

ZÁRÓJELENTÉS 2004-2007

„A MOLEKULÁRIS ONKOGENEZIS MECHANIZMUSAI GYAKORI DAGANATOKBAN” C. PÁLYÁZAT TELJESÍTÉSÉRŐL

EREDMÉNYEK

Munkacsoportunk úttörő szerepet játszott a molekuláris onkológiai (onkogenetikai) kutatások hazai és térségbeli bevezetésében (Oláh, Magy Onkol, 2007). Jelen OTKA pályázati támogatással a két évtizede megkezdett kutatásokat fejlesztettük tovább, amelyek fő célkitűzése új molekuláris rákgenetikai ismeretek szerzése a molekuláris onkogenezis részleteinek feltárására, különös tekintettel a rák iránti fokozott genetikai fogékonyság molekuláris tényezőinek megismerésére. Vizsgálataink a Magyarországon gyakori daganatos megbetegedésekre (emlőrák, vastagbélrák, ivarszervi daganatokra) irányultak. Jelen OTKA pályázat támogatásával született eredményeinket az alábbiakban ismertetjük.

1. A BETEGSÉGHAJLAMOT ÖRÖKÍTŐ GENETIKAI VÁLTOZÁSOK KIMUTATÁSA FAMILIÁRIS DAGANATOS MEGBETEGEDÉSEKBEN

A daganatos megbetegedésekre predisponáló genetikai változások legnagyobb valószínűséggel a családi halmozódású daganatos megbetegedésekben mutathatók ki, ezért a kutatási program egyik fő területe volt a daganatos betegség hajlamot meghatározó öröklött mutációk megismerése familiáris megbetegedésekben. 1992 óta kialakított biobankunkban több olyan család mintája található, amelyekre – a halmozottan előforduló daganatok alapján – különböző daganatszindróma leírása illik. A beszámolási időszakban tanulmányozott szindrómák: örökletes emlő- és petefészekrák, hereditér nem polyposis talaján kialakuló colorectalis carcinoma (HNPCC), Peutz-Jeghers szindróma és familiáris adenomatous polyposis (FAP).

1.1. BRCA1 és BRCA2 gének öröklött meghibásodásai emlőrákos/petefészekrákos családokban

Továbbra is kitüntetett figyelmet fordítottunk az emlő- és petefészekrák szindrómák túlnyomó többségéért felelős BRCA1 és BRCA2 gének tanulmányozásának. A vizsgálatok kezdete óta közel 400 emlő- petefészekrákos családot azonosítottunk, ezek közül a beszámolási időszakban 82 családot elemeztünk a BRCA gének öröklött mutációinak jelenlétére SSCP, HDA, és közvetlen DNS-szekvencia elemzési módszerekkel. A vizsgálatok kezdete óta 86-féle szekvencia változást azonosítottunk a BRCA1 és a BRCA2 génen. BRCA1 génben 37-féle különböző variánst figyeltünk meg, amiből 18 káros mutációnak, 4 besorolatlan variánsnak, és 15 ártalmatlan polimorfizmusnak bizonyult. A BRCA2 génben összesen 49-féle különböző variánst figyeltünk meg, ebből 17 mutáció, 18 besorolatlan variáns és 14 polimorfizmus volt.

A mutációk a két gén teljes hosszában elszórtan találhatóak, különösen a BRCA2 gén esetében. Azonban a BRCA1 gén 3 pontján (2., 5. és 20. exon), a BRCA2 gén 2 pontján (11.11 exon, 23. exon) figyelhető meg a mutációk jelentősebb halmozódása.

A BRCA mutációkra negatív családok DNS mintáit új módszer, az MLPA (Multiplex, Ligáció-függő Próba amplifikáció) bevezetésével kezdtük el elemezni a hagyományos PCR-alapú vizsgálatokkal nem azonosítható nagyobb deléciók és átrendeződések kimutatására.

Egy másik új módszert is beállítottunk, ez a DHPLC (denaturáló nagyfelbontású folyadékromatográfiás rendszer). A két új módszerrel még közel 100, eddig negatív BRCA családot vizsgáltunk és 4 új kóroki mutációt azonosítottunk a BRCA1 génben (2530delAG, 2706delG, 4020delAG, 4184delA, ezek közül a 2706delG nemzetközi adatbázisokban sem szerepel).

A BRCA1 mutációt hordozók és családtagjaik genetikai és klinikai adatait nemzetközi együttműködésben meta-analízisnek vetettük alá a hordozók rákkockázatának és a BRCA mutációkkal kapcsolatos daganatok fenotípusának pontosabb meghatározására. Eredményeink: 1) A nemzetközi munkacsoport közölte a ma ismert legpontosabb kockázati adatokat a multifaktoriális etiológiájú örökletes emlőrákok vonatkozásában. 2) Értékeljük a terhesség és a szoptatás szerepét a BRCA mutációt hordozók betegségének prevenciójában. 3) Leírtuk a BRCA1 mutációt hordozók molekuláris patológiai jellemzőit.

Publikáció:

Oláh: In: New trends..., 2004

Antoniou és mtsai, J Med Genet, 2005

Lakhani és mtsai, Clin Cancer Res, 2005

Oláh: Magy Tud, 2005

Andrieu és mtsai, J Natl Cancer Inst, 2006

Az eredményeket 1200 sporadikus előfordulású emlőrákos beteg mintáin végzett elemzés eredményével együtt összefoglaló tanulmányban tervezzük publikálni 2008-ban.

1.2. A mérsékelt rákkockázatot jelentő CHEK2 gén allélvariánsai feltérképezése emlőrákos családokban

A CHEK2 egy, a sejtciklus ellenőrző mechanizmusában részt vevő "checkpoint" fehérje, mely fontos szerepet játszik a DNS-ben kódolt genetikai tartalom megővésében. A CHEK2 csírvonalas mutációit számos különféle rákos megbetegedéssel hozták összefüggésbe. Az emlőrákra nézve legjelentősebb mutációja a 10. exonban elhelyezkedő 1100delC, mely a fő hajlamosító génekhez (BRCA1, BRCA2) képest kis penetranciájú ugyan, de a skandináv térségben populációs szinten is viszonylag gyakori (1,5-2%), familiáris emlőrákos esetekben pedig 4-5%. Célunk volt, hogy feltérképezzük a magyarországi emlőrákos populációban a CHEK2 csírvonalas mutációit különös tekintettel az 1100delC allélra.

Módszer: 147 olyan emlőrákos családot vizsgáltunk, ahol a betegség 60 éves kor előtt jelentkezett és ennek ellenére nem találtunk BRCA1/2 csírvonalas mutációt.

A mutáció-analízist a CHEK2 gén 14 kódoló exonjára végeztük el mutációs előszűrő-módszerekkel: SSCP (egyszálú konformációs polimorfizmus) HDA (heteroduplex analízis) valamint DHPLC (denaturáló, nagyfelbontású folyadék-kromatográfia) technikákkal. Az így módon talált eltéréseket direkt szekvenálással azonosítottuk.

Eredmények: Egyetlen esetben sem fordult elő az 1100delC allél. Hat betegnél azonosítottunk T470C mutációt. Egy esetben figyeltünk meg 444 + 1G>A splice site mutációt, további egy esetben észleltünk A252G neutrális hatású elváltozást és néhány, már leírt polimorfizmust.

Következtetések: Az 1100delC mutáció előfordulási gyakorisága Magyarországon nem jelentős, szűrése nem indokolt. A T470C elváltozás azonban más országokban mért adathoz

(1-2%) képest gyakoribb (4%). Vizsgálatát érdemes kiterjeszteni más típusú rákszindrómákra is.

Publikáció:

Bozsik és mtsai, Magy Onkol, 2005

Bozsik és mtsai, Proc EACR, 2006

1.3. Örökletes, nem polyposis talaján kialakuló colorectalis daganatszindrómák (HNPCC) genetikája Magyarországon

Hosszútávú célkitűzésünk, hogy megismerjük a daganatszindrómák nagypenetranciájú génjeinek szerepét a hazai örökletes daganatok kialakulásában, ezért megkezdtük az APC és a mutátor gének (MLH1, MSH2) daganatos megbetegedésekre hajlamosító öröklött hibáinak feltárását familiárisan halmozódó vastagbélrák szindrómákban.

1.3.1. A családi daganatszindrómák közül a leggyakoribb, örökletes vastagbélrák megjelenésével járó tünetcsoport a Lynch-szindróma (HNPCC). Kialakulásának hátterében a DNS hibás bázispárosodását javító úgynevezett mismatch-repair (MMR) rendszerhez tartozó gének öröklődő hibái állnak. Vizsgálataink célja magyarországi Lynch-szindrómás családok feltérképezése új, más populációkban eddig meg nem talált variánsok több szintű karakterizálása (DNS, RNS, fehérje és funkciója, a mutáció szegregációja a családban), ezzel patogén hatásuk igazolása volt.

Módszerek: A vizsgálatba beleegyező 36 Lynch-szindrómás család tagjainak vérmintáiból DNS-t nyertünk ki, majd ezt kombinált mutációvizsgálatnak vetettük alá. Az új variánsokat hordozó betegek archív tumormintáin immunhisztokémiai (IHC) majd mikroszatellita-instabilitás (MSI) vizsgálatot végeztünk. Az aminosavcserével járó, valamint az mRNS átszerkesztését érintő változások esetében elvégeztük az adott variáns in silico érékelését is.

Eredmények: A vizsgált 36 családban 19 szekvenciavariánst tudtunk kimutatni, ezek közül 10 új, ebből 4 a kópiaszámban bekövetkezett változás volt. Ezeknél magasfokú mikroszatellita instabilitást mutató fenotípust 7 esetben találtunk, egybevéve az immunhisztokémiai eredményekkel. 2 beteg esetében az IHC/MSI vizsgálat folyamatban van, egy esetben a megfelelő anyag hiánya miatt nem volt lehetőség sem a fehérje jelenlétének, sem a mutáció hatásának vizsgálatára. Ebben az esetben az in silico vizsgálatok támasztották alá az adott variáns patogén voltát.

A HNPCC kialakulásának hátterében többféle különböző mechanizmus állhat, főként az MMR rendszer 5 tagjának pontmutációi és nagy genomi átrendeződései. A közelmúltban leírt ritka inaktivációs mechanizmusokat is figyelembe véve sincs bizonyíték a hajlamosító allél jelenlétére a klinikopathológiailag jól körülhatárolt HNPCC családok egy jelentős részénél. Ez egyéb, a betegség kialakításában szerepet játszó mechanizmusok, többek között a génen kívül előforduló mutációk jelenlétét valószínűsíti.

Csoportunk a HNPCC klinikai kritériumainak megfelelő néhány családban kimutatott az MSH2-től távol, 5' irányban, a TACSTD1 génben található nagy genomi deléciókat, amelyek a funkcionális karakterizálás eredményei alapján a szindrómára hajlamosító mutációknak tekinthetők. Ezzel a nemzetközi viszonylatban is újdonságnak számító eredménnyel a HNPCC-s családok genetikai hátterének jobb megismerése felé tettünk jelentős lépést. Kutatási eredményeink közzlése folyamatban van.

Publikáció:

Papp és mtsai, World J Gastroenterology, 2007
Kovács és mtsai, Magy Onkol, 2007

1.4. Az STK11 gén új hajlamosító alléljei hazai Peutz-Jeghers szindrómás családokban

A Peutz-Jeghers szindróma (PJS) egy autoszomális dominánsan öröklődő tünetegyüttes, amelynek fő jellemzői a hamartómás bélpolipózis és a nyálkahártyák pigmentációjának megváltozásai. A PJS többféle neoplázia megnövekedett kockázatával jár, a megbetegedés hátterében az STK11 gén csíravonalas mutációi állnak. Vizsgálataink célja a szindróma genetikai vizsgálatának beállítása után az STK11 mutációk magyarországi spektrumának feltérképezése és a mutációk jellemzése volt.

Eredmények: A vizsgált 11 család index pácienseinek mintáiban minden esetben sikerült kimutatnunk a betegség hátterében álló csíravonalas patogén STK11 mutációt, amely 3 esetben az exon-intron határt érintve a gén aberráns RNS-szintű kifejeződését okozza, 3-3 esetben nonszensz mutációnak, illetve kisebb deléciónak bizonyult, további 2 esetben pedig hosszabb szakaszok kiesésével járt. A családok beteg és nem beteg tagjainak célirányos mutációvizsgálatát is elvégeztük.

Publikáció:

Papp és mtsai, Magy Onkol, 2007

2. HERERÁKRA HAJLAMOSÍTÓ ÚJ GENETIKAI VÁLTOZÁSOK MEGISMERÉSE

A csírasejtes hererák (TGCT) a fiatal férfiak leggyakoribb daganatos betegsége. Régóta ismert a betegség gyakori családi halmozódása, ami felvetette a genetikai komponens szerepét, azonban vizsgálataink megkezdése előtt nem sikerült olyan genetikai változásokat kimutatni, amelyek ezt a feltételezést alátámasztanák.

Hererákos családokon – nemzetközi együttműködésben – végzett genomszintű szűréssel sem sikerült nagy penetranciájú hajlamosító génváltozást kimutatni. Munkacsoportunk arra a következtetésre jutott, hogy ezekben az esetekben több, kis penetranciájú génhatás összeadódása játszik szerepet.

Publikáció:

Crockford és mtsai, Hum Mol Genet, 2006

2.1. A hererákra hajlamosító első örökölt DNS szekvencia változás felfedezése

Nemzetközi együttműködésben végzett kutatásainkkal hozzájárultunk a hererákra hajlamosító első örökölt DNS szekvencia változás (Y kromoszóma mikrodeléció) azonosításához. Az emberi Y kromoszóma számos gént hordoz, amely szerepet játszik a férfiak csírasejtjeinek fejlődésében. Az utóbbi időben 1,6 Mb nagyságú deléciót mutattak ki, az Y kromoszóma AZFc régiójában. Erről a „gr/gr” delécióról kiderült, hogy kapcsolatban van a férfi meddőséggel. Nemzetközi vizsgálatainkban azt a hipotézist fogalmaztuk meg, hogy a gr/gr deléció jelenléte összefügghet a TGCT típusú hererák kialakulásával. Nagy betegszériában vizsgáltuk az összefüggés lehetőségét.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a gr/gr deléció jelenléte kétszeresére növelte a rákkockázatot (illesztett „odds ratio” [aOR] 2.1; 95% confidence interval [CI] 1.3-3.6; P=.005). A családirag halmozódó esetekben háromszoros kockázatnövelést lehetett kimutatni, (aOR 3.2; 95% CI 1.5-6.7; P=.0027). A gr/gr deléció szorosabb összefüggést mutatott a seminomával mint a nem seminoma típusú daganatokkal. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az Y kromoszóma gr/gr mikrodeléciója ritka, alacsony penetranciájú allél, amely azonban hajlamosít csírasejtes hererákra.

Publikáció:

Nathanson és mtsai, Am J Hum Genet, 2005

2.2. Az Y kromoszóma gr/gr deléciójának szerepe a bilaterális hererák kialakulásában

62 bilaterális csírasejtes hererák és 400 anonim kontroll mintában próbáltunk összefüggést találni az Y kromoszóma gr/gr mikrodeléciója és a betegség kétoldali megjelenése között, azonban az alacsony mintaszám miatt nem lehetett egyértelmű összefüggést megállapítani.

Publikáció:

Papp és mtsai, Proc EACR, 2006

2.3. A Testisin, mint lehetséges hajlamosító gén vizsgálata hazai hererákos esetekben

A Testisin gén (PRSS21) egy glikozil-foszfatidil-inozitolhoz kötött szerin proteáz kódol. Expressziós vizsgálatok alapján a Testisin egy lehetséges tumorsuppresszor gén, amely mindkét alléljának inaktiválódása által járulna hozzá a hererák kialakulásához. Az egyik allél öröklött hibája a másik allél funkciójának az adott szövet egyes sejtjeiben történő kiesésével (a heterozigóta állapot elvesztésével) párosulva teljesen inaktiválhat egy, a kérdéses szövetben tumorsuppresszorként működő gént. Mivel a Testisin egy olyan régióban helyezkedik el, amely más típusú daganatok sejtjeiben bizonyítottan hordoz mutációkat és deléciókat, fennáll annak a lehetősége, hogy az egyik allél öröklött hibája a here csíraszövet eredetű tumorai esetében is fontos tényezője a tumorok kialakulásának.

Eredmények: A Testisin gén hat exonja közül háromban találtunk a referenciaszekvenciához képest eltérő változatot, amelyek közül az 1. exonban előforduló variáns aminosavcserét okoz (c.52C>A, p.Leu18Ile). Az ezt hordozó allél gyakorisága a daganatos mintákban 1,25% volt (1 heterozigóta 40 mintában), míg az egészséges kontrollokban nem fordult elő. Az intronikus változatok közül kiemelendő a 4. intron területén található c.551-6G>A variáns, amely esetében a báziscsere az 5. exon „splice acceptor” helyét módosíthatja. Ennek allélját 5,55% (2/18) gyakoriságúnak találtuk az általunk vizsgált daganatos populációban. A 2. intronban négy különböző, adatbázisokban nem szereplő változás is megfigyelhető volt, közel azonos helyen és eltérő gyakorisággal. Az ezeket hordozó allélek közül egyesek képezhetnek homozigótákat, valamint a vad típusú allélen kívül egymással is létrehozhatnak heterozigótákat.

Publikáció:

Vaszkó és mtsai, Magy Onkol, 2007

2.4. A c-KIT mutációk a bilaterális hererák kialakulásában

A hererák kialakulásában legkorábbi elváltozás a primordiális csírasejteket érinti, amely karcinóma in situ (CIS) intrauterin kialakulásához vezet. A TGCT betegek 2,5-5%-ában

alakul ki ellenoldali tumor, amelyre nézve nincs prediktív marker. A bilaterális megbetegedés teljes kasztrációt és hormonpótlást igényel, ami komoly pszichikai megterhelést jelent az érintett személyeknek. A CIS sejtekre és a primordiális csírasejtekre (TGCT) is jellemző a c-KIT összejt faktor receptor jelenléte. Nemzetközi együttműködés keretében végzett projekt egyik fontos eredménye, hogy az ellenoldali daganat kialakulását előrejelző genetikai változásokat azonosítottunk. A c-KIT mutációkat az Intézetünkben kezelt 15 hererákos család és 62 bilaterális daganatos beteg tumor és normális szövetében határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a c-KIT mutációk a csírvonalon nem, csak szomatikus szinten fordulnak elő.

Publikáció:

Looijenga és mtsai, Cancer Res, 2003 (a közlemény egy korábbi OTKA támogatással végzett kutatásunk eredménye, amelyet még nem jelentettünk)

Rapley és mtsai, Br J Cancer, 2004

3. A BRCA1 ÉS AZ STK11 GÉNEK EXPRESSZIÓJÁNAK ÉS ALTERNATÍV SPLICING PROFILJÁNAK MEGHATÁROZÁSA EMLŐRÁKOS BETEGEK TUMOROS ÉS EGÉSZSÉGES SZÖVETMINTÁIBAN

Valamennyi rákkeltő tényező a génműködés/génexpresszió megváltoztatásán keresztül fejt ki hatását. Vizsgálatainkban a BRCA1 és az STK11 gének expresszióját, és alternatív splicing mintázatát határoztuk meg emlőrákos betegek daganatos mintáiban és a megfelelő kontrollszövetekben.

3.1. BRCA1 gén

Újabb kutatások szerint az alternatív splicing a genetikai diverzitás egyik forrása, ezért feltételeztük, hogy a BRCA1 splice variánsainak vizsgálata hozzásegít bennünket a BRCA1 gén funkciójának, szövetspecifikus hatásának megértéséhez. Munkacsoportunk megkezdte a BRCA1 gén mRNS szintű expressziójának és az alternatív splicing szabályozásának vizsgálatát. Ennek kapcsán vizsgáltuk négy gyakori BRCA1 mRNS izoforma relatív expresszióját emlőműtéten átesett daganatos betegekből származó tumormintákban, illetve a hozzájuk tartozó normális emlőszövetben. A variánsok eloszlásának pontos mérésére kvantitatív Real-Time PCR módszerrel határoztuk meg az izoformák mennyiségét. Előzetes eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az emlőtumorokban a normál emlőszövetből és különösen a leukocitáktól eltérő alternatív splicing mintázat mutatható ki. Ezen vizsgálatokat folytatva (a mintaszámot 100-ra emelve) arra várunk választ, hogy mennyire szövetspecifikus a gén transzkripciójának, illetve az alternatív splicing-nak a szabályozása.

3.2. STK11 gén

Húsz különböző daganatos és egészséges szövetminta összehasonlításából az STK11 gén új alternatív splice variánsait azonosítottuk, köztük egy olyan izoformát, amelyből hiányzik a 9. exon.

20 szervspecifikus tumor-normál szövet pár RNS-mintáinak további elemzésével az általunk feltárt variánsok funkcionális szerepét kívánjuk tisztázni. Ehhez és az STK11 splice-variánsok daganatképződésben játszott szerepének tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Az eredmények egyetemi szakdolgozatban kerültek felhasználásra.

4. ÖRÖKLÖTT ÉS SZEREZETT GÉNHIBÁK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK ELEMZÉSE A SZIGNÁLFOLYAMATOKAT MEGVÁLTOZTATÓ MOLEKULÁK – RIBAVIRIN, INOZITOL-HEXAKISZFOSZFÁT (IP6) – FELHASZNÁLÁSÁVAL (RT-PCR és cDNS-array)

4.1. A guanilát bioszintézis kulcsenzim (IMP dehidrogenáz) gátlás hatása a molekuláris genetikai útvonalakra

A Ribavirin (Riba) egy széles körben használt gyógyszer a krónikus vírusfertőzések kezelésében. A készítmény az inozitid-5'-5'-monofoszfát dehidrogenáz (IMP DH) enzimnek is hatékony gátlószere. Humán daganatos sejttípusokon végzett vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a vírusellenes szer jelentős daganatellenes hatással rendelkezik, ami az apoptotikus és a sejt differenciációs program beindításával kapcsolatos. Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a Ribavirin daganatellenes hatása kulcsfontosságú szignálútvonalak, és nagyszámú gén expressziójának befolyásolásán keresztül érvényesül.

Oligonukleotid microarray és kvantitatív real-time PCR vizsgálatokkal számos génváltozást találtunk az AKT/NF- κ B, a MAP-kináz és a foszfatidil-inozitol (IP) szignálútvonal génjei között, de jelentős az apoptózis-gének (FADD, BAD, BAX/BCL-2, CASP-6, -7, -9) expressziójának megváltozása, a transzkripció és riboszóma biogenezis génjeinek módosulása is. A génextpresszió 12 órán keresztül történt monitorozása azt is feltárta, hogy a célfehérjét kódoló gén, az IMP DH mRNS szintje, együtt a sejtproliferáció (MYC, RAS) és a túlélés (hTERT) génjeinek expressziójával, már egy órás kezelés után is jelentősen csökkent. Figyelemre méltó a krónikus mieloid leukémia markergénjét, az ABL/BCR fúziós gént érintő korai expressziócsökkenés.

Amellett, hogy eredményeink új rendszerbiológiai összefüggésekre engednek következtetni, még gyakorlati jelentőségűek is, mivel e vírusellenes gyógyszer daganatkemoterápiás alkalmazásának lehetőségét is felveti, feltárva a daganatellenes hatás hátterében álló molekuláris biológiai változásokat.

Publikáció:

Oláh és mtsai, Adv Enzyme Regul, 2006

Kökény és mtsai, J Cellular Biochem (közlésre elküldve)

4.2. Az inozitol anyagcsere és az intracelluláris szignálutak (PI3K/Akt)

K562 humán mieloid leukémia sejtekben figyeltünk meg érdekes összefüggést a természetben előforduló inozitol-hexakiszfószfát (IP6) daganatellenes hatásával kapcsolatban. A Ribavirin hatásával szemben itt figyelemre méltó az immunitással, a Wnt és IGF útvonalakkal, valamint a PI3-kináz útvonallal kapcsolatos gének expressziójának korai (60 perc, 12 óra) változása. A Ribavirin-hatáshoz hasonlóan az apoptózis útvonal génjeinek szerepét a BAX/BCL-2 gének és a kaszpáz-kaszád génjeinek változásával igazoltuk.

Publikáció:

Bozsik és mtsai, Cancer Genomics & Proteomics, 2007

EGYÉB EREDMÉNY:

Az OTKA-támogatás 2 doktorandusz, valamint 2 szaklaboros munkáját segítette.