

ДАРК - ПРОМОТОР ХИПЕРМЕТИЛАЦИОНЕН ГЕН КАЈ ОРАЛНИОТ ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ

ДАРК - PROMOTOR HYPERMETHYLATION GENES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Двојаковска С., Грчев А., Поповиќ- Монеvsка Д., Поповски В., Панчевски Г.,
Бенедети А.

*Универзитет,, Св. Кирил и Методиј,, Скопје, Стоматолошки факултет
ЈЗУ У Клиника за максилофацијална хирургија*

АПСТРАКТ

Протеин киназата асоцирана со апоптоза (Death-associated protein kinase, DAPK) е сугериран како тумор- супресивен ген, специфичен за оралниот карцином и поради неговата висока инциденца на хиперметилација кај карциномите е предложен за потенцијален биомаркер. DAPK се користи како туморски маркер во стратегијата на молекуларна детекција на OSCC.

Целта на оваа студија беше да се испита статусот на DAPK промотор гените и да се востанови нивната можна улога во туморигенезата, развоотј и дијагнозата кај пациенти со OSCC.

Материјал и методи: Спроведовме проспективна студија и молекуларни анализи кај 60 пациенти, проследени според хируршкиот протокол за карциноми. Секој од испитаните транскрипти беше спореден помеѓу трите групи на биоптични материјали: туморско ткиво и контралатерално нормално ткиво и од здрави индивидуаи.

Резултати: DAPK- тумор супресорните гени се метилирани во 75% од примероците во туморското ткиво, што ја потврдува хиперметилацијата како клучен играч во оралната карциногенеза. Во контралатералните ткива регистриравме фреквенции на DAPK кај 33,3%. Сите DAPK гени се конзистентно (неметилирани) во здравите примероци, најчесто хиперметилирани во туморите и често во контралатералните нормални примероци, со што се нагласува нивната улога на потенцијални биомаркери за OSCC. DAPK промотор хиперметилацијата покажа позитивна предиктивна вредност во откривањето на OSCC од 89,6%.

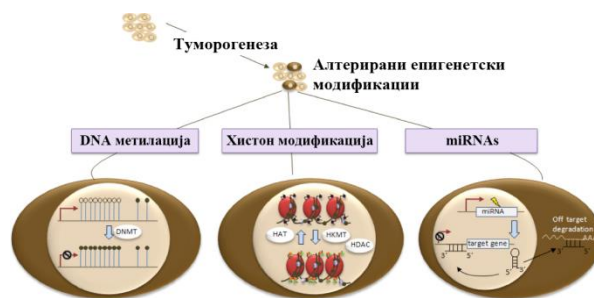
Заклучок: ДНК метилационите модели на DAPK промотор гените, покажа карактеристичен модел со големо значење за оралната карциногенеза. Ја потврдивме туморската хетерогеност и улогата на DAPK како непобитен фактор во иницијалната и развојната орална карциногенеза.

Клучни зборови: орален карцином, епигенетика, ДНК метилација, DAPK тумор-супресорни гени

ВОВЕД

Карциномот на глава и врат (HNSC) е шеста најчеста малигна неоплазма во светот, а најчеста негова форма (96 %) отстајува на оралниот карцином (OSCC). Според Association of American Cancer Institutes (AACI), неговата инциденца се зголемила за околу 25% во последните 5 години, поради што OSCC е еден од главните светски здравствени проблеми во текот на изминатата деценија. Третманот подразбира ексцизија на туморот, придружена со дисекција на вратот, зрачна терапија, а во напредните стадиуми и хемотерапија. Пациентите подлежат на високо мутилантни хируршки и радио/хемо терапии, што доведува до губиток на оралните ткива отежнат говор и исхрана и многу лош квалитет на живот^{2,6,23}. Меѓутоа, кога се користи и најдобрата комбинација на хируршки и нехируршки пристапи, повеќе од 50% од пациентите со OSCC доживуваат релапс и голема стапка на смртност, што го прави оралниот карцином "главен убиец" на модерните времиња. Во последната деценија прогресот во генетиката нуди можности за подобро разбирање на молекуларна патогенезата на карциномите и можност за нивно рано откривање, дијагностицирање и терапија.

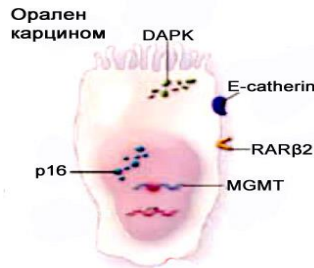
Од аспект на молекуларна биологија, неопластичната трансформација е повеќестепен процес на ткивни хомеостатски нарушувања, која се карактеризира со генетски и епигенетски промени, а нивната прогресивна акумулација доведува до малигна трансформација на нормалните клетки. Генетските алтерации предизвикуваат неповратни промени во ДНК секвенцата, а терминот "епигenetика" ги дефинира сите наследни промени во генската експресија и хроматинската структура кои не се шифрирани-променети во ДНК секвенцата. Сите диференцијациони процеси се активираат и одржуваат преку епигенетски механизми, кои вклучуваат: ДНК метилација, хистонска модификација и РНК. Тие овозможуваат стабилно ширење на генската активност низ целиот животот на клетката и се наследуваат низ генерациите (Feinberg, 2006). Нарушување на кои било од овие механизми, доведува до несоодветни генската експресија што резултира со развој на карцином (слика бр.1.).



Сл.1. Нарушување на трите епигенетски механизми кои доведуваат до несоодветни генски експресија и појава на карцином

Сведоци сме на голем подем и огромно темпо на истражувања, особено во областа на DNA- метилацијата, кои ветуваат подобро разбирање на туморигенезата и развојот на нови стратегии за превенција, лекување и следење на пациентите (Yu, 2011).

Хиперметилацијата кај карциномите се одвива во одредени региони на тумор-супресорните гени, познати како промотори (*Shi,2011; Shaw , 2008*). (слика бр.2.).



Сл.2. Тумор-супресорни гени специфични за OSCC

Еден од најексплоатираните и добро познати тумор-супресорните гени, кои се инактивираат преку хиперметилација и се клучни и специфични за прогресијата на OSCC се DAPK тумор супресивните гени. DAPK (death-associated protein kinase1) се протеини, посредници на апоптозата и контролори на автофагијата. DAPK промотор хиперметилацијата е реверзибилна и може да се промени при третман со DNA метилтрансфераза (Dnmt инхибитори) - негова можна клиничка имплементација во терапијата на карциномите. Идентификацијата и анализите на DAPK гените со дисрегулирани DNA метилации, овозможија напредок во разбирањето на молекуларните механизми во иницијацијата, прогресијата и експанзијата на OSCC. Фреквенцијата на промотор хиперметилацијата на DAPK гените во примарните OSCC, во литературата се движи од 35-83%, за контралатералните нормални ткива од 18%-45,3%²³, а во здравите ткива 0-2%. Во нашата студија, се обидовме да обезбедиме сеопфатна и висока продуктивност во истражувањето на податоците за потврдување на DAPK гените како потенцијални биомаркери¹³. Нивото на метилација на DAPK гените, се користи за утврдување на нивната улога во туморигенезата, развој, напредок и прогнозата на OSCC. Секој од испитуваните транскрипти, во компарација помеѓу трите групи на биопстични материјали покажува карактеристичен модел на метилација, со што ќе се обидеме да допринесеме во потврдување на овој туморски супресорен ген како можен биомаркер за OSCC. Овие сознанија сеуште остануваат во фаза на дефинирање и се сметаат за главен предизвик во иднина, за можна нивна клиничка апликабилност во донесување на одлука за екстензивност на хируршкиот третман.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Со цел оваа студија да даде свој придонес во разрешување на централната догма, за откривање на компатибилни податоци за DNA метилациониот статус на DAPK, како и нивната улога во патогенезата на OSCC, ги поставивме следните цели:

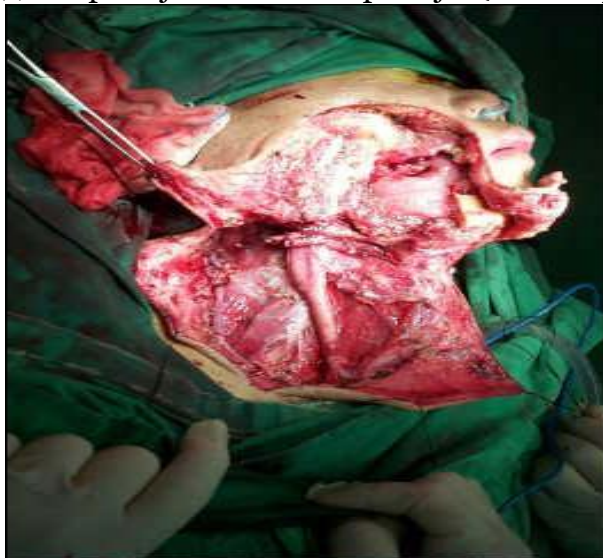
- да се утврди нивото и улогата на DNA- метилацијата на DAPK гените во туморските примероци од OSCC, во однос на здравите ткива, со цел на

утврдување на нивните предиктивни вредности во развојната орална карциногенеза

- да се утврди нивото на DNA- метилација на DAPK гените, во клинички непроменетата слузница, во однос на здравите ткива, со цел на утврдување на нивните предиктивни вредности во почетната орална карциногенеза
- Да се корелира DNA- метилациониот статус на DAPK гените, меѓу трите групи на ткивни примероци, со цел на утврдување на нивната предиктивна вредност и улога како потенцијални биомаркери во детекција на OSCC

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

За реализирање на поставените цели, беше спроведена ретроспективна студија на 60 пациенти, третирани на Клиниката за максилофацијална хирургија, во период од 6 години и од нив беа добиени 100 биоптични примероци . 20 пациентите беа здрави индивидуи, 40 пациентите со дијагностициран OSCC-хируршки третирани, според терапевтски протоколи за карцином на орална шуплина- радикална ексцизија на туморот придружена со соодветна дисекција на вратот и избрани со услов, да не биле подложени на зрачна радиотерапија или хемотерапија. (слика бр.3.).



Сл.3. Ексцизија на тумор на мандибула со радикална вратна дисекција

Биоптичните материјали (ткивните примероци), беа перспективно собрани за време на операцијата и се состојеја од 3 дела : I група - 40 ткивни примероци од туморско ткиво, со 5 mm³ материјал од рамките на туморска маса и хистолошка верификација на туморот (планоцелуларен карцином); II група - 40 примероци од контралатералното, нормално ткиво, макроскопски нормални ткива, земени контралатерално од истите пациенти и III група - 20 ткивни примероци, земени од здрава слузница, од пациенти кои немаат претходна историја на малигни заболувања. Овие примероци, беа анализирани за добивање на референтни, нормални вредности за нивото на DAPK метилацијата и понатаму користени за корелација со вредностите од претходните 2 групи на ткивни примероци.

Биоптични материјали беа чувани на температура од -80 °C и по одмрзнувањето беше изолирана геномска DNA. Определувањето на концентрацијата на добиената ДНК беше утврдена со автоматски спектрофотометар Thermo Scientific NanoDrop. Потоа следеше определување на вредноста на метилација на DAPK гените во ткивните примероци, со следните методи : **In vitro бисулфитна модификација на DNA** - Беше испитувано присуството на метилни групи на одредени региони на гените со помош на метилација-специфичен PCR. Најпрво примероците беа подложени на процес на бисулфитна конверзија, со што се индуцира разлика во секвенцата помеѓу метилираните и неметилираните секвенци во одредени региони во геномот која последователно се детектираше со PCR реакција. Реакцијата за бисулфитна конверзија се изведуваше со помош на реагенси од китот *Imprint DNA Modification kit (Sigma Aldrich)*. Потоа примероците беа подложени на 7 посебни **квантитативна полимераза верижни реакции во реално време (RT-qPCR)**, (во дупликат) со соодветни прајмери и TaqMan проби со кои се детектира присуство само на метилирани секвенци на DAPK гените. Присуството на сигнал во оваа реакција укажуваше на присуство на ДНК примерок, адекватен за анализа на метилација со другите прајмер сетови. Секвенците на прајмерите и пробите се дадени во Табела за секој ген посебно. (табела бр.1)

gene	primer/probe	sequences 5'-3'
DAPK	DAPK F	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC
	DAPK R	CCCTCCCAAACGCCGA
	DAPK P	6FAM – TTCGGTAATTTCGTAGCGGTAGGGTTTGG – TAMRA

Табела бр.1. Секвенци на прајмери и TagMan проби кои се користени за детекција на присуство на метилирана ДНК во промотерите на испитуваните гени

Примероците во кои беше детектиран сигнал кој е со поголема јачина од базната линија ($\square Ct=0.5$) во реакцијата со специфичните прајмери се сметаа за позитивни, односно за ткиво во кое постои метилација во испитуваните секвенци. Потоа следеше статистичка обработка на добиените податоци. т.е.корелација на нивоата метилациониот статус на DAPK гените меѓу трите групи на ткивни примероци, за да се утврди нивната предиктивна вредност како потенцијални биомаркери во оралната туморогенеза и детекцијата на OSCC.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Резултатите од извршените анализи на четириесет туморски ткива, соодветните не-туморски контралатерални ткива и 20 примероци од здрава нормална лигавица, во кои ДНК беше екстрахирана од секој примерок го потврдија статусот на метилација на DAPK гените. Техниката на MS-PCR овозможи прецизно мапирање на метилационите модели во CpG острови на геномната ДНК кај сите примероци. Резултатите се прикажани на слика 4.

	а) туморско ткиво	б) Контра латерална страна	в) здраво ткиво
гени	DAPK	DAPK	DAPK
М 03			
М 04			
М 05			
М 06			
М 07			
М 08			
М 09			
М 10			
М 11			
М 12			
М 13			
М 14			
М 15			
М 16			
М 17			
М 18			
М 19			
М 20			
М 21			
М 22			
М 23			
М 24			
М 25			
М 27			
М 28			
М 29			
М 30			
М 31			
М 32			
М 33			
М 35			
М 36			
М 37			
М 38			
М 40			
М 44			
М 45			
М46			
М47			
М48			

**Слика 4. метилационен статус на DAPK гените во трите биоптични примероци а) туморско ткиво; б) контралатерално, нормално ткиво в) здраво ткиво
* М+ (метирирани гени); * М – (неметирирани гени)**

Пропорциите на промотор метилацијата на гените во оваа студија беа пресметани во проценти во мострите. Анализата на DAPK во трите групи биоптични материјали, покажа фреквенција на хиперметилација кај 30/40 пациенти во OSCC дијагностицираните примероци, т.е. DAPK, беше потврдена во 75% во туморските ткива, што ја потврдува хиперметилацијата како клучен играч во оралната карциногенеза. Освен тоа, нашите податоци потврдија дека DAPK хиперметилационите стапки во соодветните не- туморски контралатерални ткива покажуваат фреквенции од 33,3% т.е. кај 13/39 пациенти. Соседните ткива претставуваат клинички нормални ткива со висока фреквенција на хиперметилации, факт што укажува на молекуларната патологија, односно, епигенетските аберации и релативно поголем ризик од прогресија кон малигни промени. ДНК хиперметилационите обрасци беа конзистентни (неметирирани) во здравите примероци- 0%. DAPK гените во нашата студија покажаа карактеристичен модел со различно значење и улога во туморигенезата и развојот на OSCC. Резултатите се прикажани во табела бр. 2.

Групи на биоптични примероци	DAPK метирирани гени
туморски ткива	30/40 (75%)
Контралатерални нормални ткива	13/39 (33,3%)
здрави пациенти (n = 20)	0/20 (0%)

Табела 2. Аберантна метилација на DAPK гените во туморските ткива, во контралатералните нормални ткива и здравите ткива

Во литературата, фреквенцијата на промотор хиперметилацијата на DAPK гените во примарните OSCC се движи од 35-83%; за контралатералните нормални ткива од 18%- 45,3%²³, а во здравите ткива 0-2%. Нашите наоди се совпаѓаат со студиите на Righini (2007); Al-Kaabi (2014) Dong (2012) , Steele и Meyers (2011); Li и Steinmann (2009); Kulis и Michie (2010), кои ги предложиле DAPK гените за потенцијални тумор маркери во молекуларните истражувања. Ја поддржуваме и хипотезата на Wong² (2011), за минимална резидуална болест во слuzницата во околината на туморот, која не е потврдена со патохистолошка анализа. Алтернативно, епигенетските влијанија се појавуваат во почетокот на карциногенезата како резултат на изложеност на карциномот, што резултира со хетерогена структура (поликлоналност на клетките на туморот и околната слuzница). Отсуството на метилации во здравата лигавица, укажува дека хиперметилацијата е важен и непобитен настан кој може да биде користен во рано откривање на карциномите (Bhatia, 2014; Jacqueline A Gasche, 2012, Kulkarni, 2004).

Значително почести метилации на DAPK, беа потврдени во туморските и контралатералните нормални ткива, во споредба со здравите ткива. Разликата помеѓу трите испитувани групи во однос на DAPK е статистички значајна (Kruskal-Wallis test: $H = 29,377$ $p = 0,0000$). Разликата во метилирањето на DAPK е статистички значајна помеѓу туморското ткиво и ткивото од здравите пациенти ($p=0,0000$), како и помеѓу контралатералните нормални ткива и здравите ткива ($p=0,0000$).

Во однос на метилирањето на DAPK гените, во туморското ткиво и контралатералното нормално ткиво, постои статистички значајна разлика (Mann-Whitney U Test: $Z = 3,186$ $p = 0,0014$). Овие резултати се совпаѓаат со наодите на *Steele u Meyers (2011); Li u Steinmann (2009); Kulis u Michie (2010), Smith(2004)*. Во табелата.3.се претставени предиктивните вредности според метилацијата на DAPK гените во примарниот орален карцином во однос на метилацијата во здравите ткива.

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
DAPK	75%	100%	100%	66,7%

Табела 3. Сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност на метилацијата на DAPK гени во примарниот орален карцином

Според нашите добиени резултати за метилацијата на DAPK гените во примарниот орален карцином во однос на метилацијата во здравите ткива, регистриравме голема сензитивност за DAPK (75%). Анализата на податоците за вредноста на метилацијата на DAPK во туморските ткива, покажа сигурност од ≈ 83.6 во детекција и дијагностицирање вистина позитивните/заболени, односно, имаат голема дијагностичка вредност при откривањето and invasive phenotype in OSCC.

Специфичноста е многу висока (100%) за DAPK гените, што значи дека DAPK гените со сигурност од $\approx 100\%$ ги дијагностицираат вистина негативните, односно здравите лица. Во табелата бр.4 се прикажани пресметаните предиктивни вредности според метилацијата на DAPK гените во контралатералните нормални ткива во однос на метилацијата во здравите ткива.

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
DAPK	33,3%	100%	96,7%	43,5%

Табела бр.4. Сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност на метилацијата на 5-те зададени гени во контралатералните нормални ткива

Според добиените резултати за метилацијата на DAPK гените во контралатералните нормални ткива во однос на метилацијата во здравите ткива, за DAPK (33,3%) сензитивноста е значајно пониска. Тоа значи дека метилацијата на DAPK гените во контралатералните нормални ткива со сигурност од $\approx 41,3\%$ ги дијагностицираат вистина позитивните/заболени, односно, немаат сигнификантна дијагностичка вредност, во почетниот, ран настан во карциногенезата. Специфичноста и тука е многу висока (100%) за DAPK гените, што значи дека сите зададени гени (неметилирани) со сигурност од $\approx 100\%$ ги дијагностицираат вистина негативните, односно здравите лица.

Речиси идентични со нашите наоди се резултатите во речиси сите објавени студии на Righini, 2007 и Wong²⁹(2011), а се спротивни на Bhatia (2014); Santoro (2012)

Kozomara(2011), во однос на наодите на наодите на пониски вредности на сензитивност и специфичност на DAPK гените во OSCC.

Потребни се дополнителни скрининг студии за да се подржи оваа хипотеза за апликабилноста на DAPK гените како дијагностичка метода во молекуларната придобивка во дијагнозата на OSCC. Нашите резултати ќе придонесат во востановување на неговата улога како дијагностички биомаркер, како и во неговата клиничка употреба во планирањето на екстензивноста и типот на дисекција која ќе треба да се изведе ^{14,3,19}.

ЗАКЛУЧОК

Врз основа на добиените сознанија и резултати за процена на аберантните промотор хиперметилациони DAPK гени и нивната потенцијална улога во дијагнозата и детекцијата на OSCC може да ги истакнеме следниве заклучоци:

1. Аберантната хиперметилација на DAPK гените се специфичен наод со висока сигнификантност за OSCC која не е најдена во здравите ткива. DAPK- тумор супресорните гени се често метилирани во примероците од тумор, што ја потврдува хиперметилацијата како клучен играч во оралната карциногенеза. Метилирните DAPK гени во оралниот карцином покажаа висок дискриминирачки потенцијал во одредување на неговата предвидувачка вредност во развојната карциногенеза .
2. Во контралатералните, нормални ткива, се регистрирани поретки, но сепак застапени метилилации на DAPK гените. Со ова откритие ја потврдивме туморската хетерогеност и улогата на ДНК метилацијата на DAPK како клучен и непобитен фактор во почетната орална карциногенезата како глобален ефект врз целата орална слузница.
3. DAPK промотор хиперметилацијата покажа голема позитивна предиктивна вредност и сигурност во откривањето и детекцијата на OSCC. Статусот на метилација на DAPK гените дефинитивно ги издвојува како кандидати, биомаркери за дијагностицирање на OSCC. Сепак, потребни се повеќе потенцијални студии за потврдување на клиничките применливоста на DAPK хиперметилацијата во поголема групи на испитаници.
4. Во однос на клинички и хируршки применливост во иднина, потврдата на специфични прогностичка DAPK биомаркери за OSCC, ќе биде пресуден индикатор во одлучувањето за видот на дисекција и обемот и агресивноста на третманот.

DAPK- PROMOTOR HYPERMETHYLATION GENES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Dvojakovska S., Grcev A., Popovic- Monevska D., Popovski V., Pancevski G., Benedeti A.

¹ Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, UKIM - Skopje, Clinic for maxillofacial surge-
Skopje, Republic of Macedonia

*Corresponding author:

D-r Suzana Dvojakovska
Faculty of Dental Medicine, University St. Cyril and Methodius,
Majka Tereza, PO BOX 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
Tel: ++ 389 070 346 673
URL: <http://www.stomfak.ukim.edu.mk/>

ABSTRACT

Death-associated protein kinase (DAPK) has been suggested as a tumor suppressor gene and its high frequency of DNA methylation has been noted in oral cancer patients. It has been used as a tumor marker in novel molecular detection strategies in OSCC, in the field of molecular biology with special emphasis on epigenetic mechanisms.

The aim of the study: was to explore DAPK promoter gene status and to establish their possible role in tumorigenesis, development and predictive value in diagnosis in OSCC patients.

Material and methods: We conducted a prospective study and molecular analysis in 60 patients followed up through the surgical protocol. Each of the examined transcripts was compared within the three groups of bioptical materials: tumor tissue, normal contralateral and tissues from healthy individuals.

Results: DAPK- tumor suppressor genes were methylated in 75% of tumor samples, which confirmed hypermethylation as a key player in oral carcinogenesis. In the contralateral mucosa we registered frequencies of DAPK in 33.3%. All DAPK genes were consistent (unmethylated) in healthy samples, a commonly hypermethylated in the tumor and often in contralateral normal samples, which emphasizes its role as a potential biomarker in OSCC. DAPK promoter hypermethylation showed a positive predictive value and security in detection of OSCC = 89,6.

Conclusion: DNA methylation patterns of DAPK promoter genes showed characteristic pattern with great importance in oral carcinogenesis. Tumor heterogeneity was confirmed and the role of DAPK as a indisputable factor in the initiation and late oral carcinogenesis.

Key words: OSCC- oral cancer, epigenetics, DNA methylation, DAPK tumor suppressor gene

INTRODUCTION

Head and Neck carcinoma (HNOC) is the sixth most common malignant neoplasm worldwide and its most common form (96%) belongs to oral carcinoma (OSCC). According to the Association of American Cancer Institutes (AACI), its incidence has increased by about 25% in the last 5 years, so OSCC is one of the world's major health problems over the past decade. Treatment involves excision of the tumor, followed by neck dissection, radiation therapy and chemotherapy in advanced stages. Patients undergo high mutilating surgical and radio / chemo therapies, leading to loss of oral tissues difficulties in speech and appalling quality of life^{2,6,23}. However, when we used the best combination of surgical and nonsurgical approaches, more than 50% of patients with OSCC experiencing a relapse and a high rate mortality, making oral carcinoma " the main killer" of modern times. In the last decade, progress in genetics offers opportunities for better understanding the molecular pathogenesis of cancer and opportunity for early detection, diagnosis and therapy.

From the molecular biology aspect, neoplastic transformation is a multistage process of homeostatic tissue disorders, characterized by genetic and epigenetic changes and their progressive accumulation leading to malignant transformation of normal cells. Genetic alterations cause irreversible changes in DNA sequence, and the term "epigenetics" defines all heritable changes in gene expression and chromatin structure which are not coded- altered in the DNA sequence. All the differential process are activated and maintained through epigenetic mechanisms, which include: DNA methylation, RNA and histon modification. They provide a steady expansion of gene activity throughout the cell life and are inherited through the generations (Feinberg, 2006). Disruption of any of these mechanisms lead to inappropriate gene expression resulting in development of oral cancer. (Figure No.1.).

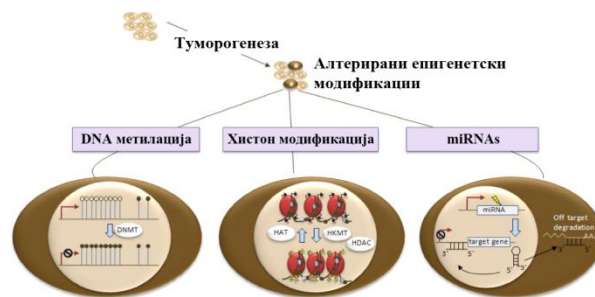


Figure 1. Impairments of the three epigenetic mechanisms that lead to inadequate gene expression and occurrence of cancer

We are witnesses of great achievement and intensive research, particularly in the field of DNA - methylation, which promises better understanding of tumorigenesis and the development of new strategies for prevention, treatment and monitoring of patients (Yu, 2011). Hypermethylation in cancer, takes place in certain regions of tumor suppressor genes, known as promoters (Shi, 2011; Shaw, 2008). (Picture 2).

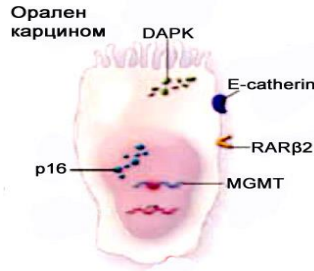


Figure 2. Tumor suppressor genes specific for OSCC

One of the most exploited and well known tumor suppressor genes, inactivated by hypermethylation and specific for progression in OSCC is DAPK tumor suppressive genes. DAPK (death-associated protein kinase1) are proteins, mediators of apoptosis and controllers of autophagy. DAPK promoter hypermethylation is reversible and can be modified by treatment with DNA methyltransferase (Dnmt inhibitors) - a possible implementation in clinical therapy of cancer. Identification and analysis of DAPK dysregulated genes with DNA methylation, enabled advances in understanding the molecular mechanisms in the initiation, progression and expansion of OSCC. In the literature, the frequency of the promoter hypermethylation of DAPK genes in primary OSCC range between 35-83%, for the contralateral normal tissues varies 18% - 45.3%, and 0-2% in healthy tissues. In our study, we tried to provide a comprehensive and high productivity in research data confirming DAPK genes as potential biomarkers¹³. The level of DAPK genes methylation are used to determine their role in tumorigenesis, development, progress and prognosis of OSCC . Each examined transcripts correlate in the three groups of biopsy samples and shows a characteristic pattern of methylation. This study can contribute to the validation of the tumor suppressor gene as a possible biomarker for OSCC. These findings still remain in the phase of definition and are considered as a major challenge in the future, especially for their possible clinical applicability in planning the extensivity of surgery.

OBJECTIVES

In order to contribute to the resolution of the central dogma for detecting DNA compatible data for the value of methylation status of DAPK genes and their role in the pathogenesis of OSCC, we have set up the following objectives:

- to determine the level and role of DNA- methylation in the promoter regions of DAPK genes in tumor tissues, compared with healthy tissues, in order to determine their predictive values in development oral carcinogenesis
- to determine the level of DNA- methylation status of DAPK genes in clinical unchanged contralateral mucosa, compared with healthy tissues, in order to determine their predictive values in initiating oral carcinogenesis
- To correlate DNA- metilaconiot status DAPK genes among the three groups of tissue samples in order to determine their predictive value and potential role as a biomarkers in detection of OSCC

MATERIAL AND METHODS

In order to achieve the objectives, we conducted a retrospective study of 60 patients, treated in the Clinic for maxillofacial surgery Skopje, in 6 years period and received 100 biopsy materials from them. 20 patients were healthy individuals, 40 patients were oral cancer patients and the selection criteria for them was not to be radiotherapy or chemotherapy treated before primary surgery. Patients were further treated according to diagnostic and therapeutic protocols for oral cancer- radical excision of the tumor together with a neck dissection (figure.3.)

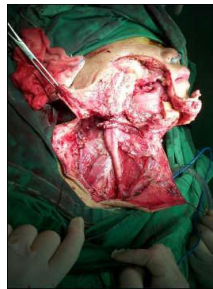


Figure 3. mandibular tumor excision with radical neck dissection

The biopsy material (tissue samples) were prospectively excised during surgery and consisted of 3 groups: I group -40 tumor tissue samples - taken 5 mm³ from the tumor mass, accompanied by histological verification; II group - 40 samples of the contralateral normal tissue, collected during the intervention and III group - 20 samples taken from healthy mucosa from patients who have no previous history of cancer. These samples were analyzed in order to obtain the referent, normal values for DNA methylation status of DAPK genes and furthermore used for correlation with the values of the previous two groups of tissue samples. First, biopsy material were kept at a temperature of -80 ° C and after unfreezing we isolated genomic DNA. The determination of the concentration and purity of the DNA was found on the automated spectrophotometer- Thermo Scientific NanoDrop. Afterwards, we determine the methylation level of DAPK genes in tissue samples, using the following methods:

In vitro bisulfite modification of DNA- Samples were examined for the presence of methyl groups in certain regions of the gene using methylation-specific PCR. First, all samples were subjected to bisulfite conversion process, which induces a difference in sequence between methylated and unmethylated sequences in certain regions of the genome that can subsequently be detected by PCR reaction. The reaction of bisulfite conversion was performed using reagents from the Imprint DNA Modification kit (Sigma Aldrich). Then the samples were subjected to seven separate quantitative PCR reactions in real time (**Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction - RT-qPCR**), (in duplicate) with appropriate primers and TaqMan probes which detect the presence of only methylated sequences in DAPK genes promoters. The presence of the response signal indicating the completeness of the bisulfite conversion and the presence of the DNA sample is adequate for analysis of

methylation in the other regions examined primer sets .. Sequences of primers and probes are given in the Table for each gene individually. (Table No.1)

gene	primer/probe	sequences 5'-3'
DAPK	DAPK F	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC
	DAPK R	CCCTCCCAAACGCCGA
	DAPK P	6FAM – TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGGTTTGG – TAMRA

Table 1. Sequences of primers and TagMan samples that are used to detect the presence of methylated DNA in the promoters of genes tested

Samples in which the signal was detected with higher intensity from baseline ($\Delta Ct = 0.5$) in the reaction with the specific primers were considered positive, i.e the tissue which is methylated in the investigated sequences.

Afterwards, we performed statistical analysis of the the obtained data- we correlate the levels of DAPK methylation status among the three groups of tissue samples in order to determine their value as potential predictive biomarkers in oral tumorigenesis and detection of OSCC.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of completed analysis from forty tumor tissues, forty corresponding contralateral non-tumor tissues and 20 samples from healthy normal mucosa in which DNA was extracted from each sample, confirmed the methylation status of DARK promoter genes . The technique of MS-PCR enables precise mapping of methylated patterns in CpG islands of genomic DNA, in all samples. The results are shown in Figure 4.

	а) туморско ткиво	б) Контра латерална страна	в) здраво ткиво
гени	DAPK	DAPK	DAPK
M 03			
M 04			
M 05			
M 06			
M 07			
M 08			
M 09			
M 10			
M 11			
M 12			
M 13			
M 14			
M 15			
M 16			
M 17			
M 18			
M 19			

M 20			
M 21			
M 22			
M 23			
M 24			
M 25			
M 27			
M 28			
M 29			
M 30			
M 31			
M 32			
M 33			
M 35			
M 36			
M 37			
M 38			
M 40			
M 44			
M 45			
M46			
M47			
M48			

Figure 4. methylation status of DAPK genes in tree biopsy samples in: a) OSCC tissues b) contralateral, normal tissues в) haelthy individuals
* M+ (methylated); * M – (unmethylated genes)

The proportions of promoter methylation of genes in this study were calculated as a percentage of the test sample. Analysis of DAPK among the three groups of biopsy material, demonstrated hypermethylation frequency in 30/40 patients in OSCC samples. Our results confirmed DAPK hypermethylation in 75% of tumor tissue, which confirmed hypermethylation as a key player in oral carcinogenesis. Furthermore, our data showed that DAPK hypermethylation rates in the corresponding contralateral non-tumor tissues shows CpG region frequencies in 13 / 39 patients (33.3%). The adjacent tissues represent clinically normal tissues with a high frequency of hypermethylation, which may indicate a molecular pathology, epigenetic aberrations and a relatively higher risk of progression toward malignant changes. DNA hypermethylation patterns were consistent (unmethylated) in healthy samples- 0%. DAPK hypermethylation genes in our study showed characteristic pattern with a different importance and role in tumorigenesis and development of OSCC. The results are shown in table.2.

Групи на биоптични примероци	DAPK метилирани гени
туморски ткива	30/40 (75%)
Контралатерални нормални ткива	13/39 (33,3%)
здрави пациенти (n = 20)	0/20 (0%)

Table 2. Aberrant methylation of DAPK genes in tumor tissue, in the contralateral normal tissue and healthy tissue

In the literature, frequency of the promoter hypermethylation of DAPK genes in primary OSCC range from 35-83%; in contralateral normal tissues 18% - 23 45.3%, and 0-2% in healthy tissues. Our findings are identical with the studies of Righini (2007); Al-Kaabi (2014) Dong (2012) , Steele и Meyers (2011);Li и Steinmann (2009); Kulis и Michie (2010), who

proposed DAPK genes as potential tumor markers in molecular research of OSCC. Also we support the hypothesis of Wong² (2011), for minimal residual disease in the surrounding tissue, which is not confirmed by pathohistological analysis. Alternatively, epigenetic influence appear in early carcinogenesis due to exposure cancer, resulting in a heterogeneous structure (polyclonality of tumor cells and surrounding mucosa). The absence of methylation in healthy mucosa, suggesting that hypermethylation is an important event that may be used in early detection of cancer (Bhatia, 2014; Jacqueline A Gasche, 2012, Kulkarni, 2004).

Significantly higher methylation of DAPK, were found in the tumor and contralateral normal tissue compared to healthy tissues. The difference among the three groups of biopsy samples, regarding DAPK is statistically significant (Kruskal-Wallis test: $H = 29,377$ $p = 0,0000$). The difference in the methylation of DAPK is statistically significant between samples of tumor tissue and healthy patients ($p = 0,0000$), and between samples of the contralateral normal tissues and normal tissue ($p = 0,0000$).

The methylation of DAPK, between tumor and contralateral normal tissue samples, showed statistically significant difference (Mann-Whitney U Test: $Z = 3,186$ $p = 0,0014$). These our results are supported by Steele and Meyers (2011), Li and Steinmann (2009); Kulis and Michie (2010), Smith (2004), who reported significant values ($p = 0.014$). In table.3. are represented the calculated predictive values of DAPK genes in primary oral cancer compared with methylation in healthy tissues.

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
DAPK	75%	100%	100%	66,7%

Table 3. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value methylation of DAPK in primary oral cancer

According our results, DAPK methylation in primary oral cancer compared with methylation in healthy tissues demonstrated great sensitivity for DAPK (75%). DAPK methylation in tumor tissues demonstrated accuracy of ≈ 83.6 in the detection and diagnosis true positive / diseased patients. This confirms significant diagnostic value in detecting in invasive phenotype in OSCC. The specificity is very high (100%) DAPK genes, meaning that DAPK genes with $\approx 100\%$ accuracy, diagnosed true negative, free from cancer patients. In table No. 4 are illustrated calculated predictive values of DAPK methylation in the contralateral normal tissue in comparison with methylation in healthy tissues.

гени	Сензитивност	Специфичност	(+) предиктивна вредност	(-) предиктивна вредност
DAPK	33,3%	100%	96,7%	43,5%

Table 4. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of DAPK genes in the contralateral normal tissues

The results for the methylation of DAPK genes in the contralateral, normal tissue demonstrated sensitivity of 33.3% compared with unmethylated genes in healthy tissues which is significantly lower sensitivity than in tumor tissues. It means that the methylation of DAPK

genes in the contralateral normal tissue, with accuracy of $\approx 41.3\%$ detected and diagnosed true positive/ diseased patients, respectively, do not have significant diagnostic value in early event in oral carcinogenesis. Specificity here is very high (100%) for DAPK genes, which means that all DAPK genes (unmethylated) with accuracy of $\approx 100\%$ i diagnosed healthy/cancer free patients.

Almost identical findings with the results obtained in our study, published almost everyone, Righini^{10,24} (2007); Worsham²⁵ (2010) and Wong²⁴ (2011) etc. Contrary to ours results published Bhatia³ (2014) and Santoro¹⁴ (2012) who found lower sensitivity and specificity values for DAPK genes.

Additional screening studies are needed to support this hypothesis for evaluating DAPK genes applicability as a diagnostic method for the molecular assessment in diagnosis of OSCC. Our findings will contribute in its possible role as a diagnostic biomarker and its impact in planning of extensiveness of the surgery and the type of dissection which will be performed^{14,3,19}.

CONCLUSION

Concerning the findings and results of evaluation of aberrant promoter hypermethylation of DAPK genes and their potential role in the diagnosis and detection of OSCC, we can highlight the following conclusions:

1. Aberrant hypermethylation of DAPK is a cancer-specific finding, since it is significantly observed in OSCC and is not found in healthy control tissue. DAPK- tumor suppressor genes were frequently methylated in tumor samples, which confirmed hypermethylation as a key player in oral carcinogenesis. Methylated genes in oral cancer showed high discriminatory potential in determining their predictive value in the developmental carcinogenesis in patient with OSCC.
2. In the contralateral mucosa we registered less often, but a lot of methylated DAPK genes. This finding confirms the tumor heterogeneity and the role of DNA methylation as a key and indisputable factor in the initiation of oral carcinogenesis, as a global effect on the entire oral mucosa.
3. DAPK promotor hypermethylation showed a positive predictive value and security in detection of OSCC. The methylation status of DAPK is definitely interesting as a candidate biomarker for predicting the clinical course of OSCC. However, more prospective studies are needed to affirm the clinical applicability of DAPK hypermethylation in larger groups of patients.
4. Regarding the clinical and surgical applicability in future, confirmation of specific prognostic value of DAPK biomarkers for OSCC, would be a decisive indicator in deciding the type of dissection and extensiveness and aggressiveness of treatment.

ЛИТЕРАТУРА / BIBLIOGRAPHY

1. Liu Y, Zhou Z, He Q-B, Jiang, W-W. *DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients*, *Medical Oncology*, 2012; 29 (2):729-733
2. Wong Y, Lee Li-Tsu, Chung J. *Hypermethylation of MGMT and DAPK gene promoters is associated with tumorigenesis and metastasis in oral squamous cell carcinoma*. *Journal of Dental Sciences*, 2011; 6: 158-164
3. Bhatia V, Goel MM, Makker A, Tewari S, Yadu A, Shilpi P, Kumar S, Agarwal SP, Goel SK. *Promoter Region Hypermethylation and mRNA Expression of MGMT and p16 Genes in Tissue and Blood Samples of Human Premalignant Oral Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma*. *BioMed Research International*. Volume 2014; Article ID 248419,10.
4. Gasche JA, Goel A. *Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis*. *Future Oncol*, 2012;8(11):1407-1425.
5. Okami K, Sakai A, Onuki J, Hamano T, Iida M, Takahashi M. *Promoter hypermethylation of tumor-associated genes in head and neck cancer*. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, 2005;108:207-213.
6. Kulkarni, V, Saranath D. *Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues*. *Oral Oncol*, 2004;40(2):145-53.
7. Maruya S, Issa JP, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, El-Naggar AK, *Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: Incidence and potential implications*. *Clin. Cancer Res*, 2004;10:3825-3830.
8. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, Staibano S. *Epigenetic Disregulation in Oral Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2012;13(2):2331-2353.
9. Righini CA, Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, Favrot MC. *Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence*. *Clin Cancer Res*, 2007;13:1179-1185
10. Smith LT, C Plass. *DNA methylation leaves its mark in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC)*. *Current Genomics*, 2004;5(6).
11. Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. *Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2009;22:1519-1526.
12. Steele TO, Meyers A. *Early detection of premalignant lesions and oral cancer*. *Otolaryngol Clin North Am*, 2011;44(1):221-9
13. Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, Liloglou T, Field J.K, Sloan P, Risk JM. *The Role of Pyrosequencing in Head and Neck Cancer Epigenetics. Correlation of Quantitative Methylation Data With Gene Expression*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008;134(3):251-256
14. Santoro A, Pannone G, Papagerakis S, Serpico R, Guida AL, Muzio L, Bufo P. *Epigenetic Profiling of Oral Cancer*, *Oral Cancer*, (2012) Dr. Kalu U. E. Ogbureke (Ed.), ISBN: 978-953-51-0228-1, InTech, DOI: 10.5772/31386.
15. Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS, El-Naggar AK *Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance*. *Clin Cancer Res*, 2008;14(9):2664-72.
16. Kulis M, Esteller M. *DNA methylation and cancer*. - *Adv Genet*, 2010 - books.google.com

17. Kivtunenko O, Shponka I, Tymchuk S, Poslavskay O, Bereznyuk D. Analysis of Expression Markers Intracellular Adhesion in Patients with Oropharyngeal Squamous Cell Cancer. *The Advanced Science Journal*, 2014;12:15.
18. Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, Nomura M, Kamikawa Yi, Yonezawa S, Sugihara K. A noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2012;118(17):4298–4308.
19. Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS Journal*, 2010;277(1):74–80
20. Meneses IS, Souza RR, Jeraldo OVL, Cavalcanted RR, Reis FP, Albuquerque JRC. Death-associated protein kinase is underexpressed in high-grade oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Morphol*, 2010;28(2):609-613.
21. McCullough MJ, McCullough MJ, Prasad G, Zhao S, and Farah CS. The Changing Aetiology of Oral Cancer and the Role of Novel Biomarkers to Aid in Early Diagnosis MiRNAs. *Oral oncology*, book edited by Kalu U. E. Ogbureke, 2012. ISBN 978-953-51-0228-1.
22. Marcinkiewicz M, Katarzyna M; Gudas, Lorraine J. Epigenetic Changes in Retinoid Signaling in Oral Cavity Carcinogenesis . *Exp Cell Res*, 2014;320(1):128-43.
23. Rosas SLB, Koch W, Carvalho M, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter Hypermethylation Patterns of p16, O6-Methylguanine-DNA-methyltransferase, and Death-associated Protein Kinase in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Res*, 2001;61:39.
24. Wong YK, Lee LT, Liu CJ. Hypermethylation of MGMT and DAPK genepromoters is associated with tumorigenesis and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Sciences*, 2011;6(3):158-164.
25. Worsham MJ, Chen KM, Stephen JK, Havard S, Benninger MS. Novel approaches to global mining of aberrantly methylated promoter sites in squamous head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010;143:116–121.
26. Kaur J, Demokan S, Tripathi, SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2010;127:2367–2373
27. Yang Liu, Zeng-Tong Zhou, Qing-Bo He, Wei-Wen Jiang. DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. *Medical Oncology*, 2012;29(2):729-733.