

Predstavitev Oddelka za molekularno diagnostiko

Srdjan Novaković

Nastanek Oddelka za molekularno diagnostiko na Onkološkem inštitutu Ljubljana

Ob združevanju laboratorijske diagnostike znotraj Oddelka za laboratorijsko diagnostiko (hematologija, biokemija in imunologija) se je del Oddelka za tumorsko biologijo preusmeril v molekularno diagnostiko. S pridružitvijo dela molekularne diagnostike Oddelka za patologijo smo oblikovali nov Oddelek za molekularno diagnostiko. Svoje prostore ima v prvem nadstropju stavbe A, skupaj z Oddelkom za eksperimentalno onkologijo.

Programska usmeritev Oddelka za molekularno diagnostiko

Oddelek za molekularno diagnostiko smo zasnovali kot diagnostično-raziskovalni oddelek. To pomeni, da del programa vključuje uvajanje in izvajanje diagnostičnih metod s področja molekularne diagnostike za potrebe Onkološkega inštituta in drugih zainteresiranih zunaj inštituta. Drugi del programa pa predstavlja raziskovalno delo v molekularni in tumorski biologiji. Tudi ta del je usmerjen predvsem v potrebe Onkološkega inštituta, vendar je odprt za sodelovanje tudi z drugimi inštitucijami v Sloveniji in drugod. Sodelovanje poteka prek povezav na raziskovalnih projektih in programih ter tudi v izobraževanju.

Diagnostika

Na Oddelku za molekularno biologijo trenutno izvajamo diagnostične teste za potrebe genskega svetovanja s področja raka dojke in molekularno diagnostiko pri limfomih.

Rak dojke

Avtosomne dominantne mutacije, ki so najpogosteje povezane s karcinomom dojke, so mutacije v supresorskih genih *BRCA1* in *BRCA2*. Verjetnost, da se avtosomna mutacija prenese v naslednjo generacijo, je 50 %, s čimer se pomembno poveča ogroženost za nastanek raka na dojki (pri nosilcih mutacije). Zato je smiselno določati prisotnost teh mutacij in tako pravočasno predvideti ogroženost za nastanek raka na dojki pri preiskovani osebi ter pravilno ukrepati. S temi testi želimo zajeti čim večje število mutacij, ki so značilne za dedni rak dojke. Zato bomo nadaljevali iskanje in določanje najznačilnejših mutacij tako v genu *BRCA1* kot v *BRCA2*. Trenutno določamo naslednje:

BRCA1:

- Mutacija 1806 C>T ex 11
- 300 T>G (C61G) ex 5
- 310 G>A (C64Y) ex 5
- 5382insC (stop 1829) ex 20

BRCA2:

- Slovenska mutacija IVS-16

Limfomi

Eden od izzivov v onkologiji je pravilna opredelitev hematoloških malignomov na podlagi molekularnobioloških znakov. Podobna ali enaka morfologija tumorskih celic ne pomeni vedno tudi molekularne podobnosti. Prav zaradi tega je molekularnobiološka opredeljenost tumorskih celic pomembna za pravilno načrtovanje zdravljenja in spremljanje bolezni.

Klonalnost je diagnostično merilo za ločevanje neoplazije in reaktivnega procesa. Večina neoplastičnih procesov je monoklonalnih (izhajajo iz ene patološko spremenjene celice), reaktivne (benigne) limfoidne proliferacije pa so večinoma poliklonalne.

- Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij z metodo PCR
 - o Dokazovanje preurejenega gena za težko verigo imunoglobina (IgH) – limfomi tipa B.
 - o Dokazovanje preurejenega gena za gamaverigo receptorja T (TcRg) – limfomi tipa T.
- Dokazovanje kromosomske translokacije t(14;18)(q32;q21) pri folikularnem limfomu (bcl-2); klasična PCR ali kvantitativna PCR.
- Dokazovanje kromosomske translokacije t(11;14)(q13;q32) pri limfomu plaščnih celic (bcl-1) z metodo PCR (klasična).

Raziskovanje

Raziskovalno dejavnost Oddelka za molekularno diagnostiko sooblikujeta dva celostna pristopa:

- 1) razvijanje in uvajanje novih metod v molekularni diagnostiki (za potrebe različnih rakavih bolezni);
- 2) temeljne raziskave s področja tumorske imunologije.

Razvijanje in uvajanje novih metod v molekularni diagnostiki

V tem sklopu potekajo raziskave, kjer ocenjujemo uporabno vrednost različnih molekularnobioloških označevalcev za spremljanje bolezni, napovedovanje poteka bolezni in odgovora na zdravljenje ali za zgodnje odkrivanje razširjenosti bolezni.

Iz tega sklopa želim omeniti:

- molekularnobiološko določanje telomeraznih podenot v plazmi bolnikov z različnimi vrstami raka (rak dojke, ščitnice, maligni melanom, limfomi ...);
- molekularnobiološko določanje mRNA za tirozinazo pri bolnikih z malignim melanomom.

V ta sklop raziskav spada še prenos (uvajanje) v literaturi že opisanih molekularnobioloških metod v rutinsko delo oddelka. Predvsem gre za metode, ki imajo veliko uporabno vrednost pri genskem svetovanju, zgodnjem odkrivanju bolezni ali pri postavljanju diferencialne diagnoze. Med slednje spadajo metode za dokazovanje mutacij pri naslednjih vrstah raka.

Črevesni rak

Nastanek črevesnega raka je povezan z genetskimi spremembami, ki jih v grobem lahko razdelimo v dve kategoriji: kromosomske nestabilnosti (85 % primerov) in mikrosatelitne nestabilnosti (15 % primerov). Kromosomske nestabilnosti so najpogostejše na kromosomih 5q, 18q, 17p in v predelih, kjer se nahaja onkogen *KRAS*. Najpogosteje prizadeti geni so *APC* (5q), *DCC/MADH2/MADH4* (18q) in *p53* (17q). Med mutacije, ki so tudi sicer med prvimi mutacijami v zgodnjih fazah nastanka črevesnega raka in so potrjene kot germinalne mutacije, spadajo mutacije v genu *APC*. Mikrosatelitna nestabilnost je posledica mutacij v popravljalnih genih (MMR – mismatch repair genes), ki niso več sposobni kodiranja normalnih popravljalnih proteinov. Posledica tega so pomnoženi ali manjkajoči deli DNA (največkrat v nekodirajočih območjih), ki spremenijo bralne okvirje v različnih genih. Za nastanek raka pa so pomembne mutacije, ki na takšen način nastanejo v onkogenih in tumorskih supresorskih genih, kjer povzročijo maligno transformacijo. Take mutacije so lahko germinalne in somatske.

Za potrebe genetskega svetovanja in spremljanja dedno predpogojenih oblik črevesnega raka načrtujemo:

- določanje *APC* mutacij pri FAP (famiarna adenomatozna polipoza)
 - del (AAAAG) kodon 1309
 - APC* 11307K – T>A
- določanje mikrosatelitne nestabilnosti in mutacij v genih MMR pri HNPCC (dedni nepolipozni črevesni rak)
 - hMSH2*
 - hMLH1*

Maligni melanom

Dominantno podedovane mutacije pri bolnikih z malignim melanomom so opisane v dveh genih – *CDKN2A* in *CDK4*. Gen *CDKN2A* kodira protein p16, ki zavira delovanje proteinske kinaze *CDK4*, s čimer blokira delovanje tumorskega supresorskega gena *RB* (retinoblastomski gen). Večina mutacij *CDKN2A* se pri dednem melanomu pojavlja v eksonih 1á in 2 (redko v eksonu 1â), medtem ko do sedaj ni bilo opisanega primera z mutacijami v eksonu 3. Mutacije v genu *CDK4* lahko povzročijo nastanek nefunkcionalnega proteina ali pa preprosto preprečijo vezavo proteina p16 na konsenzno sekvenco gena *CDK4*, zaradi česar postane gen nefunkcionalen.

Glede na navedeno načrtujemo uvajanje:

- mutacije v genu *CDKN2A*,
- mutacije v genu *CDK4*.

Medularni rak ščitnice

Identifikacija germinalnih mutacij, povezanih z multiplo endokrino neoplazijo (MEN), ter izražanje sindromov tipa 1

in 2, sta narekovala preventivno testiranje oseb s povečanim tveganjem. Pri bolnikih, pri katerih je dokazana dedna oblika medularnega raka ščitnice (MTC), je zgodnja odstranitev ščitnice pogosto povezana z ozdravitvijo. Za nastanek različnih sindromov tipa 2 (MEN 2A, MEN 2B, MTC, FMTC) so odgovorne dedne mutacije v onkogenu *RET* (lociran na kromosomu 10). Najpogosteje spremenjena območja tega gena so eksoni 10, 11, 13, 14, 15 in 16. Najpogostejša vrsta mutacij so mutacije s spremenjenim pomenom (missense mutacije).

Za rutinsko diagnostiko nameravamo pripraviti sonde in primere za znane točkovne mutacije na različnih kodonih. Upoštevali bomo pojavnost mutacij v slovenski populaciji in poskusili bomo pokriti čim večji odstotek populacije. Poleg tega nameravamo uvesti tudi metodo za odkrivanje mutacij na podlagi razlik v temperaturi taljenja vezi med baznimi pari in sekveniranje le-teh.

Temeljne raziskave s področja tumorske imunologije

Pri večini temeljnih raziskav na Oddelku za molekularno diagnostiko poskušamo uporabiti pridobljeno znanje iz molekularne in tumorske biologije. Če je naše rutinsko delo usmerjeno v razvoj in uvajanje novih metod za odkrivanje in spremljanje rakavih bolezni, je večina temeljnih raziskav usmerjenih v pripravo in testiranje novih bioloških zdravil – predvsem tumorskih vakcin.

Tako smo v preteklosti pripravili klasično tumorsko vakcino in ekspresijske kasete za nekaj rekombinantnih vakcin (glej prejšnjo številko Onkologije). Naša sedanja usmeritev na tem področju je oblikovanje in testiranje tumorskih vakcin, ki temeljijo na uporabi dendritskih celic. Tekoče raziskave zajemajo različno uporabo dendritskih celic in spremljanje mehanizmov, prek katerih ti pripravki sprožijo protitumorski imunski odgovor.

Sedanji raziskovalni projekti

- Priprava tumorskih vakcin: hibridomi in gensko spremenjene vaccine. Od leta 2004 do 2007. Odgovorni nosilec dr. Srdjan Novakoviæ.

Povezave z drugimi raziskovalnimi inštitucijami

Oddelek za molekularno diagnostiko je nastal šele letos (2005), tako da se bodo prave povezave z domačimi in tujimi ustanovami šele oblikovale. Navajam samo nekatere od ustanov, s katerimi trenutno sodelujemo:

- Medicinska fakulteta v Ljubljani
 - o Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo
 - o Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
- Kemijski inštitut Ljubljana

V tujini sodelujemo z *Vrije Universiteit Brussel* pri iskanju mutacij v genih *BRCA* v slovenskih družinah z dednim rakom dojke in/ali jajčnikov, v okviru projekta *Genetic and environmental risk factors for melanoma: translation into behavioural change* pa sodelujemo pri iskanju in ocenjevanju različnih dejavnikov tveganja za nastanek melanoma. V okviru projekta je predvidena ocena prevalence in penetrance pomembnejših mutacij pri bolnikih z melanomom.

Sedanje stanje in perspektiva

Razumevanje vzrokov za nastanek večine rakavih bolezni je še vedno omejeno. Zadnja odkritja v molekularni biologiji, genetiki in tumorski biologiji predstavljajo temelj za razvoj novih diagnostičnih metod in za pripravo novih zdravil. Nova diagnostika omogoča boljše molekularno definicijo raka in uvajanje celo vrsto novih dejavnikov (spremembe v posameznih genih, različni genski profili, proteinska ekspresija), na podlagi katerih lahko predvidevamo potek rakave bolezni. Cilja molekularne diagnostike sta identifikacija tipov celic, ki so predisponirane za nastanek tumorja, in identifikacija mehanizmov, ki privedejo do maligne transformacije.

Onkološki inštitut je kot osrednja ustanova za raka zavezan k temu, da spremlja in uvaja nove diagnostične in

terapevtske pristope v korist bolnikov z rakom. S tem namenom je nastal tudi Oddelek za molekularno diagnostiko, kjer združujemo vse tovrstne dejavnosti Onkološkega inštituta na enem mestu. Že v tem trenutku izvajamo nekaj metod, ki so nepogrešljive pri sodobni rutinski diagnostiki raka. Veliko dela pa bo treba vložiti v razvoj novih in prenos obstoječih metod v rutinsko diagnostiko. Prav zaradi tega je raziskovalni del novega oddelka v tem trenutku obširnejši kot njegova rutinska dejavnost. Pričakujemo, da se bo to razmerje z leti spremenilo v korist uporabne diagnostike.

