

A Lynch szindróma molekuláris genetikai háttere Magyarországon

A doktori értekezés tézisei

Kovács Marietta Éva



Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológiai Doktori Iskola

Klasszikus és Molekuláris Genetika Program

Iskolavezető:
Erdei Anna
akadémikus

Témavezető:
Oláh Edit
akadémikus

Programvezető:
Orosz László
akadémikus

2009

Háttér

A vastagbélrák világszerte a második leggyakrabban előforduló daganatos megbetegedés, évente mintegy 1 millió új diagnosztizált esettel. Európában Magyarország az egyik vastagbélrákkal leginkább terhelt ország.

A vastagbélrák kiemelkedő gyakorisága mögött a salakanyagok tárolása és a bélrendszer epitéliumának igen gyors proliferációja közötti összefüggés áll: a vastagbél teljes hosszában megtalálható kripták alján található őssejtek 12-16 óránként osztódnak, ezzel kriptánként napi 200 progenitor sejtet produkálva. Ezek a sejtek felfelé vándorolnak, differenciálódnak, majd néhány nap múlva elpusztulnak és lelökődnek. Ezen folyamatok szabályozottságának megtartásához a proliferáció-differenciáció-apoptózis folyamatainak igen szoros összehangolása szükséges, és bármelyik részfolyamat sérülése elégséges a rákos elfajulás megindulásához.

Az összes vastagbélrák közül a sporadikus megjelenésű rákok az esetek 70-80%-át teszik ki, míg a fennmaradó 20-30% jelenti a családi halmozódású eseteket, ezeknek körülbelül fele sorolható a családi rákszindrómák körébe.

A leggyakoribb, örökletes vastagbélrákkal járó tünetegyüttes a Lynch szindróma (másnéven örökletes, nem polipózis talaján kialakuló vastagbél-végbélrák, *hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC). Ezen tünetcsoport megjelenési gyakoriságát a különböző irodalmi adatok a vastagbélrákos populáció 1,9-15%-a közé teszik. Ezen tág határokat diagnosztikai kritériumainak sokfélesége és a szindróma felismerésének nehézsége indokolhatja, hiszen a szindróma a vastagbélrák és a méhrák mellett más szervek daganataira (többek között a vékonybél-, gyomor-, petefészek-, máj- és az urogenitális rendszer is érintett lehet) való fokozott hajlammal is együtt jár. Emellett mindenképpen megjegyzendő, hogy a tünetcsoporttal kapcsolatos mutációk esetében megfigyelhető az 50 éves kor előtti vastagbélrák-kialakulás valószínűségének a populációhoz képesti jelentős növekedése: a férfiak esetében 180×-os, a nők esetében 100×-os kockázattal számolhatunk. Szintén jellemző a Lynch szindrómára az autoszómális domináns öröklésment és a családi rákszindrómás családok tagjainak esetében megfigyelt, a populációhoz képest alacsonyabb életkorban kialakuló betegség.

A szindrómához tartozó tumorok az egyik DNS hibajavító rendszer, a *mismatch repair* (MMR) rendszer – ezen belül is főként az MLH1 és MSH2 gének – csírvonalas mutációinak

eredményeképpen alakulnak ki, és molekuláris jellemzőik közé tartozik a magas fokú mikroszatellita instabilitás és a mutáns génről képződő fehérje jól kimutatható hiánya a sejtek magjában. A feltételezhetően Lynch szindrómába tartozó betegek (a tünetcsoportra jellemző családtörténettel és/vagy fiatalkori daganattal) esetében az MMR gének termékeire irányuló rutin immunhisztokémiai vizsgálat a mikroszatellita instabilitás szűrésével együtt nagyban megkönnyítheti a szindróma diagnózisát.

A tünetcsoporthoz tartozó mutációs spektrum populációnként és etnikai csoportonként változik, de a magyar Lynch szindrómás családok esetében mindeddig nem történt meg ennek felmérése.

Célkitűzések

Az előzmények ismeretében a doktori munka céljai a következőkben foglalhatók össze:

- ☞ Az MLH1 és MSH2 gének mutációs spektrumának felvétele hazai Lynch szindrómás családokban.
- ☞ A feltárt szekvenciavariánsok jellemzése és több szintű értékelése, valamint a betegséggel való összefüggés alapján történő osztályozásuk (patogén mutációk, polimorfizmusok, besorolatlan vagy ismeretlen hatású variánsok).
- ☞ A genotípus és a családokban megnyilvánuló fenotípus közötti összefüggések feltárása.
- ☞ A korábban alkalmazott mutációvizsgálati módszerek mellett negatívnak talált családok esetében az esetlegesen rejtve maradt genetikai hajlamosító tényezők kimutatását lehetővé tevő, a rutin diagnosztikai megközelítésektől eltérő szemléletet igénylő vizsgálatok bevezetése és alkalmazása.
- ☞ Az vizsgálati módszerek továbbfejlesztése és javaslattétel a későbbiek során a genetikai szűrésben történő felhasználásukra.

Anyagok és Módszerek

: A vizsgálatba 55 vastagbélrák-halmozódással érintett családot vontunk be az egész ország területéről.

: A DNS izolálásokat bázikus fenol-kloroform-izoamilalkoholos extrakcióval végeztük.

: Vizsgálataink bevezető szakaszában a normál és variáns közötti konformációs eltérések kimutatásán alapuló HDA (heteroduplex DNS) és SSCP (az egyszálú DNS konformációján alapuló) analízist használtuk. Ezen vizsgálatokhoz egy speciális összetételű, poliakrilamid alapú gélt alkalmaztunk, a vizsgált fragmentumokat ezüstoffestéssel tettük láthatóvá és lézer denzitometriásan (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics) értékeltük. A gélek futtatását Protean II xi Cell (Bio-Rad) készülékkel végeztük.

: A mutációs elszűrő módszerekkel kimutatott, a negatív kontrollétól eltérő futási képpel rendelkező mintákat az adott variáns meghatározása céljából szekvenáltuk. A szekvenálást BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kittal (Applied Biosystems) végeztük, a minták kapilláris elektroforézise ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) berendezéssel, POP-7 polimerrel zajlott. A kiértékelés ABI PRISM Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems) számítógépes programmal történt.

: Az úgynevezett „genomszintű változások” feltérképezésére egy viszonylag új módszert, az MLPA-t (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* - többszörös, ligációval kapcsolt próbaamplifikáció) alkalmaztunk, a mintákat ABI 3130 (Applied Biosystems) készüléken választottuk el. A kitermeléssel, és így a kiindulási kópiaszámmal arányos görbe alatti területek meghatározásához a GeneMapper 4.0 és Peak Scanner 1.0 szoftvereket (Applied Biosystems) alkalmaztuk.

: Az MLPA-val kimutatott, több exont érintő deléciók pontos végpontjainak meghatározására restrikciós emésztési térképezéssel támogatott XL PCR-t alkalmaztunk (Expand Long Template PCR System, Roche), a gyártó ajánlását követve.

: Az MSH2 géntől 5' irányban elhelyezkedő deléciók kiterjedtségének vizsgálatához az egyes DNS szakaszok kópiaszámát valósidejű PCR technikával, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával határoztuk meg. A reakciókörülmények megegyeztek a kitben foglalt ajánlásokkal.

: A QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments* - rövid fluoreszcens DNS szakaszok kvantitatív multiplex PCR amplifikációja) reakcióban 100 ng DNS-t amplifikáltunk Qiagen Multiplex PCR Kit-tel, a reakció során a gyártó ajánlása szerint jártunk el. A félkvantitatív összehasonlítás lehetővé tételéhez a 22. ciklusnál fejeztük be az amplifikálást. A termékek analízisét az MLPA reakciónál leírtakhoz hasonlóan végeztük.

: Az RNS izolálásokat az Ambion RNAqueous vagy RNAqueous Micro kitjének (Applied Biosystems) gyártói javaslata szerint végeztük el. A cDNS átírása minden esetben a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems) történt.

: A TACSTD1 és MSH2 gének relatív RNS expressziójának meghatározásához fluoreszcens TaqMan technológiát alkalmaztunk, a gyártó ajánlásait követve (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). A Q-PCR reakciókat ABI 7900HT készüléken futtattuk, az eredményeket SDS 2.0 szoftverrel (Applied Biosystems) értékeltük.

: Az azonos mutációt hordozó két család 11 tagjának DNS mintája volt elérhető a haplotípus-elemzéshez. A vizsgálatot fluoreszcens primerek segítségével, GeneScan-500 LIZ Size Standard DNS-hossz marker hozzáadásával, ABI3130 Genetic Analyzer készüléken futtattuk le, majd GeneMapper v4.0 szoftverrel értékeltük.

: A mikroszatellita-instabilitás vizsgálatát a *National Cancer Institute/International Collaborative Group on HNPCC* által meghatározott referencia marker panellel végeztük. A vizsgálatokat fluoreszcens primerek segítségével, GeneScan-500 LIZ Size Standard DNS-hossz marker hozzáadásával, ABI3130 Genetic Analyzer készüléken futtattuk le, majd GeneMapper v4.0 szoftverrel értékeltük.

: A mutációk jelenlétét előrejelző immunhisztokémiai vizsgálatok az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Pathológiai Osztályán, dr. Szentirmay Zoltán irányítása alatt történtek.

: A szekvenciaváltozások bioinformatikai analíziséhez az interneten szabadon elérhető adatbázisokat és szoftvereket használtunk.

Eredmények

Eddigi vizsgálataink eredményeinek összefoglalásaként a következő megállapításokat tehetjük:

- ☞ Munkánk során 55, a klinikai adatok alapján Lynch szindrómába sorolt család bevonásával végeztük el az MLH1 és MSH2 gén analízisét és meghatároztuk a két gén mutációs spektrumát. Emellett megkezdtuk az MSH6 gén vizsgálatát is.
- ☞ Mutációs előszűrő módszerek (HDA, SSCP, MLPA) és direkt DNS szekvenálás kombinálásával 49 különböző variáns jelenlétét mutattuk ki.
- ☞ A feltárt szekvenciavariánsok között a 17 féle gyakori polimorfizmus mellett 29 különböző betegségkókozó mutációt (12-t az MLH1, 12-t az MSH2, 1-et az MSH6 génben és 4-et az MSH2-től 5' irányban elhelyezkedő TACSTD1 génben) és 3 besorolatlan variánst mutattunk ki.
- ☞ A feltárt variánsok közül 18 új (39%), amelyeknél a bioinformatikai analízis, az RNS szintű hatás vizsgálata, a betegséggel való koszegregáció, valamint a fehérje funkciójának immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatott elvesztése 16 esetben valószínűsítette a betegséggel való összefüggést – azaz 2 variáns esetében a patogenitás továbbra is kérdéses maradt.
- ☞ Tizenhárom, már korábban is leírt misszensz mutáció esetében is elvégezve a fentebb említett elemzéseket, és ezeket egybevetve az irodalmi adatokkal 6 esetben láttuk indokoltnak a variáns patogén mutációként való besorolását, míg 7 esetben javasoljuk ezen variánsok polimorfizmusként való kezelését.
- ☞ A 29 patogén mutációból a 20 pontmutáció egyik felét az MLH1, a másik felét az MSH2 génben mutattuk ki.
- ☞ A 20 féle patogén pontmutáció 21 családban fordult elő, az MLH1 gén c.350C>T (p.Thr117Met) mutációját két alkalommal is kimutattuk – így ez az első visszatérő

patogén mutáció az MLH1 génben Magyarországon. Hasonlóan, az MSH2 gén 12. exonjában elhelyezkedő c.1264G>T (p.Glu422X) nonszensz mutációt az első hazai visszatérő pontmutációként azonosítottuk ebben a génben.

- ☞ A patogén pontmutációk mellett három, az MLH1 vagy az MSH2 kódoló régióját érintő nagy genomi deléciót és egy inszerciót is kimutattunk. Ezek egyike sem fordult még elő az irodalomban, patogenitásuk igazolására többféle módszert alkalmaztunk.
- ☞ A patogén mutációk egyikeként azonosítottuk az első, MSH6-ot érintő nagy deléciót a magyarországi Lynch szindrómás populációban.
- ☞ A patogén mutációk közé tudtuk sorolni négyféle, az MSH2 gén szabályozásával összefüggő régióban (az MSH2-től 5' irányban elhelyezkedő TACSTD1 génben) megtalálható genomi deléciót, ezzel az elsők között írtuk le a Lynch szindrómára való fogékonyság egy világviszonylatban is új mutációs mechanizmusát. Ezen folyamat a transzkripciós interferencia, amely egy adott gén működésének felfüggesztését jelenti a tőle 5' irányban elhelyezkedő másik (akár másik génhez tartozó) promóter negatív hatásának következményeként. Ezt a jelenséget eddig rákra hajlamosító géneket inaktiváló mechanizmusként még nem figyelték meg.
- ☞ A TACSTD1 gén 5' delécióinak egyikét 2 családban is kimutattunk, ezzel egy újabb visszatérő mutáció jelenlétét igazolva populációnkban. A két deléció közös haplotípussal együtt öröklődését is kimutattuk, így ez a mutáció az első, igazoltan alapító hatás eredményeként létrejött Lynch szindrómát okozó mutáció a magyarországi Lynch szindrómás populációban.

Következtetések

- ✔ Ötvenöt család bevonásával felvettük a hazai Lynch szindrómás populációban az MLH1 és MSH2 gének mutációs spektrumát.
- ✔ A feltárt 49 különböző szekvenciavariáns a gének esetében elszórtan helyezkedik el, tehát mutációs forró pont egyik génben sincs.
- ✔ Amellett, hogy a két génben mutációs forró pontot nem találtunk, kimutattuk az első visszatérő patogén mutációkat is mind az MLH1, mind az MSH2 génben a magyarországi Lynch szindrómás populációban (az MLH1 4. exonjában elhelyezkedő c.350C>T (p.Thr117Met) és az MSH2 gén 12. exonjában elhelyezkedő c.1264G>T (p.Glu422X)).
- ✔ A patogén mutációk gyakorisága annál nagyobb, minél szigorúbb kiválasztási feltételeket alkalmazunk (míg az Amsterdam I feltételeknek megfelelő családok 79%-a, a Bethesda irányvonalak egyes kritériumait teljesítő családok mindössze 26%-a bizonyult hordozónak).
- ✔ A TACSTD1 génben megtalálható genomi deléciók egy új mutációs mechanizmust képviselnek a Lynch szindróma patogenezisében, és gyakoriságukat is tekintetbe véve (az összes patogén szekvenciaeltérés 16%-a) javaslatot tettünk az ilyen típusú mutációk figyelembe vételére és szűrésére a családi daganatszindrómák esetében.
- ✔ A nagy deléciókat és a duplikációt az erősebb kritériumrendszereknek megfelelő családokban mutattuk ki – emellett ezek meghatározása kiemelten fontos, hiszen a TACSTD1 deléciókkal együtt az összes patogén mutáció mintegy 28%-át tették ki.
- ✔ Az IHC és MSI analízisek mutációs előszűrő módszerként való felhasználása kiemelt fontosságú: minden olyan esetben, ahol lehetőség volt az adott (feltételezésünk szerint patogén) mutációt hordozó egyén tumorának MSI és/vagy IHC vizsgálatára, a vizsgálat igazolta a mutáns génről képződő fehérje érintettségét.

☞ Javaslatot tettünk az MSI/IHC vizsgálatoknak a hazai Lynch szindrómás betegek genetikai szűrését megelőző alkalmazására.

A dolgozat eredményei nagyban hozzájárulnak az MMR gének inaktivációs mechanizmusainak megértéséhez, rávilágítva arra, hogy a szindrómára hajlamosító géneken kívül eső szekvenciaregionok károsodása is okozhatja az adott gén szabályozásának hibáját, és ezáltal az ezzel összefüggő szindrómát. Eredményeink más daganatszindrómák esetében is alkalmazhatóak lehetnek, hiszen a kódoló régiókon kívül eső predisponáló mutációk más rákgének esetében sem kizárhatóak, és az ezekre irányuló vizsgálat növelheti az adott szindrómához tartozó mutációk kimutatási arányát.

Igen nagy jelentősége lehet az eredmények klinikai hasznosulásának is, hiszen a családi rákszindrómák esetében a pontos diagnózis felállításához, az ezzel összefüggő genetikai tanácsadáshoz és a megfelelően megválasztott kezeléshez elengedhetetlenül szükséges az adott beteg mutációs státuszának ismerete.

Emellett a dolgozat legnagyobb gyakorlati haszna a felfedett patogén mutációt hordozó, de még nem beteg családtagoknál esetlegesen már kialakult, de még tünetmentes daganatok minél előbbi (akár rosszindulatúvá fajulása előtti) felfedése és kezelése lehet.

A Ph.D. dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok:

Janos PAPP*, Marietta E. KOVACS*, Edith OLAH:

“Germline MLH1 and MSH2 Mutational Spectrum Including Large Genomic Aberrations in Hungarian Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Families: Implications for Genetic Testing”

World Journal of Gastroenterology 2007; 13: 2727-2732. IF(2008): 2,081

**megosztott első szerzőséggel*

Marietta E. KOVACS*, Janos PAPP*, Zoltan SZENTIRMAY, Szabolcs OTTO, Edith OLAH:

“Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome”

Human Mutation 2009; 30: 197-203. IF(2008): 7,033

**megosztott első szerzőséggel*

Konferencia kiadványok és összefoglalások:

Előadás:

KOVÁCS Marietta Éva:

„Az MLH1 és MSH2 hibajavító gének megváltozásai magyarországi HNPCC családokban” XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológia szekció, 2005. március 21-24., Program és összefoglalók:115, 2005 (Összefoglaló száma: GENET-4)

KOVÁCS Marietta Éva, PAPP János, OLÁH Edit:

„Örökletes, nem polyposis talaján kialakuló colorectalis daganatsyndromák (HNPCC) genetikája Magyarországon”

Magyar Onkológia 2005; 49(3S):43.

Poszter:

Marietta Éva KOVÁCS, János PAPP, Edith OLÁH:

“Germline mutations and large genomic rearrangements in mismatch repair genes predisposing to HNPCC in Hungary”

19th Meeting of the European Association for Cancer Research, Programme/Proceedings 2006; 76: 243. (Abstract No. 386)

KOVÁCS Marietta Éva, PAPP János, OTTÓ Szabolcs, SZENTIRMAY Zoltán, OLÁH Edit:

“Új hajlamosító allélek hazai Lynch-szindrómás (HNPCC) családokban”

Magyar Onkológia 2007; 51(4): 349.

Marietta E. KOVACS, Janos PAPP, Zoltan SZENTIRMAY, Szabolcs OTTO, Edith OLAH:

„Deletions in TACSTD1, far upstream of MSH2: a new aspect for genetic testing for Lynch syndrome”

Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2009 Apr 18-22; Denver, CO. Philadelphia (PA): AACR; 2009. Abstract nr 3039