

MOLEKULARNA GENETIKA PLJUČNEGA RAKA

Damjan Glavač, Metka Ravnik-Glavač

Številna odkritja zadnjih let dokazujejo, da je rak genetska bolezen. Tudi za nastanek pljučnega raka je vzrok kopičenje okvar v genih, ki so neposredno ali posredno vpleteni v uravnavanje rasti, delitve, diferenciacije ali umiranje celic. Z metodami sodobne molekularne genetike so že odkrili nekatere genetske dejavnike, ki imajo pomembno vlogo pri pljučni kancerogenezi, vendar pa natančni mehanizmi še niso znani. Pljučni rak je tudi paradigmatični primer raka inducirane s karcinogeni. Epidemiološke študije so namreč pokazale neposredno povezavo med pljučnim rakom in karcinogeni iz okolja, predvsem npr. cigaretnim dimom, organskimi topili, ioni nekaterih težkih kovin, azbestom, radonom ipd. Vendar pa ostaja večina molekularnih dogodkov na nivoju celice, ki kulminirajo v nastanku pljučnega raka, še vedno le slabo razumljenih. To, da večina kadilcev ne razvije pljučnega raka, navaja na obstoj podedovane predispozicije ali na vpliv dodatnih karcinogenov. Respiratorne bolezni se prav tako nagibajo k razvoju pljučnega raka. Študirali so družine s pljučnim rakom. Ugotovili so, da je razvoj pljučnega raka pri bolnikih, mlajših od 50 let, primerljiv z Mendlovim kodominantnim dedovanjem, ki velja za zelo redke avtosomalne gene. Povezanosti gena z boleznijo pa niso mogli potrditi, če so v študij zajeli tudi starejše bolnike (nad 50 let) s pljučnim rakom. Določeni encimi lahko metabolizirajo pro-mutagene in prokarcinogene spojine v tobačnem dimu. Tako je npr encim citokrom P4501A1 zelo močno izražen na nivoju RNA v normalnem pljučnem tkivu kadilcev, medtem ko ga skoraj ni zaslediti v normalnem tkivu nekadilcev. Sposobnost metabolizacije karcinogenov tobačnega dima je torej genetsko pogojena, kar se kaže pri posameznikih kot večja dovzetnost za razvoj pljučnega raka.

Hiter razvoj genske tehnologije in molekularne biologije je omogočil prepoznavanje številnih genskih alteracij pri pljučnem rakom. Toda za večino dosedaj znanih genetskih nepravilnosti sta vprašljivi tako njihova pomembnost v razvoju kancerogeneze pljučnega raka kot tudi njihova molekularno diagnostična vrednost. Njihovo diagnostično pomembnost zato otežuje tudi to, da je bila večina molekularno genetskih študij narejena na celičnih kulturah drobno-celičnega karcinoma, ki predstavlja le okoli 20% celotnega pljučnega raka. Specifični genetski dogodki, ki vodijo do neoplazije, se tako razlikujejo od vrste tumorja in jih je težko posplošiti na kancerogenezo pljučnega raka. Najpomembnejša odkritja v zadnjih letih se nanašajo na genetske okvare, povezane z aktivacijo **onkogenov** in inaktivacijo za **tumorje zaviralnih genov**.

Onkogeni

Geni, ki so odgovorni za pozitivne signale, so onkogeni. Onkogeni so mutirane oblike človeških celičnih genov, proto-onkogenov, ki so najpogosteje vključeni

v prenos signalov ali regulacijo izražanja genov. Skupno vsem onkogenom je, da mutacije v teh genih vodijo do dodatnih funkcij njihovih proteinov oz. povečajo aktivnost njihovih proteinov. V normalnih celicah obstaja interakcija med pozitivnimi (celična rast) in negativnimi signali (diferenciacija in ustavitev rasti celic), kar ohranja ravnovesje v celici. Prekomerna stimulacija pa povzroči nekontrolirano celično delitev. Onkogeni delujejo dominantno, kar pomeni, da je prekomerno delovanje enega samega alela dovolj za povečano rast celice, katere rezultat je klonalna ekspanzija te celične linije. V resnici onkogeni delujejo na vseh nivojih biokemijskih procesov, vključujoč hormone, receptorje, encime in transkripcijske dejavnike. Pri pljučnem raku je predvsem pomembna aktivacija onkogenov iz družine myc in ras ter vloga rastnih faktorjev predvsem epidermalnega rastnega faktorja (EGF) in transformirajočega rastnega dejavnika (TGF- α).

Tabela 1: Genetske alteracije v onkogenih in za tumorje zaviralnih genov pri pljučnem raku

Drobnocelični karcinom

c-myc, L-myc, N-myc
 c-raf, c-myb, c-erb
 c-fms, c-rlf
 p53
 Rb

Ostali tipi pljučnega raka

K-ras, N-ras, H-ras
 c-myc, c-raf, c-fes, c-erb
 C-sis, bcl-1
 p53
 Rb

Onkogeni družine ras

Onkogeni družine ras (K-ras, N-ras, H-ras na treh različnih kromosomskih lokusih 1, 11 in 12) so med najbolj pogosto aktiviranimi onkogeni pri raku na splošno. Gen Ras kodira protein, ki se nahaja znotraj plazemske membrane in ima GTP-azno aktivnost ter sodeluje pri prenosu signalov, pomembnih za indukcijo celične rasti. Aktivirajo ga točkaste mutacije (najpogostejše so na kodonih 12, 13 in 61), ki spremenijo aminokislinsko sekvenco p21. Najpogostejša je zamenjava glicina na mestu 12 z valinom. Posledica mutirane oblike proteina je počasnejši prenos signala v celico, kar povzroči nekontrolirano indukcijo celične rasti. Mutacije so identificirali v približno 30% adenokarcinomov kadičev in so povezane s slabo prognozo za bolnika.

Onkogeni družine myc

Genetske spremembe v c-myc onkogenu so bile ene prvih identificiranih pri pljučnem raku. Myc ima pomembno vlogo pri mehanizmu podvojitve DNA, uravnavanju prehoda iz G0 v G1 v celičnem ciklusu in diferenciaciji celic. Celična kultura drobnoceličnega karcinoma pljuč z močno izraženim myc onkogenom je imela zelo kratek čas podvojevanja in povečano odpornost na X-žarke. Povečana ekspresija v drobnoceličnih karcinomih pljuč je povezana s slabim odzivom bolnika na kemoterapijo in skrajša preživetje.

Rastni dejavniki in regulacija kontrole rasti

Usklajena rast, razvoj tkiv, obnova in odmiranje celic temelji na sposobnosti celic, da medsebojno komunicirajo. Regulacija poteka npr. z izločanjem rastnih faktorjev in povečanim izražanjem receptorjev zanje. Tumorske celice, ki proizvajajo rastni faktor in ekspresirajo receptor, lahko kažejo avto-stimulatorno ali avtokrino delovanje. Celice, ki so regulirane po takem mehanizmu, imajo naslednje značilnosti. Ko izločajo biološko aktivni rastni faktor, pride tudi do prekomernega razmnoževanja. Protitelesa, ki se vežejo specifično na rastni dejavnik, bodo to razmnoževanje upočasnila. Erb B-2 je član družine epidermalnega rastnega faktorja (EGFR), ki obsega tri gene strukturno podobne strukturi receptorja: t.j.; z zunanjo domeno za vezavo liganda, transmembransko domeno in citoplazmatsko tirozin kinazno domeno. Erb B-2 je močno aktiviran v adenomih in ploščatoceličnih karcinomih pljuč, medtem ko se slabo izraža ali pa sploh ne v drobnoceličnem karcinomu. Visoko izražanje Erb B-2 v adenokarcinomu je povezano s skrajšanim preživetjem.

Transformirajoči rastni dejavnik (TGF-alpha) je enojna polipeptidna veriga, ki jo sestavlja 50 aminokislin. Strukturno in funkcijsko je podoben epidermalnemu rastnemu dejavniku (EGF) in se veže na EGFR. Ugotovljeno je bilo, da je TGF-alpha pomemben rastni dejavnik z avtokrinim delovanjem predvsem pri skvamoceličnem karcinomu in adenokarcinomu pljuč.

Tumorsko zaviralni geni

Druga skupina genov, ki je morda še bolj pomembna za nastanek in progresijo različnih tipov pljučnega raka, so za tumorje zaviralni geni. Ti geni kodirajo raznoliko skupino proteinov, ki s številnimi mehanizmi, negativno regulirajo celično rast in razvoj. Najnovejša odkritja biokemijskih in funkcionalnih študij za tumorje zaviralnih genov so pokazala, da so ti geni vključeni v številne interakcije protein-protein. Raziskave so bile najbolj intenzivno usmerjene v spoznavanje uravnavanja celičnega cikla. Da postanejo tumor supresorski geni vključeni v onkogenezo, morajo biti mutirani, tako da izgubijo svojo normalno vlogo pri negativni regulaciji. Najpogostejše mutacije so zato velike delecije ali manjše mutacije, ki povzročijo prezgodnje končanje prepisa in nastanek skrajšanega proteina, ki izgubi svojo normalno vlogo. Do sedaj je bilo izoliranih in karakteriziranih približno trideset tumor supresorskih genov, vendar imajo pri pljučnem raku pomembno vlogo le trije in sicer na kromosomskih lokusih; 3p, 13q in 17p. Izguba kratke ročice kromosoma 3p je sploh najbolj pogosta opažena mutacija pri pljučnem raku, saj je bila najdena pri 100% primerih drobnoceličnega karcinoma in pri 50% drugih pljučnih tumorjev.

Gen RB

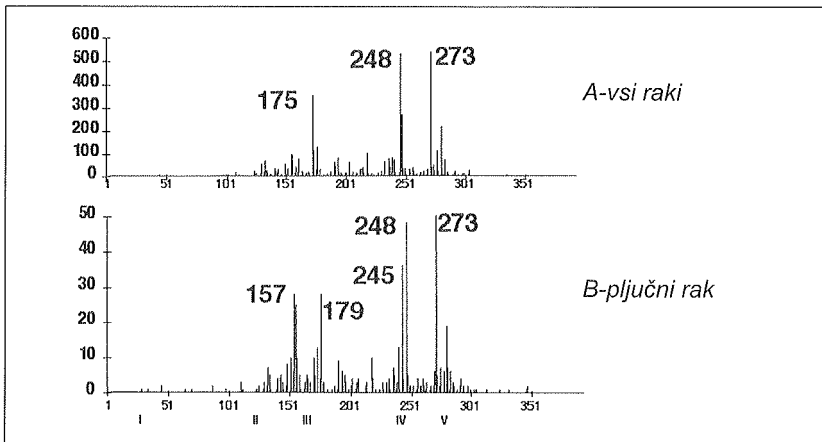
Rb je eden prvih kloniranih tumorsko zaviralnih genov in je odgovoren za nastanek družinske oblike retinoblastoma. Gen je lokaliziran na kromosomu 13q14 in obsega približno 200 kilobaznih parov DNA. Sestavlja ga 27 eksonov in se izraža v proteinu 110kDa, skoraj v vseh telesnih celicah. Protein je lokaliziran v jedru celice. Delecija RB gena ali njegova inaktivacija zaradi mutacij je

povezana z razvitjem retinoblastoma in sarkoma v družinah z dedno obliko retinoblastoma. Mutirani ali deletirani *RB* gen pa prispeva tudi k nastanku številnih drugih tumorjev, saj so bile mutacije v *RB* genu najdene tudi v večjem številu drobnoceličnih pljučnih karcinomov in v manjšem številu (33% primerov) karcinomov mehurja in dojke. Mutacije v genu so lahko delecije ali insercije, ki ponavadi skrajšajo *RB* protein, ki je praviloma nestabilen. Take vrste mutacij so dokaz za izgubo dejavnost proteina. Veliko bolj informativne so točkaste mutacije, ki spremenijo eno aminokislino. Take mutacije so našli v dveh predelih *RB* gena, v delu, ki kodira aminokislino med 393 in 572 in v predelu, ki kodira aminokislino od 646 do 772. Ta dva predela *RB* proteina sestavljata vezavno mesto oziroma interakcijsko mesto za številne celularne in virusne proteine. Vloga *RB* proteina je najbrž ta, da sodeluje s transkripcijskimi dejavniki in uravnava njihovo zmožnost, da delujejo na številne gene, ki so potrebni za vstop v S-fazo celičnega cikla. *RB* protein vsaj delno uravnava fosforilacijo specifične kinaze. V mirujoči celici, v fazi G0 ali G1, je *RB* protein prisoten v obliki kompleksa s celičnim transkripcijskim faktorjem E2F. E2F vpliva na ucinkovitost številnih genov, ki kodirajo encime, ki sintetizirajo nukleotide in polimerizirajo DNA (S faza genske ekspresije). Če je *RB* gen okvarjen v predelih vezavnih mest, pride do sprostitve transkripcijskih dejavnikov, s tem pa *RB* gen izgubi svojo nadzorovalno vlogo v celičnem ciklu. E2F protein se sprosti že v G1 fazi in stimulira transkripcijo genov, ki so normalno dejavni v S-fazi. Veliko število celic v S- fazi je slab prognostični kazalec za večino tumorjev.

Gen TP53

Gen *TP53* je lokaliziran na kratki ročici kromosoma 17p13. Sestavlja ga 11 eksonov in proizvaja 2,2 do 2,5 kb mRNA, ki se izraža v skoraj vseh tkivih v telesu. *P53* ima ključno vlogo pri kontroli genomske stabilnosti. Po fizikalni ali kemični poškodbi DNA je naloga *p53* namreč ta, da ustavi rast celice, to pa celici omogoči, da popravi svojo DNA. V primeru, da je okvara DNA prevelika, pa nastopi apoptotična smrt celice. V inaktivacijo *p53* proteina so vključeni številni mehanizmi. Najpogostejši mehanizem inaktivacije *p53* proteina v človeških tumorjih je zaradi mutacij v *TP53* genu. *p53* pa inaktivirajo tudi produkti virusnih in celičnih onkogenov. Mutacije v *TP53* so našli v približno 50 do 60% vseh tumorjev. Najpogostejše so točkaste mutacije (87%) na enem alelu gena, ki povzročijo nastanek napačnega proteina, drugi alel gena pa se izgubi. Večina mutacij je v predelu aminokislin 120 in 290. *P53* mutacije so tako zelo značilne tudi za pljučne tumorje in so jih našli v 33% pri adenocarcinomih in celo v 70% pri drobnoceličnem karcinomu. Te mutacije so večinoma transverzije GC v TA. (Slika 1) Ugotovljena je bila zelo močna povezava med pogostostjo teh mutacij in trajanjem izpostavljanja tobačnemu dimu. Prav tako so ugotovili, da se alteracije v *p53* zgodijo relativno v zgodnji fazi razvoja tumorja saj je bilo 30% mutacij najdenih že pri milih ali zmernih displazijah in nad 60% *p53* mutacij pri hudih displazijah. Kljub številnim študijam pa za enkrat ne kaže, da bi *p53* imel kakšno klinično pomembno vrednost za prognozo.

Slika 1: Pogostost in narava mutacij v genu *TP53* pri pljučnem raku



Gen *VHL*

Gen *VHL* je bil odkrit leta 1993 pri študiju avtosomno dominantne dedne bolezni Von Hippel-Lindau. Kodirajoči del gena vsebuje 852 nukleotidov, razdeljenih v tri eksone. *VHL* gen se izraža v vseh človeških tkivih, protein sestoji iz 213 amino kislin. Ker je izguba heterozigotnosti (t.j. kromosoma 3p) ena najbolj pogostih napak v pljučnih tumorjih, so predvidevali, da bi lahko imel ta gen pomembno vlogo tudi pri pljučnem raku. Izkazalo pa se je, da je gen mutiran samo v zelo redkih primerih drobnoceličnega karcinoma.

Zaključki in perspektiva molekularne genetike

Prenehanje izpostavljanja zunanjim kancerogenom (tobačnemu dimu, kemikalijam ipd.) je trenutno najbolj učinkoviti način preprečevanja pljučnega raka. Ker pa tudi v prihodnosti ni pričakovati uresničitve tega cilja, ostajajo zgodnja detekcija in nove terapevtske možnosti edino upanje. Molekularno genetska diagnostika bo verjetno v prihodnje mnogo bolj prisotna pri identifikaciji visoko rizičnih oseb in pri zgodnjem odkrivanju pljučnega raka nasploh. Gensko zdravljenje bo v prihodnje verjetno mogoče. Dokazali so, da transfekcija tumorsko zaviralnih genov ali onkogenov v večini primerov zavre tumorsko rast v rakavih celičnih linijah. Ker so celice respiratornega sistema zelo primerna tarča za različne načine genskega zdravljenja (rekombinantne adenoviruse, retroviruse in kationske liposome), lahko že v bližnji prihodnosti pričakujemo na tem področju velik napredek.

Literatura

1. Swisher SG, Roth JA, Gene therapy for human lung cancers. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7(3):603-16
2. Salgia R, Skarin AT, Molecular abnormalities in lung cancer, *J Clin Oncol* 1998; 16(3): 1207-17.
3. Groeger AM, Esposito V, Mueller MR, Caputi M, Kaiser HE, Giordano A, Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Res* 1997; 17(4A):2519-22 .
4. Martinet Y, Hirsch ER, Martinet N, Vignaud JM, Mulshine JL., (Eds.) *Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention*, 1998, Birkhauser Verlag, Berlin.