Молекулни основи на ларингеалната карциногенеза и роля на промоторното хиперметиране

Molecular Basis of Laryngeal Carcinogenesis and the Role of Promoter Hypermethylation

Йорданов С¹, Цвеова Р², Горанова Т², Пиерини С², Генадиева М³,
Конов Д¹, Попов Т¹, Кънева Р², Рангачев Ю¹

¹УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ гр. София, Катедра по УНГ-болести

²МУ – София, Център по молекулна медицина и Катедра по медицинска химия и биохимия

³УМБАЛ „Александровска“, Клиника по обща и клинична патология

Yordanov S¹, Tzveova R², Goranova T², Pierini S², Genadieva M³,
Konov D¹, Popov T¹, Kaneva R², Rangachev Y¹

¹UMHAT „Tzaritza Yoanna-ISUL“, ENT Department

²Molecular Medicine Center and Department of Medical Chemistry and Biochemistry,
Medical Faculty, Medical University – Sofia

³UMHAT „Alexandrovskia“, Pathology Department

Резюме:

Карциномът на ларинкса в световен мащаб е най-честата малигнена неоплазма от областта на главата и шията. Редица фактори го превръщат от заболяване с много добри възможности за превенция, профилактика, ранна диагноза, лечение и добра прогноза в такова с висока инвалидизация и смъртност. Петгодишната преживяемост за ларингеалния карцином от 52% за периода 1950–1954 г. се е променила на 64,4% за периода 2003–2009 г. Какво стои в основата на този незадоволителен прогрес? В действителност се оказва, че докато етиологичните фактори на средата са вече подробно проучени, то молекулните основи на ларингеалната карциногенеза все още са неизвестни.

Summary:

Laryngeal cancer is the most common type of malignant head and neck tumor worldwide. A lot of factors turn it from a disease with very good opportunities for prevention, early diagnosis, successful treatment and good prognosis into a disabling one with high death rate. The five years survival from 52% for the period from 1950 to 1954 has changed to only 64.4% for the period from 2003 to 2009. What underlies this unsatisfactory progress? As a matter of fact while the etiological factors are well known, the molecular basis of laryngeal carcinogenesis remains unrevealed

Въведение

Карциномът на ларинкса в световен мащаб е най-честата малигнена неоплазма от областта на главата и шията. Неговите клинични изяви в зависимост от локализацията могат да бъдат много ранни, което е предпоставка за ранна диагноза и добра прогноза. Туморът дълго време остава ограничен от здравата хрущялна рамка на гръкляна. От друга страна, честотата на това заболяване и срещата на общопрактикуващите лекари с него не е висока, поради което проблемът с ранната диагностика остава нерешен. В ранните стадии симптоматиката се припокрива

Introduction

Laryngeal cancer is the most common type of malignant head and neck tumor worldwide. Depending on the localization the clinical symptoms could be manifested early in the course of the disease, which is a prerequisite for early diagnosis and favorable outcome. Also, the tumor is restricted for a long time by the strong cartilage cage. Nevertheless the frequency of that malignancy is not high, still there are problems with the early diagnosis among family doctors. Early symptoms overlap the chronic complains of smokers and alcoholics, which masks the real problem and leads to significant delay in

с хронични болестни състояния, характерни за пушачите и алкохолиците, което води до подценяване на проблема от страна на пациента и късното търсене на лекарска помощ. Всичко това превръща тази нозологична единица от заболяване с много добри възможности за превенция, профилактика, ранна диагноза, лечение и добра прогноза в такова с висока инвалидизация и смъртност. Петгодишната преживяемост за ларингеалния карцином от 52% за периода 1950–1954 г. се е променила на 64,4% за периода 2003–2009 г. Какво стои в основата на този незадоволителен прогрес? В действителност се оказва, че докато етиологичните фактори на средата са вече подробно проучени, то молекулните основи на ларингеалната карциногенеза все още са неизвестни.

Материали и методи

Направихме преглед на научните статии и проучвания по темата за молекулните основи на ларингеалната карциногенеза. Множество генетични и епигенетични механизми участват в трансформацията на нормалната клетка и превръщането ѝ в малигнена туморна клетка. Направихме преглед на публикациите в PubMed, като използвахме следните ключови думи: карцином на главата и шията, ларингеален карцином, генетика, епигенетика.

Резултати и дискусия

Ракът е втората по честота причина за смърт в света след сърдечносъдовите заболявания. Въпреки многото определения, може да твърдим, че точна дефиниция на понятието неоплазма все още няма. Според британския онколог Willis „Неоплазмата е абнормна тъканна маса, растежът на която изпреварва и не е координиран с този на нормалната тъкан, като персистира и след премахване на стимула, който го е предизвикал“ (37). Днес знаем, че това се дължи на акумулиране на нелетални генетични промени, които позволяват автономна, ексцесивна и неуправляема пролиферация на прекурсорна малигнена клетка. Естественото развитие на един злокачествен тумор преминава през 4 основни фази: 1. малигнена трансформация на таргетната клетка; 2. растеж на трансформираната клетъчна маса; 3. Локална инвазия; 4. метастазиране.

Няколко основни типа гени се увреждат при малигнената трансформация. Към тях може да

seeking medical help. All these facts turn the cancer of the larynx from a disease with very good opportunities for prevention, early diagnosis, successful treatment and good prognosis into a disabling one with high death rate. The five years survival from 52% for the period from 1950 to 1954 has changed to only 64.4% for the period between 2003 and 2009. What does underlie this unsatisfactory progress? As a matter of fact while the etiological factors are well known, the molecular basis of laryngeal carcinogenesis remains unrevealed.

Materials and Methods

We reviewed the published articles and studies concerning molecular basis of laryngeal carcinogenesis. A great number of genetic and epigenetic mechanisms are involved in transforming the normal cell into malignant one. A PubMed search was performed and the following terms were used: head and neck cancer, laryngeal cancer, genetic, epigenetic.

Results and Discussion

Cancer is the second most common cause of dead worldwide after cardiovascular diseases. Regardless of the many existing definitions of the term neoplasia there is no accurate one yet. According to the British oncologist Willis “Neoplasia is an abnormal mass the growth of which outpaces and is not coordinated with that of the normal tissue and persists even if the initiating stimulus is removed.” (37) Now we know that this is due to the accumulation of nonlethal genetic changes, which allow autonomous, excessive and uncontrolled proliferation of malignant precursor cell. The natural development of a malignant tumor passes through several phases: 1. Malignant transformation of a target cell; 2. Growth of the transformed cell mass; 3. Local invasion; 4. Metastatic spread.

Several types of genes are damaged during the malignant change. These include growth inducing

причислим растежиндуциращите протоонкогени, туморсупресорните гени, както и гените, регулиращи апоптозата и ДНК възстановяването. Карциногенезата е многостъпален процес и туморната прогресия на молекулно ниво често е свързана с натрупване на повече от една генетична увреда. Тук може да споменем няколко съществени клетъчни промени, стоящи в основата на този сложен процес:

- ♦ Туморните клетки имат способността да пролиферират без външни растежни стимули, като резултат от онкогенната активация.
- ♦ Друго свойство на злокачествените клетки е нечувствителността им към растежни инхибитори.
- ♦ Инактивацията на гени като p53 води до резистентност на тумора към апоптоза.
- ♦ Установяват се също така и дефекти в ДНК поправката.
- ♦ Важно условие за реализирането на растежния потенциал на неоплазмата е неоангиогенезата, индуцирана от фактори като VEGF и др.
- ♦ Тумориндуцираният възпалителен инфилтрат също участва в прогресията на заболяването. Например макрофагите отделят матриксни металопротеинази, които участват в разрушаването на компонентите на екстрацелуларния матрикс.

Всички тези събития обслужват локалната инвазия и метастазирането – най-характерните черти на злокачествените тумори.

Дефектите в ДНК поправката водят до натрупване на мутации в онкогени, туморсупресорни гени и гени, регулиращи апоптозата. Резултат от всичко това е неконтролирана клетъчна пролиферация, неосъществяване на апоптозата и клонална експанзия. Когато този клетъчен клон избегне защитата на имунната система, се стига до прогресивен растеж на тумора, спомогнат от разрастването на нова съдова мрежа. Допълнителните мутации са отговорни за придобиването на агресивните качества, като инвазивност и метастазиране.

Ключов момент в патогенезата на карциномите на главата и шията е възникването им върху широки пренеопластични полета от генетично променени епителни клетки, които са клонално свързани с първичния карцином и често се простират извън макроскопски и микроскопски чистите резекционни линии. Този феномен наре-

protooncogenes, tumor suppressor genes, apoptotic genes and DNA repair genes. The carcinogenesis is a multistep process and the tumor progression on molecular level often is due to more than one genetic aberration. Here we can mention several essential cell changes which are key events in this process:

- ♦ The tumor cells have the ability to proliferate without external growth stimuli, as a consequence of oncogenic activation.
- ♦ Another feature of the malignant cells is insensitivity to growth inhibitors.
- ♦ Inactivation of genes like p53 leads to apoptotic resistance.
- ♦ DNA repair defects are found as well.
- ♦ Important condition to realize the growth potential of the neoplasia is the neoangiogenesis induced by factors like VEGF and HIF (36)
- ♦ The tumor induced inflammatory infiltrate also takes part in the disease progression. For example the macrophages release matrix metalloproteinases which destroy the extracellular matrix.

All these events are important for the local invasion and metastatic spread – the most characteristic features of malignant tumors.

The disruption of DNA repair leads to accumulation of mutations in oncogenes, tumor suppressor genes and apoptotic genes. The results are uncontrolled cell proliferation, failure of apoptosis and clonal expansion. If the malignant cell line escapes the defense of the immune system, a progressive tumor growth follows, supported by neoangiogenesis. Additional mutations are responsible for acquiring aggressive features like invasiveness and metastasizing.

Key point in the pathogenesis of head and neck carcinomas is that they develop on wide preneoplastic fields of genetically changed epithelial cells, which are clonally connected with the primary tumor and are often spread over macroscopically and microscopically clear margins. This phenomenon called field cancerization is responsible for recurrences

чен канцеризация на полето стои в основата на рецидивите и възникването на други първични тумори при един и същи пациент. Този термин е въведен още през 1953 година от Slaughter et al. (5) По данни на Gao X. и колектив от 2003 г. пациентите с карцином на ларинкса имат 14% риск от развитието на втори първичен тумор до 5-та година, като на 10-та година рискът нараства до 26%, а до 15-та на 37% (7). Важен извод от казаното до тук е, че изготвянето на молекулен профил на карцинома на ларинкса би дало възможност за по-точна диагноза и прогноза по отношение риска. Карцинизацията на полето се обяснява с факта, че злокачественото израждане на клетките представлява един многостъпален процес (6). Той включва поредица от молекулно-генетични промени, придаващи в крайна сметка малигнения фенотип. Статистически анализ на карциномите на главата и шията показва, че за възникването им са необходими от 6 до 10 независими генетични увреди (8).

Основен момент в превръщането на една нормална клетка в малигнена е придобиването на неограничен потенциал за делене. Важна роля за това свойство играе нарушеният контрол на клетъчния жизнен цикъл. Клетъчни гени, наречени прото-онкогени, участват в регулацията на нормалната клетъчна пролиферация. Дефекти в тези гени могат да ги превърнат в онкогени, отключващи неопластичен растеж. Клетъчният цикъл представлява строго контролирана последователност от процеси, имаща основна роля в клетъчната регенерация. Той е подложен на многостъпални регулаторни механизми. Такъв контрол при преминаването на клетката от G1 в S фазата се осъществява от протеини, наречени циклини и свързани с тях ензими – циклин-зависими кинази (CDKs). Активността Cyclin – CDK се контролира от CDK-инхибитори. Съществуват и механизми, които следят за грешки в ДНК репликацията. При установяването на такива се активират ДНК репарационни процеси или клетката се унищожава чрез апоптоза, медирана от p53-зависими механизми. Нарушаването на тези стриктно контролиращи процеси може да доведе до аномалии и малигнена трансформация.

Някои от генетичните механизми, включени в неопластичната трансформация и прогресията на ПККЛ, все още остават неизяснени. Наблюдават се както инактивация на тумор-супресор-

and second primary tumors in the same patient. The term has been first introduced in 1953 by Slaughter et al. (5). According to the data of Gao X et al. from 2003, patients with laryngeal cancer have 14% risk of developing second primary cancer by the fifth year of diagnosis, at 10th year the risk increases to 26% and at 15th year – to 37% (7). An important conclusion of what was said is that molecular profiling of laryngeal cancer will give us the opportunity of more accurate diagnosis and risk prediction. Field cancerization explains the fact that malignant transformation of the cells is a multistep process (6). It includes a sequence of molecular genetic changes giving the malignant phenotype. Head and neck cancer data show that 6 to 10 independent genetic aberrations are needed for its development (8).

Acquiring an unrestricted division potential is a key moment in transferring a normal cell into malignant one. Cell cycle disrupted control plays an important role in this event. Cell genes called protooncogenes take part in the regulation of the normal cell proliferation. Defects in these genes turn them into oncogenes giving rise to neoplastic growth. Cell cycle is a strictly controlled sequence of events that plays a main role in cell regeneration. It is controlled by multiple regulatory mechanisms. Such control during G1 to S-phase transfer is exerted by proteins called cyclins and connected to them enzymes – cyclin dependent kinases (CDKs). The activity of Cyclin-CDK is under the control of CDK-inhibitors. There are surveillance mechanisms which detect DNA replication mistakes. Such changes activate DNA-repair processes or the cell is destroyed by p53 mediated apoptosis. Disruption of these strictly controlled processes can lead to anomalies and malignant transformation.

Some of the genetic events in the neoplastic transformation and progression of the head and neck cancer still remain unrevealed. Tumor suppressor genes like p53 and CDKN2A are inactivated in

ни гени като TP53 и CDKN2A в около 50% от случаите, така и онкогенна активация, която обаче е по-слабо проучена (9). Съществуват няколко основни механизма за потискане експресията на тумор-супресорните гени, имащи отношение към етиологията на ларингеалния карцином. Първият се основава на мутации от типа точкови мутации, делеции и транслокации (10). Друг основен механизъм е ДНК метилирането на CpG – островите в промоторната област на гените. Промоторното хиперметиране е важен епигенетичен механизъм, който има критична роля в регулацията на генната експресия и поддържане на клетъчните функции (11). По този механизъм в процеса на ларингеалната туморогенеза се инактивират важни туморсупресорни гени и такива, отговорни за ДНК възстановяването, без да се променя кодиращата последователност (1, 12).

Характерно за промоторното метилиране е, че то участва и в процесите на контрол на експресията на тъканно специфични гени и по този начин – в процеса на клетъчна диференциация (13). То стои в основата и на геномния импринтинг, като осигурява моноалелната експресия на гените, като блокира единия от двата родителски алела (14). Метилирането има и стабилизиращ ефект върху ДНК (15). Т.е. ДНК метилирането не е патологичен, а нормален физиологичен процес.

Защо при едни тумори се наблюдава подчертано хиперметиране, а при други не? Този въпрос продължава да ни вълнува. Според едни автори това се дължи на все още неоткрити хиперметиранни гени за съответния вид тумор, а според други по-изразено хиперметиране се наблюдава при тумори в региони, изложени на по-голяма експозиция на външни канцерогени, както е карциномът на ларинкса (16, 17).

Процесът на метилиране на туморсупресорни гени, участващи в контрола на клетъчния цикъл (p16, p14 и др.) (18, 19, 20, 21), ДНК репарационните системи (MLH1, MGMT, BRCA1) (22, 23), апоптозата (DAPK, APAF-1, p14ARF), хормоналният отговор (RARb2) и клетъчната адхезия (CDH1, CDH3), се явява отключващ патогенетичен механизъм на туморогенезата. От друга страна, ДНК хипометилирането води до хромозомна нестабилност, загуба на геномен импринтинг, повишаване честотата на делециите и транслокациите, като всичко това

about 50% of the cases and also oncogenes might be activated, which is however less studied (9). There are several mechanisms for the inactivation of the expression of tumor suppressor genes which play a role in the etiology of laryngeal cancer. The first is based on mutations – point mutations, deletion and translocations (10). The other is methylation of the CpG islands in the promoter regions of genes. The promoter hypermethylation is an important epigenetic mechanism, which plays a crucial role in the regulation of gene expression and maintenance of cell functions (11). In the process of laryngeal tumorigenesis epigenetic mechanisms are used for inactivation of important tumor suppressor genes and genes responsible for DNA repair without any change in the coding sequence (1, 12).

The promoter methylation takes part in the control of the expression of tissue specific genes and in this way - in the process of cell differentiation (13). It is the basis of genome imprinting assuring monoallelic expression of the genes by inhibition of one of the parental alleles (14). Methylation has stabilizing effect on DNA too (15). That means that DNA methylation is not a pathologic but a normal physiologic process.

Why in some tumors marked hypermethylation is observed while it is not present in others? This question still excites us. According to some authors it is due to still undiscovered hypermethylated genes; according to others promoter hypermethylation is found in the tumors localized in regions that are exposed to high levels of external carcinogens, like laryngeal cancer (16, 17).

The process of methylation of tumor suppressor genes participating in the cell cycle control (p16, p14 etc.) (18, 19, 20, 21), DNA repair systems (MLH1, MGMT, BRCA1) (22, 23), apoptosis (DAPK, APAF-1, p14ARF), hormonal response (RARb2) and cell adhesion (CDH1, CDH3) appears to be the initiating mechanism of tumorigenesis. On the other hand the DNA hypomethylation drives chromosomal instability, loss of genomic imprinting, raises the frequency of the deletions and translocations and all of this increases the risk of malignant degeneration (24, 25, 26, 27).

повишава риска от малигнена дегенерация. (24, 25, 26, 27).

Съществува голям интерес в търсенето на терапевтични агенти с деметилиращи свойства, които да активират инхибираните чрез процеса на хиперметиране тумор-супресорни гени. Деметилирането води до многообразни ефекти. Деметилирането на MLH1 например се последва от активацията на този ген и повишаване на чувствителността към химиотерапия. По подобен начин деметилирането и реактивирането на E-cadherin, MYOD, туморни антигени, DAPK1 и p16 води до клетъчна адхезия и диференциация, повишена имуногенност на туморните клетки, индукция на апоптозата и инхибиране на неконтролирания клетъчен растеж. Потенциален проблем пред подобен новаторски подход при лечението на злокачествените неоплазми се явява установената хромозомна нестабилност при геномно хипометилиране. Това води до индукцията на тумори при опитни мишки, което е и поредното доказателство, че епигенетичните промени имат съществена роля в туморогенезата (28). Освен това при потенциално активиране на туморсупресорни гени при деметилиращата терапия съществува реална възможност за активиране и на онкогени, потиснати по механизма на промоторното метилиране.

Епигенетични и генетични увреди имат доказана роля в карциногенезата на ларингеалния карцином и на карциномите на главата и шията като цяло (29, 30). Промоторното хиперметиране е един от важните фактори при възникването на рака на гръкляна (31, 32, 33). По данни от публикуваната досега литература най-често инхибираните гени по този механизъм при карцинома на ларинкса са CDKN2A, MGMT, MLH1 и DAPK (29, 30, 31, 34, 35).

Изключително важно е да се отбележи, че съществуват потенциални възможности промоторното хиперметиране да се използва за диагностика и проследяване на ларингеалния карцином. То е ДНК маркер, който се унаследява стабилно в поколението туморни клетки за разлика от маркерите, базирани на РНК и белтъци. Освен това е позитивно в над 70% от малигнените неоплазми на главата и шията. То има и постоянна позиция в генома за разлика от повечето мутации. Посредством метилспецифичен PCR може да се открият метилирани ДНК последователности, отделени в слюнката

A great interest exists in searching of therapeutic agents with demethylating properties, which can activate the inactivated by hypermethylation tumor suppressor genes. Demethylation has many effects. Demethylation of MLH1 for example activates the gene, which increases the sensitivity of the tumor to chemotherapy. In a similar fashion demethylation and reactivation of E-cadherin, MYOD, tumor antigens, DAPK1 and p16 leads to cell adhesion and differentiation, increased immunogenicity of the tumor cells, induction of apoptosis and inhibition of uncontrolled cell growth. The revealed chromosomal instability in case of DNA hypomethylation is a potential problem in front of this innovative approach for cancer treatment. This causes induction of tumors in lab mice, which is evidence that epigenetic changes have important effect on tumorigenesis (28). Moreover, beside activation of tumor suppressor genes during demethylation therapy, there is a risk of activation of oncogenes inactivated by promoter hypermethylation.

Epigenetic and genetic aberrations have proven role in carcinogenesis of laryngeal cancer and cancers of the head and neck (29, 30). Promoter hypermethylation is among the important factors for laryngeal cancer development (31, 32, 33). According to the data published in the literature so far the most often inhibited genes by this mechanism are CDKN2A, MGMT, MLH1 and DAPK (29, 30, 31, 34, 35).

It is very important to mention that, there are potential opportunities for using promoter methylation for diagnosis and laryngeal cancer follow up. It is a DNA marker, which is steadily inherited by the tumor cells generation in contrast to the markers based on RNA and proteins. Moreover it is positive in more than 70% of head and neck neoplasms. It has also permanent position in the genome in contrast to most mutations. Methylated DNA sequences released in the serum and saliva by the tumor could be detected by methyl specific PCR. We should not forget that DNA methylation is a reversible process and could be influenced by

и серума от злокачествения тумор. Не бива да забравяме, че ДНК-метирирането е обратим процес, т.е. може да се повлияе от деметиращи агенти и да бъде обект на специфична прицелна противотуморна терапия.

Изводи

По епидемиологични данни ракът на ларинкса на микроскопско ниво е хомогенно заболяване, като над 95% от случаите се дължат на плоскоклетъчен карцином. На клинично ниво обаче се оказва, че той има доста хетерогенно биологично поведение, което често не се припокрива с общоприетите патохистологични и клинични класификации. Остават все още много нерешени въпроси по отношение на прогнозата, ефикасността на лечението и ранната диагностика. Непрестанното търсене на отговори на тези въпроси доведе до извода, че зад привидно еднородното заболяване се крие подчертана хетерогенност както на клинично, така и на молекулно ниво (2, 3, 4).

В заключение може да кажем, че разкриването на детайлните молекулни механизми на ларингеалната карциногенеза би ни дало предимството, което ни е нужно в борбата с това заболяване.

Библиография

1. Stefano Pierini, MSc; Stanislav H. Jordanov MD; Atanaska V. Mitkova, PhD; Ivan J. Chalakov, MD, PhD; Mincho B. Melnicharov, MD, PhD; Kuncho V. Kunev, MD, PhD; Vanio I. Mitev, MD, PhD; Radka. P Kaneva, PhD; Teodora E. Goranova, PhD ; Promoter Hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1 and DAPK genes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. Head and Neck 2014 Aug; 36(8): 1103-8. doi: 10.1002/hed.23413. Epub 2013 Oct 7.
2. Chung C.H. et al Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. Cancer cell 5, 489-500 (2004).
3. Hopkins. J et al Genetic polymorphism and head and neck cancer outcomes: a review. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 17, 490-499 (2008).
4. Smeets. S. J. et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. Cell. Oncol. 31. 291-300 (2009).
5. Slaughter, D.P., Southwick, H. W. and Snejkal, W.: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer 6, 963-968 (1953).
6. Smeets S.J., Braakhuis B.J.M., Abbas S. et al.; Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. Oncogene (2006) 25, 2558-2564, Nature Publishing Group.

demethylating agents, which makes it a good object for target therapy.

Conclusions

Based on epidemiological data laryngeal cancer on microscopic level is homogenous disease with squamous cell carcinoma accounting for more than 95% of the cases. On clinical base it turns out to have heterogeneous biological behavior, which is not in keeping with histological and clinical classifications. There are a lot of pending questions on prognosis, effectiveness of treatment and early diagnosis. A constant search of answers led to the conclusion, that marked heterogeneity on clinical and molecular level is hidden behind seemingly homogenous illness. (2, 3, 4)

In conclusion we can say that revealing the detailed molecular mechanisms of laryngeal carcinogenesis would give us the advantage we need to battle this disease.

References:

1. Stefano Pierini, MSc; Stanislav H. Jordanov MD; Atanaska V. Mitkova, PhD; Ivan J. Chalakov, MD, PhD; Mincho B. Melnicharov, MD, PhD; Kuncho V. Kunev, MD, PhD; Vanio I. Mitev, MD, PhD; Radka. P Kaneva, PhD; Teodora E. Goranova, PhD ; Promoter Hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1 and DAPK genes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. Head and Neck 2014 Aug; 36(8): 1103-8. doi: 10.1002/hed.23413. Epub 2013 Oct 7.
2. Chung C.H. et al Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. Cancer cell 5, 489-500 (2004).
3. Hopkins. J et al Genetic polymorphism and head and neck cancer outcomes: a review. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 17, 490-499 (2008).
4. Smeets. S. J. et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. Cell. Oncol. 31. 291-300 (2009).
5. Slaughter, D.P., Southwick, H. W. and Snejkal, W.: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer 6, 963-968 (1953).
6. Smeets S.J., Braakhuis B.J.M., Abbas S. et al.; Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. Oncogene (2006) 25, 2558-2564, Nature Publishing Group.

7. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, et al. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 427-35.
8. Myriam Loyo, Sara I. Pai. The Molecular Genetics of Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Clin N Am* 41 (2008) 657-672.
9. Nadal A, Cardesa A: Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003, 442(1): 1-7.
10. Davis CD, Uthus EO: DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 2004, 229(10): 988-995.
11. Esteller M: Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics* 2007, 16 Spec No 1: R50-59.
12. Esteller M: Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4: 351, 2003.
13. Futscher B.W., Oshiro M.M., Wozniak R.J., Holtan N., Haniagan C.L., Duan H., Domann F.E. : Role for DNA methylation in the control of cell type specific MASPIN expression. *Nat Genet.*, 31,175-179 (2002).
14. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R: DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Seminars in cancer biology* 2002, 12(5): 389-398.
15. Bestor TH. Transposons reanimated in mice. *Cell* 2005; 122: 322-5.
16. Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nat. Genet.* (2000), 24, 132-138.
17. Esteller M, Corn P.G., Baylin S.B. and Herman J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* (2001), 61, 3225-3229.
18. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9700-4.
19. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. *Nat Med* 1995; 1: 682-92.
20. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-30.
21. Gonzales-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5'CpG island of p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissue correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; 55: 4531-5.
22. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl. J Med* 2003; 349: 2042-54.
23. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 564-9.
24. Karpf AR, Matsui S, Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8635-9.
25. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* 1999; 59: Suppl:1743s-1746s.
26. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299: 1753-55.
27. Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 2005; 65: 11236-40.
28. Feinberg AP: Genomic imprinting and cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd edition, New York, McGraw- Hill, 2002, p 43-55.
29. Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J Otolaryngolog* 2005; 26(1): 12-7.
7. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, et al. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 427-35.
8. Myriam Loyo, Sara I. Pai. The Molecular Genetics of Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Clin N Am* 41 (2008) 657-672.
9. Nadal A, Cardesa A: Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003, 442(1): 1-7.
10. Davis CD, Uthus EO: DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 2004, 229(10): 988-995.
11. Esteller M: Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics* 2007, 16 Spec No 1: R50-59.
12. Esteller M: Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4: 351, 2003.
13. Futscher B.W., Oshiro M.M., Wozniak R.J., Holtan N., Haniagan C.L., Duan H., Domann F.E. : Role for DNA methylation in the control of cell type specific MASPIN expression. *Nat Genet.*, 31,175-179 (2002).
14. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R: DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Seminars in cancer biology* 2002, 12(5): 389-398.
15. Bestor TH. Transposons reanimated in mice. *Cell* 2005; 122: 322-5.
16. Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nat. Genet.* (2000), 24, 132-138.
17. Esteller M, Corn P.G., Baylin S.B. and Herman J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* (2001), 61, 3225-3229.
18. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9700-4.
19. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancer. *Nat Med* 1995; 1: 682-92.
20. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-30.
21. Gonzales-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5'CpG island of p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissue correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; 55: 4531-5.
22. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl. J Med* 2003; 349: 2042-54.
23. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 564-9.
24. Karpf AR, Matsui S, Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8635-9.
25. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res* 1999; 59: Suppl:1743s-1746s.
26. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299: 1753-55.
27. Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 2005; 65: 11236-40.
28. Feinberg AP: Genomic imprinting and cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd edition, New York, McGraw- Hill, 2002, p 43-55.
29. Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J Otolaryngolog* 2005; 26(1): 12-7.

30. Sasiadek MM, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Ramsey D, Kayademir T, blin N. Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. *Br. J Cancer* 2004; 90(8): 1594-9.
31. Wong TS, Gao W, Li ZH, Chan JY, Ho WK. Epigenetic dysregulation in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Oncol* 2012; 2012: 739461.
32. Makitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1251-60.
33. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstorm E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21(27): 4231-6.
34. Paluszczak J, Misiak P, Wierzbička M, Wozniak A, Baer-Dubowska W. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa. *Oral Oncol* 2011;47(2):104-7.
35. Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promotor hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(5): 548-53.
36. Popov TM, Goranova TE, Stancheva G, Kaneva RP, Dikov T, Chalakov I, Rangachev J, Konov D, Todorov S, Stoyanov O, Mitev V (2014) Relative quantitative expression of HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α and VEGF-A in laryngeal carcinoma. *Oncology Letters*.
37. Willis RA: The spread of Tumors in the Human Body. London, Butterworth & Co, 1952.
30. Sasiadek MM, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Ramsey D, Kayademir T, blin N. Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. *Br. J Cancer* 2004; 90(8): 1594-9.
31. Wong TS, Gao W, Li ZH, Chan JY, Ho WK. Epigenetic dysregulation in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Oncol* 2012; 2012: 739461.
32. Makitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1251-60.
33. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstorm E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21(27): 4231-6.
34. Paluszczak J, Misiak P, Wierzbička M, Wozniak A, Baer-Dubowska W. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa. *Oral Oncol* 2011;47(2):104-7.
35. Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promotor hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(5): 548-53.
36. Popov TM, Goranova TE, Stancheva G, Kaneva RP, Dikov T, Chalakov I, Rangachev J, Konov D, Todorov S, Stoyanov O, Mitev V (2014) Relative quantitative expression of HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α and VEGF-A in laryngeal carcinoma. *Oncology Letters*.
37. Willis RA: The spread of Tumors in the Human Body. London, Butterworth & Co, 1952.