

MOLEKULARNA GENETIKA DEDNEGA RAKA

Metka Ravnik-Glavač, Damjan Glavač

Povzetek

Pred skoraj stoletjem je bila prvič opisana družina, v kateri se je rak dedoval na avtosomno-dominanten način. Potrditi, da so določene vrste raka dedne bolezni, je bilo mogoče šele približno pred desetletjem, ko so bile razvite metode molekularnogenetske analize in odkrite prve mutacije, ki so se po Mendlovem načinu dedovanja prenašale iz roda v rod. Geni, ki sodelujejo pri nastanku raka, so onkogeni in tumorsko zaviralni geni. Večina družinskih rakavih bolezni zajema podedovano mutacijo v enem samem tumorsko zaviralnem genu ali onkogenu, kar samo po sebi še ne pomeni bolezni. Verjetno pa se zaradi te mutacije tudi v drugih tumorsko zaviralnih genih in onkogenih sproži niz nadaljnjih mutacijskih dogodkov, kar končno pelje do nastanka raka. Z odkritjem številnih genov, ki so neposredno povezani z nastankom dednih rakavih sindromov, je molekularnogenetska diagnostika postala najzanesljivejša metoda za odkrivanje teh bolezni. Odprle so se možnosti genetskega pregleda pred pojavom bolezenskih simptomov, s tem pa tudi možnosti za preprečevanje razvoja bolezni, zgodnje odkrivanje in uspešnejše zdravljenje.

Uvod

Že približno pred enim stoletjem so domnevali, da rak nastane zaradi napak v celičnem jedru, saj so zgodnje citogenetske raziskave odkrile, da so v rakastih celicah velike kromosomske delecije, insercije ali preureditve. Toda šele z novimi metodami in tehnikami molekularne genetike, ki so se začele razvijati pred približno dvema desetletjema, je bilo mogoče potrditi, da je prav vsaka vrsta raka genetska bolezen. Če je neka bolezen genetsko pogojena, še ne pomeni, da je tudi dedna. Pravzaprav je le majhen delež vseh rakavih obolenj dednih bolezni. Razlika med nedednimi (sporadičnimi) in dednimi oblikami raka je v tem, da pri sporadičnih oblikah raka mutacije nastanejo v somatskih (nespolnih) celicah kasneje v času življenja, pri dednih oblikah raka pa so mutacije v nekaterih, za nastanek raka odgovornih genih, nastale že v preteklosti v spolnih celicah prednikov, ki so jih nato prenašali na svoje potomce. O večgeneracijski družini, v kateri so družinski člani pogosto zbolevali za rakom, je prvi poročal Warthin že daljnega leta 1913. Opazil je tudi, da se je bolezen v opisani družini dedovala na avtosomno dominanten način. Velika večina doslej poznanih dednih rakavih sindromov se res prenaša na avtosomno dominanten način, kar pomeni, da je podedovanje enega samega mutiranega alela (ene kopije gena) za določeno vrsto raka kritičnega gena dovolj, da se pri posamezniku močno poveča verjetnost za razvoj te vrste raka. Iskanje genov, katerih okvare (mutacije) povzročajo razvoj raka, je pri dednih rakavih obolen-

jih relativno enostavnejše prav zaradi Mendlovega načina dedovanja. S primerjavo nukleotidnega zaporedja v genomu zdravih in bolnih članov iste družine je namreč mogoče z metodami t.i. genetske vezave (angleško *linkage disequilibrium*) odkriti gene, ki so vključeni v nastanek raka v tej družini. Kljub temu pa sta prepoznavanje in izolacija (kloniranje) človeškega gena eksperimentalno zelo naporen in dolgotrajen proces, ki vključuje številne metode tehnologije rekombinantne DNA in zahteva nekaj let intezivnega dela velikih skupin vrhunskih raziskovalcev.

Zdaj vemo, da rak pri človeku nastane kot rezultat nakopičenja zadostnega (kritičnega) števila mutacij, ki podrejo harmonično ravnotežje znotraj normalnih celic. Mutacije nastanejo v genih, ki igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju rasti celic in pri celični diferenciaciji, in ne v genih, ki so pomembni za celično preživetje. V normalnih celicah obstaja interakcija med pozitivnimi (celična rast) in negativnimi (diferenciacija in ustavitev rasti celic) signali, kar ohranja homeostazo. Glavni molekularni dogodek, ki povzroči nastanek raka, je odstranitev prevlade negativnega signala nad pozitivnim signalom. Značilnost rakastih celic sta torej njihova nenehna rast in nezmožnost za končno diferenciacijo.

Geni, ki so odgovorni za pozitivne signale, se imenujejo onkogeni, geni, odgovorni za negativne signale, pa tumorsko zaviralni geni.

Onkogeni in tumorsko zaviralni geni

Onkogeni so mutirane oblike normalnih človeških celičnih genov, protoonkogenov, ki so najpogosteje vključeni v prenos signalov ali uravnavanje izražanja genov. Onkogeni delujejo na vseh ravneh biokemijskih procesov, vključujoč hormone, receptorje, encime in transkripcijske dejavnike. Skupno vsem onkogenom je, da mutacije v teh genih vodijo do dodatnih dejavnosti oz. povečajo dejavnost beljakovin, ki jih kodirajo, kar povzroči nenadzorovano celično delitev. Onkogeni delujejo prevladovalno (dominantno), kar pomeni, da je prekomerna aktivnost enega samega alela (ene kopije gena) v celici dovolj, da se ta celica začne pospešeno deliti, to pa nadalje povzroči klonalno razširitev te celične linije. Doslej so odkrili že veliko različnih onkogenov, ki so večinoma vključeni v poznejše stopnje pri razvoju tumorjev. Znana pa je povezanost protoonkogenega *RET* z nekaterimi dednimi oblikami raka. Podedovane mutacije v protoonkogenu *RET* so namreč odkrili pri bolnikih z dedno multiplo endokrinopatijo tipa 2 (*MEN2A*, *MEN2B*) in pri bolnikih z družinsko obliko raka ščitnice (angleška kratica *FMTC* za *Familial Medular Thyroid Carcinoma*), mutirani ali heterozigotno deletirani gen *RET* pa povzroči tudi avtosomno dominantno obliko Hirschsprungove bolezni (Tabela 1).

Tumorsko zaviralni geni kodirajo raznoliko skupino beljakovin, ki so po številnih mehanizmi vključene v negativno uravnavanje celične rasti in razvoja. V nasprotju z onkogeni, ki delujejo dominantno, delujejo tumorsko zaviralni geni recesivno. Potrebna je mutacija v obeh alelih istega tumorsko zaviralnega gena, da lahko pride do razvoja bolezni, oziroma en normalni alel gena še pre-

Tabela 1: Izbrani geni, povezani z nastankom dednih rakavih sindromov ter sporadičnih oblik raka

GEN	LOKALIZACIJA	BOLEZENI
<i>RB</i>	13p14	Retinoblastomi, osteosarkomi, limfoidne levkemije, rak pljuč, dojke, ovarijski, prostate, mehurja
<i>TP53</i>	17p13	Li-Fraumeni sindrom, rak prostate, dojke, pljuč, črevesa, mehurja, jeter, možgan, nadledvične žleze, limfomi, levkemije
<i>WT1</i>	11p13-15	Wilms-ov tumor
<i>NF-1</i>	17q11.2	Nevrofibromatoza, periferni nevrofibromi
<i>NF-2</i>	22q	Nevromi slušnega voda, schwannom, meningiomi, rak dojke, črevesa
<i>VHL</i>	3p26	Rak ledvičnih celic
<i>APC</i>	5q21	Rak črevesa (FAP-družinska adenomatozna polipoza)
<i>MSH2</i>	2p16	Rak črevesa (HNPCC-dedni nepolipozni rak črevesa), endometrija, želodca, pankreasa, mehurja, ovarijski
<i>MLH1</i>	3p21.3-23	Rak črevesa (HNPCC-dedni nepolipozni rak črevesa), endometrija, želodca, pankreasa, mehurja, ovarijski
<i>PMS1</i>	2q31-33	Rak črevesa (HNPCC-dedni nepolipozni rak črevesa), endometrija, želodca, pankreasa, mehurja, ovarijski
<i>PMS2</i>	7p22	Rak črevesa (HNPCC-dedni nepolipozni rak črevesa), endometrija, želodca, pankreasa, mehurja, ovarijski
<i>BRCA1</i>	17q21	Rak dojke, ovarijski
<i>BRCA2</i>	13q	Zgodnji rak dojke, (rak dojke pri moških)
<i>RET</i>	10q11,2	Multipla endokrini neoplazija tipa 2, rak ščitnice, Hirschsprungova bolezen
<i>STK11</i>	19p13.3	Peutz-Jeghers sindrom, rak želodca, tankega in širokega črevesa, jajčnika, testisev, melaninske pigmentacije na koži in sluznici.
<i>NBCCS</i>	9q22	Karcinom bazalnih celic

prečuje in zavira začetek raka. Zaradi te lastnosti so take gene imenovali tumorsko zaviralni (supresorski) geni.

Knudsonova dvostopenjska hipoteza o nastanku raka

Da obstajajo tumorsko zaviralni geni, je že v zgodnjih sedemdesetih letih 20. stoletja, dolgo pred tem, ko jih je bilo mogoče v teoriji potrditi na molekularno-genetski ravni, domneval švedski znanstvenik Alfred Knudson. Opazoval je epidemiološke značilnosti bolnikov z retinoblastomom. Otroci iz tistih družin, v katerih je že bila navzoča ta redka oblika očesnega raka, so zbolevali mlajši kot otroci iz družin, kjer te bolezni ni bilo. Ta opazovanja so vodila Knudsona, da je postavil dvostopenjsko hipotezo o nastanku raka. Hipoteza predpostav-

lja, da pri sporadični (nedružinski) obliki bolezni nastaneta dve spontani mutaciji, vsaka na enem alelu istega tumorsko zaviralnega gena znotraj ene somat-ske celice, kar se zgodi le redko. Pri družinski obliki bolezni pa je ena podedovana mutacija v tumorsko zaviralnem genu že navzoča v vseh celicah (spolnih in somatskih) posameznika, kar pomeni, da mora nastati le še ena mutacija na drugem alelu istega gena v katerikoli somatski celici, da se proces na-stajanja tumorja lahko začne. Da se bo to zgodilo, je dosti bolj verjetno, zato se družinska oblika bolezni pojavi v zgodnejši življenjski dobi. Celica, ki ima nedejavna oba alela kritičnega tumorsko zaviralnega gena, se začne deliti nenadzorovano in lahko postane maligna.

Geni »vratarji«

Podedovana heterozigotnost za mutacijo pa še ni zadosten pogoj za razvoj bolezni, kar kaže na to, da je tudi v kancerogenezo dednih oblik raka vključenih več različnih genov. Spoznanje, da imajo določeni tumorji pri dednih rakavih sindromih mutacije v istih genih kot enaki sporadični tumorji v zgodnji fazi razvoja, je vodilo do sklepa, da je verjetno inaktivacija teh genov ključna za začetek in razvoj določenih neoplazem. Knudsonova teorija je bila zato v no-vejšem času potrjena in le nekoliko dopolnjena. Vogelstein in Kinzler sta pred kratkim namreč predstavila koncept genov »vratarjev«. Inaktivacija genov vratarjev naj bi bila potrebna za prestop genetskega praga neoplastičnega procesa v danem tkivu. Ko je enkrat gen vratar inaktiviran (tumorsko zaviralni gen) ali aktiviran (protoonkogen) v celici, pride do klonalne ekspanzije, ki ji sledijo številni genetski dogodki. Večina družinskih rakavih bolezni vključuje podedovano mutacijo v enem samem tumorsko zaviralnem genu ali onkogenu, kar samo po sebi še ne pomeni bolezni. Verjetno pa se zaradi te mutacije sproži niz nadaljnjih mutacijskih dogodkov tudi v drugih tumorsko zaviralnih genih in onkogenih, kar končno pripelje do nastanka raka.

V molekularnogenetski diagnostiki dednega raka je torej bistveno odkrivanje napak v genih vratarjih. Z odkritjem številnih tumor-supresorskih genov in enega onkogenega (*RET*), ki so neposredno povezani (geni vratarji) z nastankom dednih rakavih sindromov, je postala molekularnogenetska diagnostika teh sindromov najzanesljivejša metoda za odkrivanje in potrjevanje teh bolezni.

V tabeli 1 so prikazana imena nekaterih že poznanih genov, ki so vključeni v dedne oblike raka, njihov položaj na kromosomih ter vrste rakavih bolezni, ki nastanejo, če so ti geni pri človeku okvarjeni.

Pomen molekularnogenetske diagnostike dednih rakavih sindromov

Odkritje številnih genov, ki so povezani z nastankom dednih oblik raka, je na molekularnogenetski ravni omogočilo ugotavljanje dednih predispozicij za razvoj teh bolezni. Odkritje mutacij v genih, odgovornih za razvoj posameznih sindromov v družinah, pri katerih družinske anamneze kažejo na navzočnost dednih rakavih sindromov, ima velik pomen za družino kot za širšo družbo. Za posamezno družino pomeni pozitivna molekularnogenetska analiza (odkritje

podedovane patogene mutacije v kritičnem genu) potrditev diagnoze dednega raka. To pa ima pomemben vpliv na nadaljnje obravnavanje in zdravljenje bolnika, saj lahko posameznik s podedovano mutacijo razvije številne sinhrono (hkratne) in metahrone (s časovnim zamikom) tumorje, ki so lahko tudi na različnih organih. Tako je na primer pri bolnici z nepolipoznim rakom širokega črevesa in danke, pri kateri odkrijemo mutacijo v genu *hMSH2* (Tabela 1) zelo verjetno, da se ji bo kasneje v življenju razvil tudi rak endometrija. Odkrita mutacija v družini pomeni tudi možnost genetskega pregleda pred pojavom simptomov pri tistih družinskih članih, ki so (še) zdravi, vendar pri njih obstaja verjetnost, da so tudi podedovali mutacijo. Če se še zdravi posamezniki po genetskem posvetovanju odločijo za genetski pregled in se pri njih odkrije navzočnost mutacije, morajo biti zajeti v preventivne programe. Ti programi vključujejo psihosocialno skrb in občasne preglede za zgodnje odkrivanje bolezni. Zgodnje odkrivanje bolezni je povezano z možnostjo preprečevanja bolezni in zato tudi z uspešnejšim zdravljenjem.

V širšem družbenem smislu pa molekularnogenetska analiza omogoča ugotavljanje incidence posamezne patologije in izdelavo nacionalnih registrov dednih rakov. S pomočjo registrov je omogočeno spremljanje družin in aplikacija novih spoznanj za zgodnje odkrivanje in uspešno zdravljenje ogroženih družinskih članov tudi v prihodnje. Odkrivanje bolezni v zgodnejših stadijih pomeni tudi zmanjšanje stroškov zdravljenja in zmanjšanje umrljivosti zaradi raka.

V Sloveniji že potekajo molekularnogenetske raziskave in diagnostika nekaterih dednih rakavih sindromov. V našem laboratoriju za molekularno genetikó Inštituta za patologijo tako poteka zdaj genetska analiza družin z dednimi oblikami črevesnega in ledvičnega raka ter družin z multiplimi endokrinimi neoplazijami.

Zaključek

Za nekatere dedne oblike raka so pri vseh družinah, v katerih je ta oblika raka navzoča, odgovorne mutacije v enakem genu. Za večino dednih oblik raka pa velja, da je več različnih genov povezanih z enakim rakovim sindromom. Za take bolezni rečemo, da so genetsko raznolike (heterogene) bolezni. Tako je na primer družinska adenomatozna polipoza genetsko enotna bolezen, saj pri večini bolnikov iz različnih družin lahko najdemo mutacije v enem samem genu (*APC*). Po drugi strani pa lahko s sedanjim znanjem odkrijemo mutacije le pri 30 % do 40 % družin z dednim nepolipoznim rakom širokega črevesa in danke, čeprav pri vseh družinah analiziramo vsaj štiri različne gene (*hMLH1*, *HMSH2*, *PMS1*, *PMS2*) (Tabela 1), ki so vsi lahko povezani z nastankom te dedne oblike raka. Obstajajo namreč še tudi drugi geni, ki so vključeni v dedni nepolipozni rak črevesa, ki pa doslej še niso bili odkriti. Molekularnogenetska diagnostika je smiselna tako v genetsko enotnih kot v genetsko raznolikih boleznih. Odkritje podedovane mutacije namreč v vsaki posamezni družini odpre možnost za genetski pregled pred pojavom simptomov, s čimer je povezano

tudi nadaljnje zgodnejše odkrivanje in preprečevanje razvoja bolezni in s tem tudi uspešnejše zdravljenje.

Literatura

1. Knudson AG Jr. Di Ferrante N. Curtis JE. Effect of leukocyte transfusion in a child with type II mucopolysaccharidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:1437-1443.
2. Malkin D. Li FP. Strong LC. et al.. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-1238.
3. Neumann HP. Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counselling in von Hippel-Lindau syndrome. *Vasa* 1987; 16:220-226.
4. Latif F. Tory K. Gnarr J. et al.. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260:1317-1320.
5. Brauch H. Kishida T. Glavač D. et al.. Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet* 1995; 95:551-556.
6. Glavač D. Ravnik-Glavač M. Ovčak Z. Mašera A. Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma (RCC). *Pflugers Arch* 1996; 431:R193-194.
7. Call KM. Glaser T. Ito CY et al.. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60:509-520.
8. Baird PN. Groves N. Haber DA. Housman DE. Cowell JK. Identification of mutations in the WT1 gene in tumours from patients with the WAGR syndrome. *Oncogene* 1992; 7:2141-2149.
9. Kinzler KW. Nilbert MC. Su LK. et al.. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253:661-665.
10. Bronner CE. Baker SM. Morrison PT. et al.. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368:258-261.
11. Papadopoulos N. Nicolaides NC. Wei Y-F. Ruben SM et al.. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263:1625-1629.
12. Wallace MR. Marchuk DA. Andersen LB. et al.. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990; 249:181-186.
13. Miki Y. Swensen J. Shattuck-Eidens D. et al.. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 264: 66-71.
14. Wooster R. Neuhausen SL. Mangion J. et al.. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265:2088-2090.
15. Futreal PA. Liu Q. Shattuck-Eidens D. et al.. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; 266:120-122.
16. Weber BL. Susceptibility genes for breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 331:1523-1524.
17. Castilla LH. Couch FJ. Erdos MR. et al.. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nature Genet* 1994; 8:387-391.

18. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, et al.. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85:841-851.
19. Sidransky D. Is human patched the gatekeeper of common skin cancers?. *Nature Genet* 1996; 14:7-8.
20. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al.. Cancer risk in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110:1020-1027 .
21. Glavač D, Neumann HP, Wittke C, et al.. Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum Genet* 1996; 98:271-280.
22. Neumann HPH, Eng C, Glavač D et al. Consequences of Direct Genetic Testing for Germline Mutations in the Clinical Management of Families with Multiple Endocrine Neoplasia. Type 2. *JAMA* 1995; 274:1149-1151.
23. Lynch HT, Lemon S, Smyrk T et al. Genetic counseling in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an extended family with MSH2 mutation. *Am J Gastroenterology* 1996; 91 (12):2489-2493.
24. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 810-2.
25. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
26. Ravnik-Glavač M, Potočnik U, Koželj M, Križman I, Glavač D. A novel in frame deletion of codons 188-190 in the hMSH2 gene of a slovenian patient with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Hered* 1998; 48: 285-7.
27. Potočnik U, Glavač D, Golouh R and Ravnik-Glavač M. A novel Q562X mutation identified in the hMLH1 gene in a Slovenian HNPCC patient. *Hum Hered* 2000; 50: 140-1.
28. Ravnik-Glavač M, Potočnik U, Glavač D. Incidence of germline hMLH1 and hMSH2 mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed colorectal cancers. *J Med Genet* 2000 (v tisku).