

A GENETIKAI ELTÉRÉSEK ÉS FEHÉRJESZINTŰ MEGJELENÉSÜK SZEREPE A PATOLÓGIAI DIAGNOSZTIKÁBAN

Matolcsy András

az MTA doktora, Semmelweis Egyetem Ált.
Orvostud. Kar – matolcsy@korbi.sote.hu

Sápi Zoltán

PhD, Semmelweis Egyetem Ált. Orvostud. Kar,
I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete

Összefoglalás

A daganatos betegségek genetikai és molekuláris hátterének vizsgálatával számos olyan eltérés került felfedezésre, amely alapvetően meghatározza egy betegség kialakulását, vagy jellemzi az adott kórképet. E molekuláris eltérések használhatóak a patológiai diagnosztikában, és segítik az evidenciákon alapuló diagnosztikus munkát. A molekuláris eltérések típusuktól függően a DNS-, RNS- vagy fehérjeszinten jelenhetnek meg. A DNS-szintű elváltozások leggyakrabban génmozgásokat (transzlokáció), a DNS állományában bekövetkező mennyiségi változásokat (deléción, amplifikáció) vagy a DNS szekvenciájában bekövetkező változásokat (pontmutáció) takarnak. Az RNS-szinten detektálható változások elsősorban gének kifejeződése szintjében bekövetkező változásokat jelentik. A fehérjeszinten is kimutatható eltérések általában normális sejtekben is jelen lévő fehérjék fokozott kifejeződését, vagy gének összekapcsolódása következtében kialakuló kimérafehérjék megjelenését jelentik. A DNS- és RNS-szinten megjelenő eltérések kimutatására leggyakrabban a polimeráz láncreakció (PCR) különböző formáit, az *in situ* hibridizációs technikákat, köztük leggyakrabban a *fluores-*

cent in situ hibridizációt (FISH) és a DNS-szekvenálást használják. A fehérjeszinten jelentkező eltérések kimutatására a leggyakrabban áramlás-citometriai és immunhisztokémiai vizsgálatok állnak rendelkezésre.

Bevezetés

Az elmúlt évtizedek biológiai kutatásának eredményeként a patológiai diagnosztika, köztük elsősorban a daganatdiagnosztika, forradalmi változásokon ment keresztül. Az alapvetően szövettani eltérésekre alapuló patológiai diagnosztikát ma a szövetek DNS-, RNS- és fehérjeszinten detektálható változásai jellemzik, amelyek kimutatása nagy fokban segíti a diagnosztikus munkát, és teszi azt objektívvé. Számos daganatos betegség esetében az alkalmazható kezelés a tumorsejtek genetikai eltéréseit célozza meg, melynek ugyancsak előfeltétele az adott molekuláris eltérés kimutatása. A rutin patológiai laboratóriumokban napjainkban mintegy 50–100 különböző antitestet használnak a patológusok a differenciáldiagnosztikai munkában. Ezek nagy része citoplazmatikus filamentális struktúrák, illetve a sejt felszíni antigének kimutatását szolgálja, de egy jó részük a genetikai eltéréseket detektálja proteinszinten. Az immunreakciók gyakran segítenek a prognó-

zis megítélésében, de számos esetben alapvetően meghatározzák a daganatos beteg kezelési lehetőségeit.

DNS-szintű eltérések és kimutatásuk

A sejtek DNS-állománya a sejtek osztódása és differenciálódása során szerkezeti változásokon megy keresztül. A fiziológiás DNS-replikációban és génmozgásokban bekövetkező hibák gyakran daganatok kialakulásához vezethetnek. Ezen DNS-eltérések jellemezhetnek egy adott daganatféléseget, és így alkalmazhatóak a patológiai diagnosztikában.

Transzlokációk: A sejtek érését és differenciálódását gének mozgása vagy más szóval géntrendeződés kísérheti. A fiziológiás génmozgások talán leggyakrabban használt példája a B-limfociták érése során bekövetkező immunglobulin (Ig) gének mozgása, átrendeződése: a hemopoetikus őssejtek B-sejteké történő differenciálódása során három különböző géncsalád, összességében közel száz génjéből (variábilis, *diversity*, kapcsolási) kiválasztódó három gén kapcsolódása alakítja ki a B-sejt Ig struktúráját. Amennyiben a fiziológiás génmozgások során az Ig géneket kódoló szakaszok hibásan, más génekhez kapcsolódnak, transzlokációk alakulnak ki. Ilyen módon az Ig és *BCL-2* gének fúziójából kialakuló *IgH/BCL-2* génhibrid a folliculáris limfómát, vagy az *IgH* és *BCL-1* gének fúziójából kialakuló *IgH/BCL-1* hibridgén a köpenysejtes limfómát jellemzi. A transzlokációk során kialakult hibridgén egyik partnere fokozza a másik partner kifejeződését, ami a tumoros folyamat kialakulásában játszik szerepet. A transzlokációk egyaránt kimutathatóak PCR- és FISH-módszerekkel. Mindkét módszer esetében a hibridgén egyik, illetve másik partnerére specifikus, és annak DNS-szálával komplementer próba segít a kimutatásban.

A limfómákhoz hasonlóan más daganatos betegségeket, köztük lágyszövetű tumorokat, vese-tumorokat is jellemezhet kromozómatranszlokáció, olyannyira, hogy lágyszövetű tumorok esetén eleve két csoportot különböztetünk meg: az egyiket épp a specifikus transzlokációk jellemzik, a másik csoportban komplex genetikai eltérések figyelhetők meg.

Deléciók: A génvesztések, vagy más szóval deléciók, ugyancsak szerepet játszanak különböző tumorok kialakulásában. Elsősorban tumorszuppresszor gének deléciójáról van szó, ahol az adott gén elvesztése vezet daganatkialakuláshoz. A legismertebb ilyen deléció a *P53* gén vagy *P16* gének elvesztése, mely számos szövettípus esetében vezet daganatkialakuláshoz vagy daganatprogresszióhoz. A szuppresszor gén deléció mellett egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak egyéb más DNS-szakaszok vesztesége (deléció), illetve nyeresége (gain) során keletkezett genetikai, pontosabban kromozómális instabilitásnak, mely úgy tűnik, hogy minden daganatban valamilyen szinten megtalálható.

Amplifikációk: A génamplifikációk során egy adott génszakasz megsokszorozódásáról, kópiaszámának növekedéséről van szó. A génkópia növekedésének következtében az adott gén fokozott kifejeződéséről van szó, ami ugyancsak tumorok kialakulásához vezet. Ilyen amplifikáció az emlőtumorok esetében a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (*HER-2*) lókuszsámának emelkedése, vagy az *N-MYC* gén amplifikációja neuroblastoma esetében (Eisenhauer, 2001). A *HER-2* meghatározás a rutin patológia egyik mindennapos tevékenységévé vált, hiszen ez immunreakcióval jól detektálható.

Pontmutációk: A DNS-szekvenciákban bekövetkező pontmutációk aminosavcseréhez vezethetnek. E mutációk egy része az adott

gén folyamatos működéséhez (aktivációs mutáció) és ezáltal tumorok kialakulásához vezethet. Más esetekben a pontmutáció gének inaktivitásához (inaktivációs mutáció) és ezen keresztül tumorok kialakulásához vezet. Aktivációs mutáció például a nemrégén kimutatott *JAK-2* pszeudokináz gén V617F mutációja, melynek következtében a tirozin kináz aktivitással rendelkező *JAK-2* gén fokozott expressziója alakul ki. A *JAK-2* aktiváció krónikus myeloproliferatív betegségeket eredményez. Egyéb jelentős aktivációs mutációk például a *c-KIT*-et aktiváló mutációk. Ennek eredményeként fokozott sejtproliferáció és/vagy csökkent apoptózis alakul ki, amely az ún. gasztrointesztinális sztromális tumorok (GIST) kialakulásához vezet/nek.

RNS-szintű eltérések és kimutatásuk

A DNS-szintű eltéréseket (transzlokáció, amplifikáció) gyakran kíséri az adott génről átírt RNS mennyiségének emelkedése. Az RNS-szintű változások mérése informál a patológias géntermék mennyiségéről, azaz a gén aktivitásának intenzitásáról. Számos esetben a DNS-szinten ismert genetikai eltérés RNS-szinten is megjelenik. Például a krónikus myeloid leukémiát (CML) jellemzi a DNS-szinten a *BCR/ABL* génfúzió. A *BCR/ABL* kiméra átíródik, és így RNS-szinten is detektálható. A *BCR/ABL* génexpresszió jellemzi a betegség aktivitását, és ezáltal alkalmazható a betegség követésében. A CML kezelésében használt *imatinib* a *BCR/ABL* fúziógén aktivitását gátolja, hatásának felmérésére legmegbízhatóbb az RNS mennyiségének mérése (Matolcsy, 2004).

Fehérjeszintű eltérések és kimutatásuk

A DNS-állományában vagy génexpressziókban megnyilvánuló molekuláris változások

gyakran fehérjeszinten is megjelennek. A patológiai diagnosztikában a genetikai eltéréseket talán a leggyakrabban fehérjeszinten detektálják, mivel kivitelezése egyszerű, formalinban fixált és paraffinba ágyazott szövetmintákon is kivitelezhető, és nem igényel bonyolult infrastrukturális hátteret. A fehérjeváltozások kimutatására az immunhisztokémiai vizsgálatok állnak a patológusok rendelkezésére, ahol az adott fehérje ellen termelt és jelölt antitestekkel lehet a fehérjét azonosítani szövettani metszeteken.

A fehérjeszinten megjelenő eltérések genetikai háttere heterogén. Az esetek egy részében génamplifikációról van szó, ahol fiziológiásan is meglévő gének „felerősödése” eredményezi a magasabb fehérjekifejeződést. Az emlőtumorok esetében az egyik legfontosabb fehérjeszinten is kimutatható eltérés a *HER2/NEU* onkogén fokozott kifejeződése. A *HER-2* fehérje megjelenése előnytelen klinikai viselkedésre utal, de ugyanakkor lehetőséget nyújt a molekula ellen irányuló kezelésre (Eisenhauer, 2001). A *HER-2* fokozott kifejeződése immunhisztokémiai módszerrel és FISH-vizsgálatokkal egyaránt kimutatható. Szintén az emlőtumorok esetén fontos egyes magproteinek kimutatása, mint például az ösztrogén és progesteron receptor meghatározás. Ez képezi az alapját az antiösztrogén terápiának, ami szintén egyfajta kezelési lehetőség emlőtumorok esetén.

Napjainkban került előtérbe az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) státusának vizsgálata, ami fehérjeszinten, azaz immunhisztokémiai reakciókkal is detektálható. Az immunpozitivitás mellett szükséges azonban az egyes EGFR-változások (mutációk, deléciók, amplifikációk) molekuláris szintű kimutatása is (Sakurada et al., 2006). Ma már több specifikus EGFR-gátló szert

fejlesztettek ki (Erlotinib, Gefitinib stb.), melyekkel remény van az egyébként igen rossz prognózisú tüdőrákok (pontosabban azoknak egyes típusai), illetve egyéb adenokarcinómák, például vastagbélrákok eredményes kezelésére. Pont ezen kemoterápiás szerek alkalmazása során derült ki, hogy milyen nagy jelentősége van a pontos patológiai diagnosztikus munkának, hiszen csak meghatározott típusú, „megfelelő” mutációval, amplifikációval stb. rendelkező daganatokat lehet eredményesen kezelni, egyébként csak pazarlásról, sokszor felesleges pénzkiadásról beszélhetünk (tekintettel arra, hogy ezen kezelések igen drágák).

Mutációk is okozhatnak fehérjeszintű változásokat. Ezek közül a legfontosabb talán a *c-KIT*-mutáció kimutatása GIST esetében. A *c-KIT*-mutáció hatására fokozódik a CD117 fehérje kifejeződése, ami immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatható. A CD117 pozitívitas egyben diagnosztikus jelentőségű is, bár nem teljesen specifikus, ugyanis más daganatok, például csírasejtes tumorok, melanóma stb. is lehetnek CD117 pozitívak. Mégis, a szöveti morfológia a CD117 pozitívítással együtt egyértelművé teszi a GIST diagnózist, és egyben lehetőséget ad az egyik leghatékonyabb targerterápiára, ami napja-

inkban hozzáférhető (Sági et al., 2002). Ezen gyógyszer az *imatinib* (Glivec) (korábban már a leukémiák kezelésére is használták), mely a *c-KIT*-receptor tirozin-kináz specifikus gátlója, és drámai változást hozott a metasztatikus GIST kezelésében. A korábban igen rossz hatásfokkal kezelhető (hagyományos kemoterápia), a beteg halálát okozó daganat a Glivec kezeléssel csaknem meggyógyítható, hosszú éveken keresztül jól kezelhető.

Sok esetben a fokozott fehérjekifejeződés hátterében a fiziológias sejtdifferenciációban és sejtciklusban részt vevő gének megváltozott regulációja játszik szerepet. Ezen esetekben az adott gén fokozott expressziójáról van szó anélkül, hogy strukturális változást szenvedett volna. Például a *BCL-2* proteinnek szerepe van a sejtciklusban és a sejtek fiziológias apoptózisában. A follikuláris limfómák esetében a *BCL-2* gén a t(14;18) transzlokáció következtében az immunoglobulin nehézlánc (IgH) gén irányítása alá kerül, és így a kifejeződés folyamatos és fokozott (Tsujimoto et al., 1985). A magas *BCL-2* szint, antiapoptotikus hatásán keresztül, limfóma kialakulásához vezet.

Kulcsszavak: *amplifikáció, deléció, molekuláris patológia, transzlokáció, tumordiagnosztika, immunhisztokémia*

IRODALOM

- Eisenhauer, Elizabeth A. (2001): From the Molecule to the Clinic – Inhibiting HER-2 to Beat Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 344, 841.
- Matolcsy András (2004): Új szemlélet a krónikus myeloid leukaemia diagnosztikájában és terápiájának monitorozásában. *Orvosi Hetilap*. 52, 2603–2609.
- Orosz Zsolt – Tornóczky T. – Sági Z. (2005): Gastrointestinal Stromal Tumors: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 136 Cases. *Pathology and Oncology Research*. 11, 1, 11–21.
- Tsujimoto, Yoshihide – Gorham, J. – Cossman, J. – Jaffe, E. – Croce, C. M. (1985): The T(14;18) Chromo-

some Translocations Involved in B-Cell Neoplasms Result from Mistakes in VDJ Joining. *Science*. 229, 1390–1393.

- Sakurada, Akira – Shepherd, F. A. – Tsao, M. S. (1996): Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer: Impact of Primary Or Secondary Mutations. *Clinical Lung Cancer*. 7, Suppl 4, S138–44.
- Sági Zoltán – Antal I. – Pápai Z. – Szendrői M. – Mayer A. – Jakab K. – Pajor L. – Bodó M. (2002): Diagnosis of Soft Tissue Tumors by Fine-Needle Aspiration with Combined Cytopathology and Ancillary Techniques. *Diagnostic Cytopathology*. 26, 232–42.