

NASTAVNI TEKST

TUMOR SUPRESORSKI GENI

Napisali: **Doc. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus, prof. dr. sc. Floriana Bulić-Jakuš, Krešimir Radić**

Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Tumor supresorski geni igraju ključnu ulogu u nastanku i progresiji karcinoma čovjeka. Promjene ovih gena pronađene su u velikom broju nasljednih i nenasljednih karcinoma. Osobe koje su naslijedile mutaciju tumor supresorskog gena pokazuju sklonost na razvoj specifičnog nasljednog karcinoma. Slijedi pregled novijih otkrića o tumor supresorskim genima i njihovoj ulozi u nastanku pojedinih nasljednih karcinoma. Posebna pažnja posvećena je nedavno otkrivenom tumor supresorskom genu *APC* (adenomatozna polipoza debelog crijeva od engl. *adenomatous polyposis coli*) odgovornom za nastanak bolesti familijarne adenomatozne polipoze (FAP).

Uvod

Poznato je da su razvoj i progresija tumora uzrokovani stupnjevitim promjenama gena. Stanični ciklus reguliran je nizom gena koji djeluju na različitim razinama normalnog života stanice: stajičnom rastu, proliferaciji i diferencijaciji. Toj skupini pripadaju proto-onkogeni i tumor supresorski geni (antionkogeni). Za razliku od proto-onkogeni čija mutacijska aktivacija uzrokuje karcinogenezu, tumor supresorski geni moraju biti inaktivirani ili izgubljeni da bi došlo do neoplastične preobrazbe stanice (tablica 1). Ta spoznaja čini jednu od tri kardinalne osobine tumor supresorskih gena: 1. recesivni su te do razvitka tumora može doći tek kod bialelne inaktivacije; 2. nasljeđivanje jednog mutiranog alela od roditelja povećava sklonost razvoju tumora jer je za potpuni gubitak funkcije dovoljna jedna dodatna mutacija; te 3. isti gen često je inaktiviran u nenasljednim (sporadičnim) tumorima.

Što rade i tko su tumor supresorski geni?

Tumor supresorski geni, antionkogeni ili emergeni (*emero*, grčki ukrotiti, pripitomiti) su geni čiji gubitak funkcije rezultira razvitkom tumora. To je skupina gena koji priječe zloćudnu preobrazbu stanice na različitim razinama. Otkriveni su prilikom hibridizacije zdravih i zloćudnih stanica: bio je to prvi dokaz da normalni genom ima sposobnost vratiti tumorsku stanicu u okvire normalnog rasta. Fuzija zdravih i zloćudnih stanica potiskuje tumorski fenotip u većini ispitanih kombinacija uz uvjet da hibridi zadrže potpuni broj kromosoma zdrave stanice. Ponovna pojava tumorskih svojstava u ovakvim pokusima uzrokovana je gubitkom jednog od kromosoma normalne stanice.

Ipak, najvažnije polje istraživanja antionkogeni proizišlo je iz

otkrića da gubitak ili inaktivacija tumor supresorskih gena igra ključnu ulogu u nastanku retinoblastoma, Wilmsovog tumora i osteosarkoma. Ovo ukazuje na činjenicu da normalni aleli tumor supresorskih gena mogu suzbiti neoplastičnu preobrazbu pripadajućih tkiva. Nakon otkrića i kloniranja i drugih tumor supresorskih gena kao što su *p53* i *APC*, gena *VHL* odgovornog za nastanak von Hippel-Lindau sindroma te gena *NF1* (neurofibromatoze tipa 1), ali i već dostatnih dokaza da bi i gen *DCC* (od engl. *deleted in colon cancer*) mogao biti antionkogen, ovo se polje istraživanja brzo širi, te s pravom možemo reći da je nakon "desetljeća onkogeni", kojeg su predstavljale 80-te godine, "desetljeće tumor supresorskih gena", što se molekularne biologije tiče, bile 90-te godine. Krajnji ishod velikog zanimanja za tumor supresorske gene vidi se u tablici 2, gdje su navedeni tumor supresorski geni, njihov kromosomski smještaj i bolesti u čiji su razvitak uključeni.

U novije vrijeme otkrivaju se biokemijski mehanizmi regulacije staničnog rasta putem produkata tumor supresorskih gena. Mreža puteva prijenosa signala čiji su sudionici je složena, a sastoji se od više ciklusa u kojima sudjeluju razne skupine staničnih proteina. Krajnja reakcija takvih ciklusa i mreža je represija stanične diobe, pri čemu su najbolje proučeni produkti gena *RB* i *p53*, bjelancevine smještene u jezgri.

Nefosforilirani produkt gena *RB* koči prijelaz stanica iz G0/G1 faze staničnog ciklusa u S fazu vežući se na čimbenik transkripcije E2F kojem onemogućuje poticanje transkripcije gena odgovornih za staničnu proliferaciju.

Slično tome, divlji tip proteina *p53* može zaustaviti proliferaciju u G1 fazi kada je stanica izložena genotoksičnim tvarima (npr. lijekovima) i mnogim oblicima staničnog stresa, poput iradijacije, hipoksije i aktivacije onkogeni. Razina jezgrinog *p53* proteina se povećava i proliferacija se zaustavlja ostavljajući vremena staničnoj mašineriji za popravak DNA. Ukoliko je oštećenje obimnije, *p53* inducira apoptozu stanice.

Genske promjene *p53* gena pronađene su u oko polovice svih tipova karcinoma čovjeka uključujući 70% karcinoma kolona i gotovo 100% karcinoma malih stanica pluća. Ektopični divlji tip proteina *p53* može zaustaviti proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva čiji su vlastiti geni *p53* neispravni. Istraživanja stru-

kture produkata gena *RB*, *p53*, i *WT1* pokazala su da se oni vežu za DNA (*WT1* ima strukturu "cinkovi prsti"), i kao takvi imaju ulogu u transkripciji ili replikaciji DNA. Time mogu smanjiti aktivnost gena odgovornih za staničnu proliferaciju ili diferencijaciju, kao i gena potrebnih za održavanje staničnog mirovanja. Nasuprot ovih, gen *NF1* kodira bjelančevinu koja je aktivna u citoplazmi. To je tzv. GTP-aza aktivirajući protein koji, međudjelovanjem s proteinom p21 ras, djeluje na prijenos unutarstaničnih signala i tako regulira staničnu proliferaciju.

Opširnije o APC-u

Dva su genetička entiteta koji znače vrlo visok rizik razvoja karcinoma debelog crijeva u ranom životnom dobu. To su: FAP i nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva HNPCC. Familijarna adenomatozna polipoza debelog crijeva nasljeđuje se autosomno dominantno. U osoba s tako nasljeđenim genom razvija se tijekom drugog i trećeg desetljeća života, 100 - 1000 dobroćudnih tumora (adenomatoznih polipa) debelog crijeva. Iako adenomi nisu opasni po život, neki od ovako velikog broja adenoma, ukoliko se ne odstrane, neumitno prerasta u zloćudne tumore. FAP se, međutim, manifestira i izvan debelog crijeva, te oboljeli razvijaju lezije mrežnice, osteosarkome, dezmoidne tumore kože i tumore mozga. Za nastanak FAP i HNPCC odgovorne su mutacije gena *APC*, izoliranog 1991. godine sa kromosoma 5q21 (u Genskoj banci pod imenom DP2.5). Gen *APC* sastoji se od 15 eksona (dijelova gena koji ulaze u sastav mRNA i kodiraju slijed aminokiselina bjelančevine) od kojih su prvih 14 relativno kratki, ali je ekson broj 15 jedan od najdužih eksona uopće otkrivenih i obuhvaća tri četvrtine kodirajuće regije gena (6.577 od ukupno 8.538 pb).

Proteinski produkt gena *APC* dužine je 2.843 aminokiseline, mase je 311,8 kD i pokazuje vrlo malo homologije s drugim proteinima. Mutacije gena uzrokuju sintezu proteina čija masa varira od 27 - 147 kDa. Veličina kodirajuće regije gena otežava identifikaciju svih mutacija, pa se njihov broj povećava svakodnevno. Iako sve poznate mutacije u bolesnika s FAP rezultiraju stvaranjem proteina kojem manjka karboksi kraj, kliničke osobitosti FAP nisu jedinstvene.

Nedavno je pokazano da središnja regija proteina sadrži dvije klase aminokiselina koje APC vežu za beta-*katenin*. Potonji protein, smješten u citoplazmi, veže se na međustaničnu adhezijsku molekulu kadherin, što pokazuje da je protein APC uključen u međustaničnu adheziju. Osim arhitektonske uloge u stanici APC preko beta-*katenina* sudjeluje u važnom putu prijenosa signala koji se u sisavaca zove *wnt*.

Informacije stečene posljednjih godina u vezi s homeostatskim staničnim ciklusom APC/*beta-katenin*/*TCF* sugeriraju kako promjene u međustaničnoj adheziji mogu imati značajan učinak na stanični ciklus, rezultirajući tako, kao i kod p53 tumor supresora, izazivanjem apoptoze. Gubitak funkcije tumor supresorskih gena tako rezultira smanjenom vjerojatnošću apoptoze i posljedičnim tumorskim rastom.

Što je s nasljednim tumorima?

Karcinomi uglavnom nastaju sporadično, ali se izvjestan broj javlja i u nasljednom obliku. U potonjem slučaju ne nasljeđuje se karcinom nego sklonost za razvoj specifičnog karcinoma. Upravo je detaljno praćenje obiteljskog rodoslovlja i povijesti pojave

određenih bolesti u obitelji prepoznalo osobe sa sklonošću za razvoj karcinoma. Razina rizika osobe za razvoj karcinoma ovisi o brojnim čimbenicima koji uključuju broj osoba (u obitelji) pogođenih karcinomom, kao i blizinu srodstva s osobom čiji rizik za nastanak karcinoma ispitujemo. Važna je također dob pogođenih osoba u trenutku pojave karcinoma.

Nasljedne karcinome prepoznavamo po slijedećim osobinama: mendelijski tip nasljeđivanja, rana životna dob osobe u kojoj se javlja (često 15-20 godina ranije nego sporadični oblik karcinoma), veći broj primarnih karcinoma, specifična kombinacija različitih primarnih tumora, te povremena fizička obilježja koja prethode razvoju karcinoma, kao što su brojni adenomatozni polipi u obiteljskoj adenomatoznoj polipozi ili znakovi na koži zamjetni u više od 50 nasljednih dermatoza vezanih uz karcinome.

U patogenezu nasljednih karcinoma uključeni su tumor supresorski geni. Ponovimo: tumor supresorski geni djeluju na recesivan način - za obranu od nastanka karcinoma dovoljna je ekspresija jednog normalnog alela antionkogen. Nasuprot tome, onkogeni mogu uzrokovati nastanak karcinoma u heterozigotnom stanju, te možemo reći da djeluju kao dominantni geni. Razvoj karcinoma, međutim, zahtijeva stalnu prisutnost onkoproteina.

Za razliku od klasičnih genetičkih bolesti kao što su cistična fibroza i mišićna distrofija, kod kojih genetičke promjene izravno dovode do razvitka bolesti, nastanak nasljednog karcinoma znatno je složeniji. Osobe koje su naslijedile mutaciju tumor supresorskog gena rizična su skupina za razvitak bolesti, ali je nužno ne moraju razviti. Za razvitak tumora potrebne su dodatne mutacije, učestalost kojih je vezana uz čimbenike iz okoliša. Epidemiološka istraživanja pokazuju da na pojavu karcinoma debelog crijeva utječe npr. prehrana. Tri su moguće kombinacije alela specifičnog tumor supresorskog gena koje mogu dovesti do nastanka recesivnog karcinoma: normalni (+/+), heterozigotni (+/-) i abnormalni homozigotni (-/-). Kod prvog genotipa (+/+) karcinom može nastati samo kada su oba alela somatskih stanica mutirana; kod drugog genotipa (+/-) dovoljna je mutacija samo jednog alela jer zametne stanice nose nasljeđeni mutirani alel, a treći slučaj (-/-) u praksi ne postoji, jer ovakva kombinacija alela onemogućava razvoj embrija. Iz ovoga zaključujemo da specifičan karcinom može nastati u ljudi normalnog genotipa uslijed dvije somatske mutacije kao i kod heterozigota za koje se kaže da su dominantno naslijedili sklonost za razvoj specifičnog karcinoma. Nasljedni karcinomi snažno podupiru Knudsonovu hipotezu drugog pogotka, koja kaže da za nastanak tumora nije dovoljna mutacija samo u jednom genu, nega da su potrebne promjene barem još jednog (a možda i više) gena.

Ulogu gena *APC* u nastanku tumora debelog crijeva objašnjava se teorijom da samo jedan gen, *APC*, djeluje kao čuvar (engl. *gatekeeper*) proliferacije stanica epitela debelog crijeva. U zdravim stanicama *gatekeeper* geni odgovorni su za održavanje stalnog broja stanica u obnavljajućoj populaciji stanica. Mutacije u tom genu vode do trajne neravnoteže između diobe i smrti stanica. Isto tako, dokle god *gatekeeper* funkcionira normalno, mutacije drugih staničnih gena ne mogu uzrokovati znatnije poremećaje rasta stanica. Ove hipoteze imaju potporu u rezultatima današnjih istraživanja, tako da možemo reći da razvoj neoplazija nije uzrokovan jednostavnim akumuliranjem mutacija, nego da ga određuje redoslijed njihove pojave. S obzirom na to da je

ekspresija gena *APC* u tkivima čovjeka ubikvitarna, vjerojatno je da samo u epitelu debelog crijeva igra ulogu *gatekeepera*, dok u drugim tipovima stanica ovu ulogu preuzimaju drugi geni. Drugi potencijalni *gatekeeperi* su gen *NF1* u Schwannovim stanicama, gen *RB* u stanicama epitela mrežnice, te gen *VHL* u stanicama bubrega.

Čemu služe informacije o tumor supresorima?

Brojna su istraživanja pokazala da opetovane delecije alela u tumorskom tkivu pokazuju na inaktivaciju tumor supresorskih gena. U velikom broju karcinoma možemo otkriti gubitak heterozigotnosti, tzv. LOH (od engl. *loss of heterozygosity*). Gubitak heterozigotnosti označava gubitak jednog od alela tumor supresorskog gena u usporedbi s alelima iz zdravog tkiva (krvi iste osobe). LOH se može otkriti pomoću polimorfnih biljega specifičnih za pojedini alel gena.

Takve spoznaje o nasljednim osnovama pojedinih karcinoma dragocjene su i izravno koriste bolesnicima. Prepoznavanje osoba sa povišenim rizikom za nastanak karcinoma važno je zbog mogućeg sprečavanja nastanka bolesti ili njenog ranog otkrivanja. Prepoznavanje se provodi otkrivanjem fenotipske izraženosti genotipa, ali, također, i dijagnostičkim testovima koji otkrivaju genotip, tj. prisustvo ili odsustvo promjene određenog gena, tzv. presimptomatičko utvrđivanje bolesti. Načini sprečavanja razvoja karcinoma kod osoba kod kojih su genetički testovi utvrdili prisustvo genetičke promjene uključuju promjenu načina života, profilaktički operativni zahvat i druge oblike liječenja. Praćenje i operativni zahvat omogućuju da većina osoba dostigne zrelu životnu dob. Osim toga, članovi obitelji čiji su rezultati genetičkog testa negativni pošteđeni su opetovanih medicinskih (npr. kod kolorektalnog karcinoma, endoskopskih) pregleda koji bi bili obvezatni u slučaju da ovakve testove nemamo.

Genetičko dijagnosticiranje bolesti FAP postalo je moguće nakon otkrivanja gena *APC*. Tad je metodama tzv. pozicijskog kloniranja i sekvencioniranja razvijena nova serija polimorfnih unutargenskih biljega. Testiranje upotrebom novih biljega povećalo je točnost dijagnoze na 99%.

Danas se prisustvo mutacija praktično utvrđuje metodama: polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP, od engl. *single stranded conformational polymorphism*), denaturirajućom gel elektroforezom ili analizom heterodupleksa. Naposljetku radi se i sekvencioniranje cijelog gena u potrazi za specifičnim tipom mutacije. Novije metode, međutim, temelje se na dijagnostici putem otkrivanja mutiranog proteinskog produkta. U budućnosti bi dijagnostika karcinoma debelog crijeva i kontrola nastanka karcinoma trebale uključiti molekularnu medicinu, epidemiološke studije i presimptomatsko dijagnosticiranje.

Spoznaje o genu *APC* i staničnoj funkciji njegovog proteinskog produkta nadopunjuju se svakoga dana. Istraživanja prelaze u sferu genskog liječenja otvarajući mogućnost unosa ispravnih gena *APC* u tkiva čovjeka radi sprečavanja i liječenja bolesti.

LITERATURA

1. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10914-21
2. Klein G. Genes that can antagonize tumor development. *FASEB J* 1993;7:821-5
3. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64:313-26
4. Szekely L, Jiang W Q, Bulić-Jakuš F, Rosen A, Ringertz N, Klein G, Wiman K G. Cell type and differentiation dependent heterogeneity in retinoblastoma protein expression in SCID mouse fetuses. *Cell Growth Differ* 1992;3: 149-56
5. Hoppe-Seyler F, Butz K. Tumor suppressor genes in molecular medicine. *Clin Investig* 1994;72: 619-30
6. Lynch HT, Fusaro R.M, Lynch J. Hereditary cancer in adults. *Cancer Detect. Prev* 1995;19:219-33
7. Su L, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-7
8. Nakamura Y. Cleaning up on β -catenin. *Nature Med* 1997;3:499-500
9. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 2003; 3:17 [dostupan online s URL <http://www.cancer.com/content/3/1/17>]
10. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235-46

Tablica 1. Neke osobitosti gena uključenih u karcinogenezu.

PROTOONKOGENI	TUMOR SUPRESORSKI GENI
1. Uključeni u stanični rast i diferencijaciju	1. Postoji mogućnost da su uključeni u stanični rast i diferencijaciju (negativni regulatori staničnog rasta)
2. Postoje genske obitelji	2. Postoje genske obitelji
3. U karcinomima su kvalitativno ili kvantitativno promijenjeni	3. U karcinomima su inaktivirani, izgubljeni i (ili) mutirani
4. Malo dokaza o njihovoj uključenosti u nastanak nasljednog karcinoma	4. Očiti dokazi za uključenost u nastanak nasljednog i nenasljednog karcinoma

Tablica 2. Neki od tumor supresorskih gena, kromosomski smještaj, bolesti u koje su uključeni.

GEN	SINDROM	KROMOSOM	FUNKCIJA GENSKOG PRODUKTA	ZLOĆUDNI TUMORI
RB 1	Obiteljski retinoblastom	13q14	jezgrin regulator drugih gena - veže TF E2F1	retinoblastom, osteosarkom, karcinom malih stanica pluća
WT 1	Wilmsov tumor	11p13	čimbenik transkripcije - pripadnik obitelji proteina cinkovih prstiju	Nefroblastom, Frasierov sindrom
TP 53	Li-Fraumeni	17p13	čimbenik transkripcije - veže se na DNA kao homotetramer	mnoge vrste tumora - mutiran u 60% karcinoma
NF 1	Neurofibromatoza tipa 1	17q11	citoplazmatski protein koji aktivira GTP-azu	neurofibrosarkom, gliom
NF 2	Neurofibromatoza tipa 2	22q 12	veže integrine za citoskelet	Schwannom, meningeom
VHL	von Hippel-Lindau	3p26-p25	prijenos signala	bubreg* -
APC	FAP	5q 21	veže katenine - wnt signalizacija	debelo crijevo*, jednjak*, želudac*
DCC	-	18q 21	molekula stanične adhezije	debelo crijevo*, želudac*
MSH 2	Lynch I	2p (?)	vjernost replikacije/ mismatch popravak	debelo crijevo*
LCF 2	Lynch II	18q (?)	-	debelo crijevo*, endometrij*, mokraćni trakt*, želudac*, tanko crijevo*
MEN 2a (Ret)	Multipla endokrina neoplazija tipa 2	10 q	receptor za tirozin kinazu	medularni štitnjače*, feokromocitom
MEN 1	Multipla endokrina neoplazija tipa 1	11q 13	jezgrin protein menin, nepoznate funkcije	adenomi hipofize, nuzžitnih žlijezda, gušterače*
BRCA 1	Obiteljski karcinom dojke i dojke/jajnika	17q 21	protein koji veže DNA	tumor dojke, jajnika
BRCA 2	Obiteljski karcinom dojke i dojke/jajnika	13q12	sudionik puteva popravka DNA i homologne rekombinacije	tumor dojke, jajnika
CMM 1	Sindrom displastičnih nevusa	1p36	katepsin C - popravak DNA i homologna rekombinacija	melanom
CDKN2A	Obiteljski melanom	9p21	o ciklinima ovisna kinaza - inhibira interakciju ciklina D sa CDK4 i CDK6	melanom

*karcinom