz AD., Çanakkale.

E-posta: medinekara@gmail.com

polimorfizmlerin BBSHK riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır [4,5].

Çevresel (karsinogene maruz kalma) ve endojen (genetik) faktörler arasındaki etkileşme sonucu gelişen karsinogeneziste proto-onkojenler, tümör supresör genler ve DNA onarım genleri olmak üzere 3 gen sınıfı rol oynamaktadır [1]. Proto-onkojenler hücrede çoğalma, farklılaşma ve yaşam süresinin kontrolünü üstlenmektedir. Onkojenler ise proto-onkojenlerin mutant veya anormal ekspresyon yapan formlarıdır [3,6]. Ras gen ailesinin 3 üyesi H-ras, K-ras, ve N-ras insan tümörlerinde en sık rastlanan onkojenlerdir [7-9]. Bu çalışmada larenks kanserli hastalarda K-ras mutasyonlarının sıklığının araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 2009-2012 yılları arasında larenks kanseri tanısı konmuş ve tedavisi düzenlenmiş olan 41 vaka değerlendirildi. Klinik değerlendirmede hastaların öyküsü, yaş ve cinsiyetleri, sigara ve alkol alışkanlıkları ile fizik muayene bulguları TNM sınıflamasına göre kaydedildi. Tümör spesmenlerinden alınan dokular KRAS mutasyonu analizi için aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu.

DNA Ekstre Edilmesi: Genomik DNA üreticinin talimatlarına göre QIAquick (Qiagen, Hilden, Almanya) izolasyon kiti kullanılarak ekstre edildi. Analizler, araştırmacıların herhangi bir numunenin KRAS mutasyon durumunu bilmedikleri kör bir çalışma dizaynına göre gerçekleştirildi. Otuz tümöral doku örneği 4 pirosekanslama tekniği kullanılarak analiz edildi. Mevcut vaka-kontrol çalışmasında, PyroMark K-ras test kiti (Qiagen, Almanya) KRAS proto-onkojenin her iki kodonunun (12 ve 13) primer amplifikasyonu ve pirosekanslama için kullanıldı. Toplam olarak 20 µl PCR reaksiyon hacmi (12.5 µl PyroMark PCR ana karışım, 1 µl PCR primerleri ve 6.5 µl H₂O ve 5 µl hedef DNA), hedef genin amplifikasyonu için hazırlandı.

Aşağıdaki amplifikasyon programı kullanıldı: karışım bir başlangıç döngüsü için 95°C de 15 dakika ısıtıldı. Geri kalan 45 amplifikasyon döngüsü; 95°C de 20 saniye, 53°C de 30 saniye, 72°C de 20 saniye ve extential döngüsü için 72°C de 5 dakika idi. İlk olarak, PCR ürünü başarılı amplifikasyonu doğrulamak için %1.5 agarose jel üzerinde çalıştırıldı ve 10 µl PCR ürünleri pirosekanslama için kullanıldı. Toplam-

da 70 µl bağlayıcı karışım (2 µl streptavidin, 40 µl bağlayıcı tampon maddesi, 10 µl PCR ürünü ve 28 ml H₂O) hazırlandı ve 25 µl tavllanmış örnekler (24.2 µl tampon tavlama ve Kras kodon, 12 ve 13 için 0.8 µl dizi primerleri karışımı) dizi analizi için kullanıldı. PyroMak Q24 ve PyroMark ID yazılımı analiz sistemleri (Qiagen, Almanya) mevcut tümöral örneklerinin analizi için kullanıldı.

Şekil 1'de periferik kan ve tümöral örneklerde KRAS kodon 12 onkojeninin mutasyona uğramış ve normal pyrogram profilleri, Şekil-2'de periferik kan ve tümöral örneklerde KRAS kodon 13 onkojeninin mutasyona uğramış ve normal pirosekanslama analizi gösterilmiştir.

Çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar ve Etik Kurul Başkanlığının 19.09.2011 sayılı 63 nolu etik kurul onayı ile yapıldı.

Bulgular

Vakaların 40'ı (%97,5) erkek, 1'i (%2,5) kadındı. Yaş ortalaması erkeklerde 63,5 (50-81) iken kadın hasta 44 yaşında idi. Sigara içen hasta sayısı 40 (%97,5), alkol kullanan hasta sayısı 32 (%80) idi. 41 (%100) hastada ses kısıklığı, 10 (%23,4) hastada nefes darlığı, 7 (%17,1) hastada yutma güçlüğü vardı. Vakaların 16'sı (%39) supraglottik, 25'i (%61) glottik yerleşimli idi. 11 vaka (%26,8) T1a, 3 vaka (%7,4) T1b, 22 vaka (%53,6) T2, 5 vaka (%12,1) T3 idi. Yapılan genetik incelemede vakalardan birinde kodon 12 (G12A)'de ve birinde kodon 13 (G13D)'de olmak üzere toplam iki vakada (%4,87) K-ras mutasyonu saptandı. Tablo 1'de BBSHK vakalarımızda proto-onkojen KRAS kodon 12,13 ve 61'in mutasyona uğramış profillerinin türleri ve prevalansı gösterilmiştir.

Tartışma

Baş-boyun skuamöz hücreli kanserlerinde epitelyal karsinogenezisi onkojenler ve tümör baskılayıcı genler arasındaki dinamik denge belirler. Bu hücreli onkojenlerin (myc, ras, neu, bcl ve int gibi) anormal salınımı BBSHK gelişimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır [10].

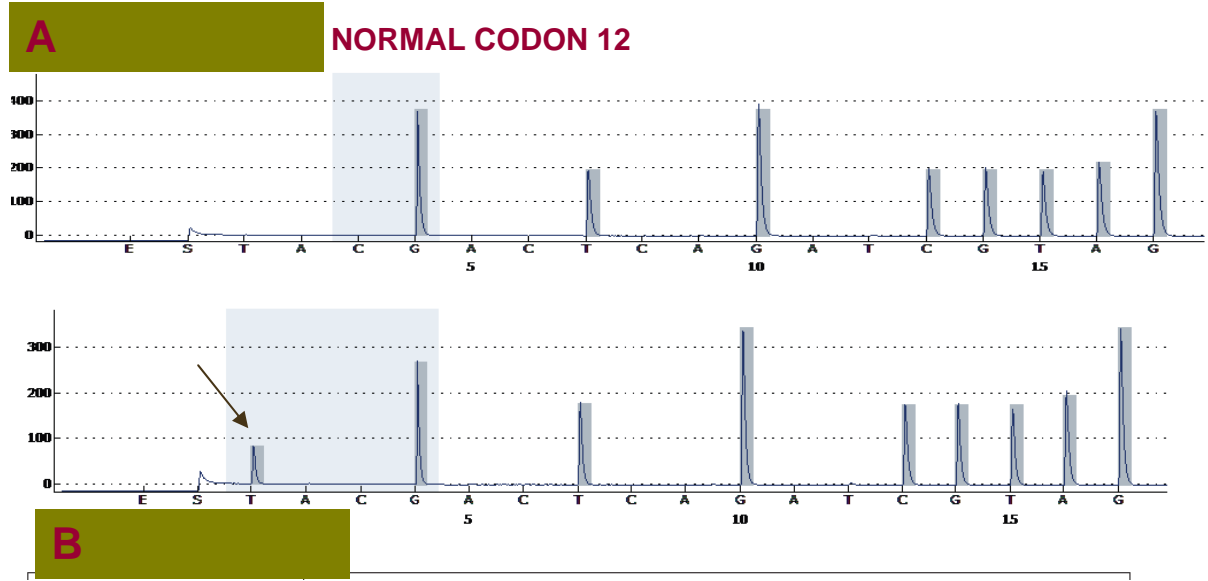
Proto-onkojenler; hücrede çoğalma, farklılaşma ve yaşam süresini kontrol eden sinyal iletiminde rol oynayan src, ras, raf vb. proteinleri kodlamaktadırlar [3, 6]. Proto-onkojenler sigara dumanı, radyasyon, kimyasal ajanlar ve virüsler gibi eksojen etkenlerle onkojen haline geçerek karsinogeneziste rol oynarlar [3, 7, 8]. Ras gen

ailesinin 3 üyesi H-ras, K-ras, ve N-ras insan tümörlerinde en sık rastlanan onkojenlerdir. Ras onkojenleri, tek amino asit değişimine neden olan nokta mutasyonlar ile pro-onkojenlerden meydana gelir. Normal bir hücre büyüme faktörü reseptörü ile uyarıldığı zaman, GDP- bağlı inaktif ras, GTP-bağlı döneme aktive olarak sitoplazmik kinazlarla çekirdeğe büyüme uyarıları gönderir. Mutant ras proteini GTP hidrolize edemediğinden, kalıcı olarak aktifleşir ve herhangi bir dış uyarı olmadan hücrenin sürekli uyarılmasına yol açar [7,11]. 12, 13 ve 61. ras gen kodonlarının mutasyonları, insanlarda görülen kanserlerde en sık saptanan tek onkojen anomalileridir [7, 8, 9]. İnsanlarda görülen tüm tümörlerin %15-30' u mutasyona uğramış ras geni türlerini içerir [11]. Farklı çalışmalarda farklı oranlar verilmiş olmakla birlikte bu genler yaklaşık olarak tüm insan malignitelerinin %15'inde, akciğer kanserlerinin %25'inde, kolon kanserlerinin %50'sinde ve pankreas kanserlerinin %90'ında tespit edilmiştir [3, 7, 8]. K-Ras mutasyonları sigara ile ilişkili kanserlerde görülmektedir ve buna bağlı olarak ta BBSHK'lerinde olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ras genindeki mutasyonların baş-boyun kanserlerinin gelişiminde de etkili olduğu ve bu etkinin daha çok K-ras ve H-ras ile olduğu, N-ras'ın etkili olmadığı gösterilmiştir [3, 12, 13]. K-ras gibi onkojen ürünleri büyüme faktör genlerinin aşırı yapımına yol açar ve böylece hücreyi transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin aşırı salınımına neden olur. Bu büyüme faktörü epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörüne bağlanarak hücre proliferasyonunu başlatır [11, 14, 15].

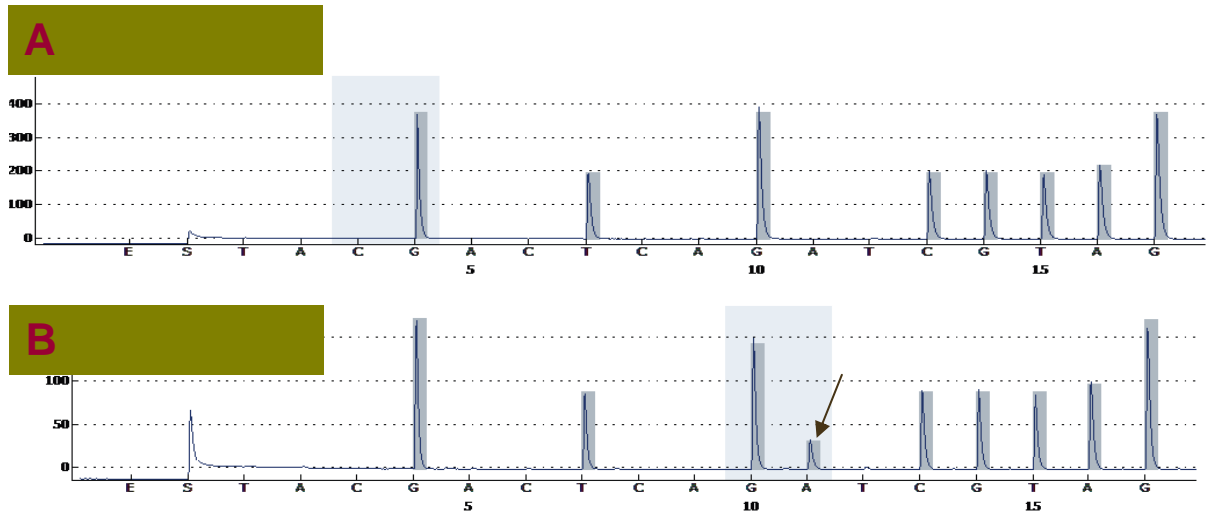
Das ve ark. oral kanserli 12 hastanın 4'ünde (% 33) K-ras geni mutasyonu saptamıştır [12]. Yoo ve ark. tükrük bezi kanseri olan 24 hastalık seride biri adenokarsinoma (kodon 13) ve biri mukoeypidermoid karsinoma (kodon 13) olmak üzere 2 hastada (%8) K-ras geni mutasyonu saptamıştır [13]. Rizos ve ark. 41 hastada

larengeal spesmenlerde yaptıkları K-ras analizinde 2 hastada (%4.8) kodon 12'de K-ras mutasyonu saptamıştır [16]. Kiaris ve ark. larenks kanserli 120 tümör spesmeninde yaptıkları K-ras analizinde sadece 2 hastada (%1.6) kodon 12'de K-ras mutasyonu saptamıştır [17]. Bizim çalışmamızda 41 hastanın tümör dokularında K-ras mutasyonu çalışıldı ve 2 (%4,87) hastada K-ras geninin 12. ve 13. kodonlarında olmak üzere birer adet mutasyon saptandı. Sigara ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve diğer organ kanserlerinde daha yüksek oranda mutasyonu gözlenen K-ras onkojeni, bölgemizdeki larenks kanserlerinde düşük oranda tespit edilmiştir. BBSHK'li hastalarda ras p21' in düşük seviyelerinin hastaliksız sağkalım ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Ras negatif boyanan hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %3 iken ras pozitif boyananlarda aynı zaman diliminde bu oran %54 olarak bulunmuştur [10]. Anti-EGFR (Cetuximab) kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ras mutasyonu olan vakalarda Anti-EGFR tedavisine yanıtın düşük olduğu gözlenmiştir. Ras mutasyonu bu tedaviye yanıt açısından negatif bir prediktör olarak düşünülmektedir. Ancak BBSHK'inde bu negatif prediktivite için ek çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak: BBSHK'ni başlatan moleküler olaylar ras mutasyonundan başka genetik olayları da içerir. Yapılan çalışmalarda baş-boyun kanserli hastalarda K-ras mutasyonu oranlarının %1-30 aralığında saptanırken izole larenks kanseri araştırmalarında bu oranın %5'in üzerinde olmadığını gösterilmektedir. Çalışmamızda larenks kanseri vakalarında 12. ve 13. kodonlarda saptanan K ras mutasyonunun oranının %4,9 olduğu tespit edildi. Bu açıdan bakıldığında larenks kanserleri anti EGFR tedavisi için iyi bir aday olabilir ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda yapılacak olan genetik çalışmalar hastalığın erken tanısı, tanı sonrası seyri ve tedavisi açısından bize yardımcı olacaktır.



Şekil 1. Periferik kan ve tümöral örneklerde KRAS kodon 12 onkojeninin mutasyona uğramış ve normal pyrogram profilleri
A: Sağlıklı kontrol (kan) KRAS onkojeninin 12. kodonun normal GGT profili. BBSHK bir vakada KRAS 12. kodonun G> T transversiyonu nokta mutasyonu gösterilmektedir.
B: Vahşi kodon GGT idi ve tümör dokusunda G> T transversiyonu (ok) ile TGG'ye değiştirilmiştir.



Şekil 2. Periferik kan (sağlıklı kontrol) ve tümöral örneklerde mutasyona uğramış ve normal KRAS kodon 13 onkojeninin pirosekanslama analizi
A: Sağlıklı kontrol (kan) KRAS kodon 13 onkojeninin normal GGC profili. BBSHK bir vakada KRAS kodon 13'ün transversiyon G>A nokta mutasyonu göstermektedir.
B: BBSHK bir vakada KRAS kodon 13'ün transiyonal G>A nokta mutasyonu göstermektedir. Vahşi kodon GGC idi ve tümör dokusunda G> A transiyonu (ok) ile TAC'ye değiştirilmiştir.

Tablo 1. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında proto-onkogen KRAS kodon 12,13 ve 61'in mutasyona uğramış profillerinin türleri ve prevalansı

		Hastalar (n:41)	(n/%)
	Mutant	2	(%4.8)
	Normal	39	(%95.2)
PROTO-ONKOJEN KRAS			
	Mutasyon tipi	Baş-boyun skuamöz hücreli kanser vakaları	
Kodon 12	G12A	1	(%100)
	G12C	0	
	G12D	0	
	G12F	0	
	G12R	0	
	G12S	0	
	G12V	0	
		Toplam (n/%)	1
Kodon 13	G13A	0	
	G13C	0	
	G13D	1	(%100)
	G13R	0	
	G13S	0	
	G13V	0	
	Toplam (n/%)	1	(%2.4)
Kodon 61	Q61E	0	
	Q61H1	0	
	Q61H2	0	
	Q61K	0	
	Q61L	0	
	Q61P	0	
	Q61R	0	
	Toplam (n/%)	0	

Kaynaklar

1. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59:445-453.
2. Attar E, Dey S, Hablas A et al. Head and Neck Cancer in a Developing Country: A Population-Based Perspective Across 8 Years. *Oral Oncol* 2010;46:591-596.
3. Engin K, Erişen L. Baş Boyun Kanserleri. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul: 2003;49-47,345-358.
4. De Ruyck K, de Gelder V, Van Eijkeren M, et al. Chromosomal radiosensitivity in head and neck cancer patients: evidence for genetic predisposition. *Br J Cancer* 2008;20;98:1723-1738.
5. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59:445-453.
6. e-book Cooper GM. *Oncogenes (Jones and Bartlett Series in Biology)* by Geoffrey M. Cooper 1995, 2nd ed. London-UK
7. Bertram JS. The molecular biology in cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21:167-223.
8. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.
9. Ruiz-Godoy R LM, Garcia-Cuellar CM, Herrera González NE, et al. Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:73-78.
10. Field JK, Spandidos DA, Malliri A, Gosney JR, Yiagnosis M, Stell PM. Elevated P53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991;64:573-577.
11. Vinay Kumar, Ramzi S.Cotran, Stanley L.Robbins. *Basic Patology, Temel Patoloji. Çev.ed. Çevikbaş U. 6nd ed. Nobel Tıp Kitabevleri. 2000;145-158.*
12. Das N, Majumder J, DasGupta UB. ras gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncol* 2000;36:76-80.
13. Yoo J, Robinson RA. Ras gene mutations in salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:836-839.
14. Özel HE, Özkırış M, Gencer ZK, Saydam L. Baş ve boyun kanserlerinin genetik temeli ve gen tedavisi (Genetic basis of head and neck cancers and gene therapy) *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2013;23:127-132.
15. Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klusmann JP. Basics of tumor development and importance of human. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2012;11:Doc09. doi: 10.3205/cto000091. Epub 2012 Dec 20.
16. Rizos E, Sourvinos G, Arvanitis DA, Velegakis G, Spandidos DA. Low incidence of H-, K- and N-ras oncogene mutations in cytological specimens of laryngeal tumours. *Oral Oncol* 1999;35:561-563.
17. Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, Vaughan ED, Field JK. Mutations, expression and genomic instability of the H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1995;72:123-128.