

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A KI-67, FLT3 ÉS JAK2 GÉNEK MUTÁCIÓINAK VIZSGÁLATA TUMOROS
SEJTVONALAKBAN ÉS COLORECTALIS CARCINOMÁS BETEGEK MINTÁIBAN**

Dr. Bubán Tamás

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2012

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A Ki-67, FLT3 és JAK2 gének mutációinak vizsgálata tumoros sejtvonalakban és colorectalis carcinomás betegek mintáiban

Dr. Bubán Tamás

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

A doktori tézis betétlapja

**A KI-67, FLT3 ÉS JAK2 GÉNEK MUTÁCIÓINAK VIZSGÁLATA TUMOROS
SEJTVONALAKBAN ÉS COLORECTALIS CARCINOMÁS BETEGEK
MINTÁIBAN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Bubán Tamás

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság tagjai:

elnök: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora.
Prof. Dr. Újszászy László, az MTA doktora.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. november 30.

Az értekezés bírálói:

Dr. Vincze Áron, Ph.D.
Dr. Méhes Gábor, Ph.D.

A bírálóbizottság tagjai:

elnök: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
tagok: Dr. Vincze Áron, Ph.D.
Dr. Méhes Gábor, Ph.D.
Prof. Dr. Újszászy László, az MTA doktora
Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:
2012. november 30. 13:00, Debreceni Egyetem OEC Urológiai Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A colorectalis daganatok legfontosabb klinikai és patológiai jellemzői

A vastagbélrák (colorectalis carcinoma, CRC) világszerte a harmadik leggyakoribb daganatfajta nőkben, és a negyedik a férfiakban, ezzel összhangban a fejlett országok többségében a második leggyakoribb daganatos halálozási okként szerepel. A fejlett országokban a legnagyobb a CRC incidenciája, a fejlődő országokban a legalacsonyabb, a különbség mintegy tízszeres. Az egyik legfőbb rizikótényező a kor, az incidencia 40-50 éves kor között meredeken emelkedni kezd. Az átlagos kockázatú populációban a CRC kialakulásának valószínűsége a teljes várható élettartamot figyelembe véve kb. 5%. Szövettanilag ezek a daganatok többnyire adenocarcinomák, a prognózist és a további kezelés menetét alapvetően a daganat stádiumbeosztása határozza meg. A CRC-t feloszthatjuk sporadikus, örökletes és familiáris csoportokra.

1.2 Sporadikus tumorok

A sporadikus CRC-ben – ez az esetek kb. 70%-a – a beteg családi kórtörténetében nem szerepel colon tumor. A daganat általában 50 éves kor felett alakul ki. Kialakulásában diétás, környezeti tényezők mellett a szomatikus sejtekben bekövetkezett mutációk sora játszik szerepet. Ha a beteg anamnézisében 1 cm-nél nagyobb polypus eltávolítása szerepel, a relatív kockázat 3,5-6,5 közé emelkedik. Ha CRC miatt műtétre kerül sor, a betegek 1,5-3,0%-ában újabb primer (metakron) tumor alakulhat ki.

1.3 Familiáris CRC

A betegek kb. 25%-ának pozitív a családi anamnézise CRC-re nézve, de nem igazolható egyetlen örökletes szindróma sem. Ezekben a familiáris esetekben a CRC kockázata fokozottabb, de nem olyan magas, mint az örökletes kórképekben. A familiáris CRC öröklődése nagy valószínűséggel poligénes,

hátterében kevésbé ismert, kisebb hatású, örökletes genetikai eltérések kumulálódása állhat.

1.4 Örökletes CRC szindrómák

Az összes CRC-s beteg kevesebb, mint 10%-át érintő csoportban öröklött hajlamot találunk a betegség kialakulására, amiért specifikus csírasejt mutáció a felelős. Ezt a csoportot az alapján osztjuk két részre, hogy a betegség alapvetően polyposis formájában jelentkezik, vagy sem. A polyposissal járó kórképek közé soroljuk a familiáris adenomatous polyposis szindrómát (FAP és MUTYH-asszociált polyposis) és a hamartomatous polyposis szindrómákat (pl. Peutz-Jeghers szindróma), míg a polyposissal nem járó csoportba a Lynch, a familiáris CRC X szindrómát és egyéb ritka betegségeket. Ezek a kórképek kifejezetten magas kockázattal bírnak a CRC kialakulása szempontjából. Az öröklődő mutáció azonosítható és szűrésre is felhasználható.

1.4.1 Lynch szindróma

A polyposissal nem járó öröklődő colorectalis rákok közül a leggyakoribb a Lynch szindróma, az összes CRC kb. 1-4%-át teszi ki. A betegség a CRC és más (pl. endometrium, ovárium, gyomor, húgyúti) adenocarcinomák korai kialakulásával jellemezhető. A kórkép autoszóm domináns módon öröklődik. Kialakulásában a DNS-replikáció hibáit javító („mismatch repaire” - MMR) gének (leggyakrabban a hMSH2 és hMLH1) eltéréseinek van szerepe. Mutációik révén a DNS-ben hibák halmozódnak fel, főleg az ún. microsatellitákban. Ha ez a proliferációt szabályzó génekben jelenik meg, tumor fejlődhet ki.

A HNPCC klinikai diagnózisát megkönnyítendő klinikai feltétel-rendszereket (Amsterdam és Bethesda kritériumok) hoztak létre. Az ezek alapján kiválasztott páciensek tumoros mintáiban az MMR fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatát (IHC) illetve microsatellita instabilitás vizsgálatot

(MSI) célszerű elvégezni. Amennyiben ezek alapján a Lynch szindróma gyanúja komolyan felmerül, az MMR gének szekvenálása illetve további kiegészítő vizsgálatok történnek (nagyobb deléciók vizsgálata MLPA-val, hypermetiláció vizsgálata, TACSTD1 gén 3' végének analízise).

1.4.2 Familiáris CRC X szindróma

Az évek során lezajlott nagy HNPCC-s tanulmányokból kiderült, hogy az Amsterdam kritériumoknak megfelelő családoknak csak kb. a felében fordult elő az MMR gének mutációja. A mutáció negatív esetekben a CRC kockázata csak mintegy kétszeres, szemben a csírasejt mutációval rendelkező családokkal, és az átlag életkor is magasabb volt a tumor felismerésekor (61 vs. 49 év). Továbbá a megnövekedett rizikó csak CRC-re igazolódott, más tumorokat illetően nem volt szignifikáns. Ezek miatt javasolták, hogy a HNPCC elnevezés helyett a Lynch szindróma elnevezést használják a mutációt hordozó családokra, míg a géndefektustól mentes betegségekre a familiáris CRC X szindróma terminust vezessék be.

1.5 A colorectalis daganatok kialakulásának patomechanizmusa

Mind a veleszületett, mind a szerzett CRC alapja a genetikai instabilitás, mely alapvetően három fő mechanizmusra vezethető vissza. A kromoszóma instabilitás az oka a sporadikus esetek kb. 85%-ának, amikor is számos számbeli és strukturális kromoszóma eltérés alakul ki és ez befolyásolja kulcsfontosságú gének működését. Ezen a „klasszikus” adenoma-carcinoma útvonalon leggyakrabban megváltozó gének: APC, K-ras, DCC, p53 és Src. Az MMR fehérjék (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) hiánya felelős a CRC kb. 5%-át kitevő Lynch szindróma és a sporadikus esetek 8-15%-ának a kialakulásáért. Végül a CRC-s esetek 10-20%-ában mutatható ki számos gén promóter régióját érintő hypermetiláció, ami ezen fehérjék (pl. APC, MLH1) szintézisének a csökkenését vagy hiányát eredményezhetik. Ez a „CpG-sziget metilátor fenotípus” szintén

társulhat microsatellita instabilitással, és leggyakrabban a sporadikus esetekben mutatható ki.

1.6 A patogenezis szempontjából esetlegesen jelentős további faktorok

A peroxiszóma proliferáció aktiválta receptor gén (PPAR) is részt vehet a carcinogenesis folyamatában. A PPAR gének olyan nukleáris receptorokat kódolnak, melyek a sejtszaporodásban és a lipidanyagcserében résztvevő fehérjéket szabályoznak. Számos adat támasztja alá a cyclooxygenase-inhibítorok védőhatását a CRC kialakulásában. Bár a mechanizmus nem tisztázott, a COX-2 szerepét feltételezik, amely túltermelődik a CRC sejtekben.

Kevésbé ismert a Ki-67 fehérje esetleges szerepe a tumorgenezis folyamatában, melyet, mint proliferációs markert évek óta használnak a hisztopatológiában. Feltételezhető, hogy genetikai módosulás révén hozzájárulhat a CRC kialakulásához. A JAK2 gén V617F mutációja konstans JAK2 aktivitást, állandó intracelluláris foszforilációt és sejtproliferációt eredményez, és hasonló az FLT3 gén belső tandem duplikációinak és a tirozin kináz domént érintő pontmutációknak is a hatása. Mindkét genetikai eltérés elsősorban malignus hematológiai betegségek kialakulásában játszik szerepet, sporadikus CRC-ben és tumoros sejtvonalakban nem voltak kimutathatók, de familiáris/örökletes CRC-ben még nem vizsgálták részletesen ezek jelentőségét.

1.6.1 A Ki-67 fehérje

A Ki-67 antitestet már évtizedek óta használják a proliferáló sejtek arányának (Ki-67 index) meghatározására. Az antitest egy humán nukleáris antigénhez (Ki-67 fehérje) kötődik, amely minden proliferáló sejtben jelen van (G1, S, G2, M fázisban), de hiányzik a nyugvó sejtekből (G0 fázisban). A Ki-67 biológiai funkciói rendkívül sokrétűek. Képes kötődni a DNS-hez és nem-hisztón fehérjékhez valamint DNS-helikázokkal is asszociál, így szerepet játszik a magasabb rendű kromatin struktúra kialakulásának és lebomlásának

szabályozásában. Több ponton is befolyásolja a sejtosztódást. Elősegíti a sejtek S-fázisba lépését és az ezzel összefüggő DNS-replikációt, a G2-M átmenetet és a mitózis beindulását, szerepe lehet a kettősszájú DNS töréseinek javításában és végül a Ki-67 riboszómális fehérjével való kölcsönhatása szerepet játszik a riboszómák működésének gyors helyreállításában a sejtosztódás után. Mindezek alapján a fehérje szerkezetében bekövetkező változások hatással lehetnek a sejtek osztódására és kontrollálatlan sejtproliferációt eredményezve szerepük lehet a tumoros transzformáció folyamatában.

1.6.2 A JAK2 gén V617F mutációja

A JAK2 egy a citoplazmában található protein tirozin-kináz, amely egyes citokinek szignalizációjában játszik fontos szerepet; a citokin receptorokhoz kötődve autofoszforylálódik, aktiválódik és az intracelluláris jelátviteli elemek foszforylációját végzi. A JAK/STAT szignalizációs útvonal jelentőségét a sejtosztódás és a sejttúlélés regulálása adja.

A JAK2 gén 14. exonjában a JH1 domént gátló JH2 pszeudokináz régióban kialakuló G1849T (V617F) mutáció a JH1 domén permanens aktiválódásához vezet. Ez a konstans JAK2 aktivitás állandó intracelluláris foszforylációt és sejtproliferációt eredményez, ami a malignus hematológiai betegségek kialakulásában játszik szerepet. Polycythaemia verában (95%), essentialis thrombocythaemiában (50%) és idiopátiás myelofibrosisban (50%) fordul elő leggyakrabban ez a géntérés. Sporadikus vastagbél daganat és vastagbél daganat eredetű sejtvonalak esetében nem sikerült igazolni a jelenlétét.

1.6.3 Az FLT3 gén belső tandem duplikációja (ITD) és tirozin-kináz domén (TKD) mutációja

Az fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) egy receptor tirozin-kináz. A ligandja egy transzmembrán protein, ami számos sejt és szövet felszínén expresszálódik. A ligand kötődése receptor dimer-képződéséhez és annak auto-

foszforilációjához vezet, ami a sejten belüli jelátviteli mechanizmusok aktiválása révén a sejtek proliferációját indukálja és apoptózisának gátlását eredményezi.

Az FLT3 mutációk egyik nagy csoportját a juxtamembrán domént kódoló 14. és 15. exonok belső tandem duplikációi (internal tandem duplication - ITD) képezik. Az ITD hossza 3 és 400 bázispár között, míg a pluszban beépült nukleotidok száma 3 és 36 bázispár között változik. Mivel a leolvasás kereten belül marad, a képződő fehérje megőrzi kináz-funkcióját, csak éppen a tandem duplikáció méretétől függően hosszabb JM doménnel rendelkezik. A mutációk másik nagy csoportja a tirozin-kináz domén (TKD) aktivációs hurkát érinti. Az esetek 85-90%-ban aminosav cserét eredményező (missense) mutáció fordul elő a 835. codonban. Ezen mutációk tehát a tirozin-kináz spontán és állandó aktivációját, végső soron a sejtek proliferációját és megnövekedett túlélését idézik elő. Az FLT3 genetikai eltérései AML-ben mutatható ki viszonylag nagyobb gyakorisággal, CRC-ben ezek jelenlétét még nem vizsgálták.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során alapvető célunk az, hogy örökletes és sporadikus CRC-ben szenvedő betegek daganataiban új genetikai eltéréseket azonosítsunk. Olyan fehérjék vizsgálatára helyezzük a hangsúlyt, melyek vagy a sejtosztódás szabályozásában töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, vagy mutációik révén sejtproliferációt indukálnak. Így esett a választás a Ki-67 fehérje valamint a JAK2 és az FLT3 tirozinkinázok génjeire. Míg a Ki-67 számos ponton befolyásolja a sejtosztódást normál sejtekben is, addig a JAK2 és az FLT3 genetikai eltérései különböző myeloid malignómákban fordulnak elő nagyobb gyakorisággal. A JAK2 kivételével egyik gén mutációit sem tesztelték még sporadikus CRC-ben, míg egyik gén sem volt még vizsgálat tárgya örökletes vastagbél daganatokban.

Vizsgálatainkkal a következő kérdésekre keressük a választ:

- Kimutathatók-e a Ki-67 gén mutációi különböző tumoros sejtvonalakban illetve vastagbél-daganatokból izolált DNS mintákban?
- Az FLT3-ITD mutáció kimutatására leggyakrabban alkalmazott három különböző elektroforetikus módszer (agaróz és poliakrilamid gélelektroforézis valamint kapilláris elektroforézis) milyen analitikai paraméterekkel rendelkezik, és mennyire alkalmazható a rutin laboratóriumi diagnosztikában?
- Kimutathatók-e a JAK2 V617F, FLT3-ITD és -TKD mutációk vastagbél-daganatokból izolált DNS mintákban?

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A vizsgálatban résztvevő betegek jellemzői

A Ki-67, FLT3 és JAK2 mutációk vizsgálatához 26 sporadikus CRC-ben szenvedő beteg (14 férfi, 12 nő; életkor: $65,4 \pm 12,5$ év) műtéti preparátumából származó mintát használtunk fel. Az FLT3- és JAK2 mutációk vizsgálatát 38 Amsterdam- vagy a módosított Bethesda-kritériumokra pozitív beteg esetében is elvégeztük. Ezeknél a betegeknél MSI vizsgálat és 3 hibajavító fehérje (MLH1, MSH2, MSH6) IHC vizsgálata történt meg. Amennyiben egy mintában magas MSI és/vagy egy MMR fehérje kiesését észleltük, az MLH1 és MSH2 gének szekvencia analízisét is elvégeztük. Genetikai eltérést 6 beteg esetében tudtunk kimutatni (Lynch szindróma; 4 férfi, 2 nő; életkor: $47,3 \pm 10,7$ év) és ezek az esetek korábbi publikációkban már bemutatásra kerültek. A fennmaradó 32 beteget (15 férfi, 17 nő; életkor: $56,3 \pm 13,4$ év) a familiáris CRC X-típusba soroltuk. Mind a HNPCC-s, mind a sporadikus CRC-s betegeket a DEOEC Sebészeti Intézetében dolgozó Dr. Tanyi Miklós gondozta. A minták előkészítését és az IHC vizsgálatokat a DEOEC Patológiai Intézetében Dr. Tóth László végezte el. Az MSI vizsgálatok a DEOEC Laboratóriumi Medicina Intézetében történtek, míg az MLH1/MSH2 gének mutáció analízisét az Országos Onkológiai Intézetben Dr. Olasz Judit végezte.

Az FLT3 és a JAK2 gének mutációinak vizsgálatánál kontrollként 107 felnőtt akut myeloid leukémiás (AML; 47 férfi és 60 nő; életkor: $50,8 \pm 17,1$ év) és 99 polycythemia verás (PV; 55 férfi, 44 nő; életkor: $61,4 \pm 14,1$ év) beteg mintáját használtuk fel. Ezeket a betegeket a DEOEC II. sz. Belgyógyászati Klinikáján dolgozó Dr. Batár Péter és Prof. Dr. Udvardy Miklós illetve a Nyíregyházi Jósa András Kórház Hematológiai Osztályán dolgozó Dr. Szerafin László gondozta.

3.2 Az alkalmazott sejtvonalak

A daganatos sejtvonalakban végzett Ki-67 génmutáció kereséshez négy sejtvonalat használtunk fel. Egy cervixcarcinoma (HeLa), egy tüdőcarcinoma (A549) és két coloncarcinoma (CXF94, SW480) tumoros sejtvonalat vizsgáltunk, melyek az American Type Culture Collection-től származtak. A sejteket DMEM+10%FBS tápoldatban (Gibco-BRL) tenyésztettük standard feltételek mellett.

3.3 RNS, DNS izolálás

A tumoros sejtvonalakkal kapcsolatos munkánk során 5×10^6 sejtől TRIzol™ Reagents (Gibco BRL) segítségével történt az RNS kivonása. A sporadikus és örökletes CRC-s betegek esetében a Ki-67, FLT3 és JAK2 mutációk vizsgálatához formalinnal fixált, paraffinos metszetekből történt a DNS izolálás. Az 1-2 μm vastagságú (2-3 db) paraffinos metszetet melegítéssel és xylollal deparaffináltuk, majd leszálló alkohol sorral rehidráltuk. Ezután 20 μl Proteináz K-val emésztettük a preparátumokat (56°C, 16-18 óra) majd a „QIAmp DNA Blood mini kit” izoláló kit Tissue protokollját (Qiagen) alkalmaztuk. Az AML-es és PV-s betegek esetében az FLT3 gén mutációinak vizsgálatához teljes vérből, míg a JAK2 gén mutációjának vizsgálatakor Ficolllos szeparálást követően a granulocita rétegből végeztük el a DNS izolálást a „QIAmp DNA Blood mini kit” izoláló kit (Qiagen) segítségével. A DNS és RNS minták koncentrációját és tisztaságát fotométerrel (GeneQuant vagy NanoDrop) határoztuk meg.

3.4 A Ki-67 gén cDNS-ének szekvenálása klónozással

A sejtvonalakból kivont RNS-t (5 μg) a Murine Reverse Transcriptase enzim (Ready-To-Go®, Amersham-Pharmacia) és 100 pmol pd(T)₁₂₋₁₈ (Amersham-Pharmacia) felhasználásával írtuk át cDNS-sé. A Ki-67 gén kódoló

szakaszait 4 PCR segítségével amplifikáltuk. Az amplifikációhoz felhasznált primerek szekvenciája, a PCR mixek összetétele és a PCR-ek kondíciói – valamennyi későbbi PCR esetében is – a disszertációban található meg részletesen. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk szét, és vagy a gélből kimetszve tisztítottuk a Prep-A-Bene[®] DNA Purification System (BioRad Laboratories) segítségével, vagy közvetlenül a PCR csövekből vettük a mintát és az E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit-et használtuk (PEQLAB Biotechnologie GmbH). A tisztított PCR termékeket pCR[®] II-Blunt-TOPO[®] vectorba (Invitrogen Corp.) építettük be, majd TOP 10 One Shot[®] kompetens *E. Coli* baktériumokban sokszoroztuk fel. A Kanamycin tartalmú agar táptalajon szelektált klónokat, a „QIAGEN Plasmid Maxi Kit” segítségével izoláltuk. Minden sejtvonal esetében három klónt vizsgáltunk, legalább kétszer. A plasmid DNS szekvenálása a Thermosequenase Kit (Amersham Pharmacia) és M13 szekvenáló primerek segítségével történt Model 4200 (LI-COR Inc.) készüléken. A kapott szekvenciát a Ki-67 cDNS-t leíró eredeti publikációban közölt illetve az Ensembl génbankban található Ki-67 cDNS referencia szekvenciával vetettük össze.

3.5 A Ki-67 c.1300delC mutáció vizsgálata primer CRC mintákban szekvenálással

A Ki-67 gén 7. exonjának megfelelő szakaszát 1 PCR segítségével amplifikáltuk. A PCR termék (437 bp) tisztítására Microcon ultrafiltrációs oszlopot (Amicon[®] Ultra – 0,5 ml, 30K; Millipore) használtunk. A szekvenáló PCR-hez a BigDye 3.1-es szekvenáló kittet (Applied Biosystems), a szekvenáló PCR termékének tisztításhoz pedig a Qiagen DyEx Spin Kit-et alkalmaztuk. A megtisztított termékeket beszárítottuk, majd 15 µl formamidot mértünk rájuk és szekvenálásig ebben a formában -20°C-on tároltuk azokat. A formamidban lévő mintákat közvetlenül szekvenálás előtt denaturáltuk. A szekvenálás ABI Prism 310 Genetic Analyzer készülékkel történt.

3.6 A FLT3-TKD mutáció kimutatása PCR+RFLP-vel

Az FLT3 gén 20. exonjának megfelelő szakaszát 1 PCR segítségével amplifikáltuk. A vad típusú allél jelenléte esetén a 114 bp nagyságú PCR termék az emésztés során 68 és 46 bp nagyságú termékekre hasad. Az enzim hasítási helye elvész mutáció jelenléte esetén, így ekkor egy 114 bp nagyságú PCR termék is megjelenik a hasított termékek mellett.

3.7 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása PCR és agaróz- illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével

Az FLT3 gén 14.-15. exonjának megfelelő szakaszát 1 PCR segítségével amplifikáltuk. A PCR terméket agaróz (3%) illetve poliakrilamid (6%) gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű sáv is látható az elektroforetogrammon.

3.8 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása fragmentanalízissel és szekvenálással

Az FLT3 gén 14.-15. exonjának megfelelő szakaszát 1 PCR segítségével amplifikáltuk fluoreszcensen jelölt primerpárt alkalmazva. A PCR terméket formamidba vettük fel, denaturáltuk majd analízisig -20°C-on tároltuk. A denaturált mixek analízise az ABI310 kapilláris elektroforézis készülékkel történt. A mérést/adatgyűjtést a GeneScan, az analízist a GeneScan illetve a PeakScanner szoftverek (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű csúcs is látható az elektroforetogrammon. Az FLT3-ITD pozitív minták közül 10 esetében direkt szekvenálást is végeztünk.

3.9 A JAK2 gén V617F mutációjának kimutatása PCR+RFLP-vel

Az JAK2 gén 14. exonjának megfelelő szakaszát 1 PCR segítségével amplifikáltuk. Az emésztetlen és emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 174 bp-os és egy 160 bp-os termék, a mutáns allél esetében pedig egy 364 bp-os termék látható.

3.10 Microsatellita instabilitás vizsgálata

Az MSI vizsgálat során 3 dinukleotid és 2 mononukleotid microsatellita stabilitását vizsgáltuk meg PCR és CE segítségével. Az 5 microsatellita körüli DNS szakaszokat 5 PCR segítségével amplifikáltuk. A poolozott PCR mixeket és a ROX festékkel jelzett méret standardot (ABI ROX 500, Applied Biosystems;) formamidban vettük fel, majd denaturáltuk. Az így előkészített mintákat ABI310 kapilláris elektroforézis készülék segítségével analizáltuk. Amennyiben az 5 microsatellitából 1 instabil alacsony MSI-ről, míg ha ≥ 2 instabil magas MSI-ről beszélünk.

3.11 Statisztikai analízis

A vizsgált paraméterek megoszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével vizsgáltuk. A kategorikus változók összehasonlítását a χ^2 -teszt segítségével, míg a folytonos változókét a Mann-Whitney U-teszt vagy a Student-féle t-teszt segítségével végeztük. A folytonos változók korrelációját Pearson teszt alkalmazásával értékeltük, a betegek túlélését pedig Kaplan-Meier analízis segítségével. Bármely különbséget szignifikánsnak tekintettünk, ha a $p < 0,05$. A statisztikai analízis a Statistica program segítségével történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Ki-67 mutációk kimutatása daganatos sejtvonalakban és CRC-s betegek mintáiban

Két colon tumor (CXF94, SW480), egy cervix carcinoma (HeLa) és egy tüdő tumor (A549) sejtvonal sejtjeiből izoláltunk RNS-t, majd az erről átírt cDNS-ben szekvenáltuk a Ki-67 gén exonjait 4 PCR segítségével. A vizsgálat során összesen nyolcféle genetikai eltérést találtunk. Az első a c.237T>A nukleotid csere a CXF94 sejtekben, ami nem okoz változást az aminosav sorrendben. A 311. és 712. pozícióban A>G illetve T>A cserét detektáltunk, ami aszparagin/szerin illetve triptofán/arginin aminosav cserét eredményezett a CXF94/SW480 és a HeLa/CXF94 sejtvonalakban. Az 1300. pozícióban egy 1 bázispáros deléció (c.1300delC) volt kimutatható az A549 és az SW480 sejtekben. Ez a változás kereteltolódást és STOP kodont eredményez a deléciót követő 12. kodonban, ami a fehérje hiányát okozza vagy trunkált fehérjéhez vezet. Az izoleucin/leucin csere (c.1891A>C) és az arginin/triptofán csere (c.2494C>T) a CXF94 illetve az A549 sejtvonalakban volt kimutatható. Végül a c.9289A>G és c.9737G>C csere valamennyi sejtvonalban detektálható volt. Miután valamennyi talált variáns a c.1300delC kivételével polimorfizmusnak bizonyult, ezért ezt az egy genetikai eltérést vizsgáltuk meg 26 sporadikus CRC-ben szenvedő beteg tumorából izolált DNS mintában. A c.1300delC eltérés nem volt detektálható a vizsgált CRC-s betegekben.

4.2 Az FLT3-ITD kimutatására alkalmas módszerek összehasonlítása

4.2.1 Az FLT3-ITD kimutatására használt módszerek alkalmazásának gyakorisága a nemzetközi irodalomban

Első lépésben azt akartuk kideríteni, hogy az FLT3-ITD kimutatására milyen módszerek használhatóak és milyen gyakorisággal alkalmazzák ezeket a nemzetközi irodalomban. Ezért a következő kifejezések kombinációjával

keresést végeztünk a PubMed adatbázisban: “FLT3” AND [“ITD” OR “LM” OR “internal tandem duplication” OR “length mutation”] AND “Language: English” AND “Publication year: 2010-2011”. Összesen 177 közlemény felelt meg a kritériumoknak. Első lépésben 15 összefoglaló („review”), valamint 27 alapkutatás tárgyú tanulmányt kihagytunk a feldolgozásból. A maradék 135 cikkből 122-t sikerült teljes terjedelmében megszerezni. Ezekben 99 esetben tudtuk beazonosítani az FLT3-ITD meghatározás módszerét.

Ami a módszerek megoszlását illeti, 29 közleményben (29,3%) használtak agaróz (AGE) és/vagy poliakrilamid (PAGE) gélelektroforézist az FLT3-ITD PCR-termékek kimutatására önmagában vagy 37 esetben (37,4%) DNS-szekvenálással kombinálva. A kapilláris elektroforézis (CE) aránya önmagában vagy DNS-szekvenálással használva 16 illetve 3 (16,2% illetve 3,0%) volt. További 14 (14,1%) publikációban ezek illetve ritkábban alkalmazott módszerek különböző kombinációi szerepeltek. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy az AGE és PAGE még mindig széleskörben használt módszerek az FLT3-ITD kimutatásában, ezért összehasonlításuk a kapilláris elektroforézissel és a 3 módszer analitikai tulajdonságának jellemzése érdekes vizsgálat lehet.

4.2.2 Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban 3 különböző elektroforetikus módszerrel

Összesen 73 AML-ben szenvedő felnőtt beteg 95 darab DNS mintájában vizsgáltuk meg három különböző elektroforetikus módszerrel az FLT3-ITD kimutathatóságát. 18 beteg esetében kettő, 2 beteg esetében három független mintát dolgoztunk fel. Legalább egy mutáns allél jelenlétét tudtuk kimutatni 18 beteg 20 mintájában, függetlenül a használt módszertől.

A kapilláris elektroforézis alapján meghatározott ITD méret 9-178 bázispár között mozgott (medián 40 bp), a mutáns/vad allél aránya 0,006 és 3,714 között változott (medián 0,144), míg a mutáns/összes allél aránya 0,48 és 77,8% között (medián 12,5%.) volt. A 18 ITD-pozitív betegből kilencben egynél

több mutáns allél volt kimutatható (többszörös ITD). Habár mindhárom módszer képes volt azonosítani az FLT3-ITD pozitív mintákat, különbség volt köztük a mutáns allélek számát, méretét és intenzitását illetően, következésképpen további munkánk során a három elektroforetikus módszer analitikai tulajdonságait vizsgáltuk meg.

4.2.3 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: reprodukálhatóság

Két ITD-pozitív mintát (B35 és B80) használtunk a vizsgálathoz. A kapilláris elektroforézis során a B35 minta egy nagy és egy alig látható kisebb mutáns csúcsot mutatott 387 és 339 bp-nál. A B80 mintánál egy nagy mutáns csúcsot láttunk 355 bp-nál és egy nagyon kis intenzitású másikat 398 bp-nál.

A vad-típusú és mutáns allélról felszaporodott PCR termék méretét illetően nagyon jó intra- és inter-assay reprodukálhatóságot észleltünk (a CV% 0,2% alatt volt). Az ITD nagyságát a mutáns és vad allél méretének a különbsége adta meg. Az intra- és inter-assay CV% 1, ill. 2% alatti volt, ha az ITD mérete nagyobb volt (24 bp felett; B35 minta – ITD2, B80 minta – ITD1 és ITD2). A B35 minta ITD1 esetében kisebb, 9 bázispárnyi inzerciót észleltünk, relatíve nagyobb intra- és inter-assay CV%-kal (7 és 11%).

A mutáns/vad-típus illetve mutáns/összes allél hányados meghatározásánál változó reprodukálhatósági eredményeket kaptunk. A B35 minta ITD2 és a B80 minta ITD1 esetében a mutáns/összes allél hányados 65% és 12%, az intra- és interassay CV%, pedig 5% alatt volt. A reprodukálhatóság rosszabb volt, amikor a mutáns/összes allél arány 1,2-1,5% körül mozgott (B80 minta ITD2), ekkor az intra-assay CV% 10-14%, míg az inter-assay CV% 25% volt. 1% alatti mutáns/összes allél hányadosnál (B35 minta ITD1) a reprodukálhatóság már nem volt elfogadható; a CV% 50% feletti volt.

Ugyanezeket a vizsgálatokat elvégeztük AGE és PAGE esetében is. A nagyobb mutáns allélról amplifikálódó PCR termék jól látható volt, hasonló

helyen és hasonló intenzitással minden nap és minden futtatásnál, míg a kisebb mutáns sáv hiányzott.

4.2.4 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: érzékenység

Következő lépésként a három különböző elektroforetikus módszer detektálási limitjét hasonlítottuk össze. A B35 és B80 minta DNS-éből egy ITD-negatív minta DNS-ével sorozathígítást készítettünk. A mutáns/összes allél arányt az eredeti mintában CE és PeakScanner analízis segítségével határoztuk meg, a hígított DNS mintákban pedig a kezdeti érték és a hígítási faktor alapján számoltuk ki. A DNS mixet jelöletlen primerekkel amplifikáltuk az FLT3-PCR során, majd 10 µl PCR terméket vittünk fel agaróz vagy poliakrilamid gélre. A domináns mutáns allél kimutatható volt 1-2%-os hígításnál mindkét módszer segítségével, de a minor mutáns allél ezekkel a módszerekkel nem volt detektálható.

A hígított DNS-eket fluoreszcensen jelzett forward és jelöletlen reverse primerrel is amplifikáltuk, amit a PCR termék denaturációja majd CE követett. A mutáns/vad típus, illetve mutáns/összes allél hányadost PeakScanner analízissel állapítottuk meg. A dilúciós görbe lineáris részét határoló legalsó pont megállapításához egy változó cutoff értéket (0.1-0.5%) teszteltünk a kalkulált mutáns/összes allél arány, illetve 0.001-0.005 értéket a kalkulált mutáns/vad típusú allél arány esetében, és egy lineáris regressziós vonalat húztunk az aktuális cutoff feletti pontokon keresztül. A két vizsgált hányados esetében a 0,2% és 0,002 cutoffhoz tartozott a legjobb regressziós koefficiens ($R=0,989$ és $R=0,990$). Az assay analitikai érzékenységét a legalacsonyabb kalkulált mutáns allél hányadossal rendelkező 10 adatpontot figyelembe véve állapítottuk meg. Ezeknek az értékeknek az átlag+3SD-je 0,28% és 0,0028 volt, amely meghatározza a mért mutáns/összes és mutáns/vad típusú allél hányados detektálási limitjét.

4.2.5 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: felbontás

A B114 mintában a vad és mutáns allél PCR termékének 9 bázispárnyi különbségét mindegyik módszer kimutatta. Ellenben a B147 minta esetében a 370 és 373 bp mutáns allélek ugyan jól detektálhatóak kapilláris elektroforézissel, de ez a három bázispárnyi különbség agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézissel már nem volt feloldható.

4.2.6 Az FLT3-ITD pozitív mintákban AGE és PAGE segítségével detektált multiplex sávok analízise

A 20 FLT3-ITD pozitívnak talált DNS minta egy részében 2, 3, sőt 4 nagyméretű mutáns sávot mutattunk ki a PAGE illetve az AGE segítségével, melyek többsége nem volt látható a CE esetében. Ezeket vizsgáltuk meg részletesebben a B55 beteg mintájában. A vad típusú (1. sáv = 331 bp), az 1. mutáns (2. sáv = kb. 350 bp) és a 2. mutáns sávot (3. sáv = kb. 550 bp) polyakrilamid gélből vágtuk ki, majd bidirekcionális szevenálással meghatároztuk ezek bázissorrendjét. Ez alapján egy 21 bázispárnyi duplikáció igazolódott a 14. intron/15. exon területén (c.1773_1793 dup21) az 1. mutáns sávban. A 2. mutáns sávban a két szekvencia keveréke a sáv ismételt excíziója és amplifikációja után is megfigyelhető volt. A két sávból izolált DNS együttes amplifikációjával illetve denaturáció/renaturációs kísérletekkel sikerült igazolni, hogy a 2. mutáns sáv a vad típusú és az 1. mutáns sáv heteroduplexe.

4.2.7 A CE-vel illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása

Korábbi publikációkból jól ismert, hogy az ITD minden esetben „in-frame” genetikai elváltozást okoz. Ez egyben azt is jelenti, hogy az ITD-t tartalmazó nukleotidok száma mindig osztható hárommal. Meglepő módon a CE segítségével kapott ITD méret adatokra ez nem volt maradéktalanul igaz. Éppen

ezért 10 esetben direkt szevenálással is meghatároztuk az ITD nagyságát. A két módszer közötti korreláció erős ($R=0,999$), de a duplikátum/inzertum mérete DNS szevenálással 7%-kal nagyobbak bizonyult, mint CE-vel.

4.3 Az FLT3-ITD és -TKD mutációk előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban

Az FLT3 mutációk jelenlétét 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-ben szenvedő beteg mintájában vizsgáltuk meg. A 38 örökletes esetből 6 beteg Lynch szindrómás, míg 32 egyén a familiáris CRC X típus-ba tartozott. Az örökletes és sporadikus tumoros betegek klinikai jellemzőit összehasonlítva az átlagéletkor szignifikánsan alacsonyabb, míg az átlagos túlélés (OS) szignifikánsan hosszabb volt a Lynch szindrómás csoportban a sporadikusok csoportjához hasonlítva. A familiáris CRC X szindrómás betegek csoportjában a bal colonfél érintettsége, szignifikánsan alacsonyabb átlag életkor és hosszabb túlélési idő volt jellemző összehasonlítva a sporadikus tumoros betegek adataival. Ami a vizsgált FLT3-ITD és TKD mutációkat illeti, azokat sem a sporadikus, sem az örökletes colon tumoros betegek csoportjában nem tudtuk kimutatni. A kontrollként szolgáló 107 AML-es betegben az FLT3-ITD aránya 25,2% (27/107), míg az FLT3-TKD gyakorisága 5,6% (6/107) volt.

4.4 A JAK2 V617F mutáció előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban

A 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-s minta esetében megvizsgáltuk a JAK2 gén V617F mutációjának jelenlétét is egy PCR+RFLP módszer segítségével. Sem az örökletes, sem a sporadikus colon tumorban szenvedő betegek csoportjában nem volt kimutatható a JAK2 V617F mutáció. Kontrollként 99 PV-s betegek mintáját analizáltuk. A V617F mutáció gyakorisága 86,9% (86/99) volt.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 A Ki-67 potenciális szerepe a colorectalis daganatok kialakulásában

Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy többféle, a Ki-67 gént érintő eltérés azonosítható különböző tumoros sejtek cDNS-ében. A c.1300delC hatása tűnik a legnyilvánvalóbbnak, mivel ez STOP szignált eredményez a 446. kodonban, csokolt fehérje képződéshez vezetve. A többi eltérés a normál populációban is viszonylag nagy gyakorisággal előforduló aminosav cserével járó genetikai polimorfizmus. Pusztán a megváltozott aminosavak kémiai sajátosságaira alapozva az izoleucin/leucin és aszpartát/aszparagin csere tűnik a legkevésbé hangsúlyosnak, míg a triptofán/arginin csere a legjelentősebbnek, az oldalláncuk méretében és töltésében lévő különbségnek köszönhetően. További két eltérés potenciális foszforilációs helyet érinthet. Mindezek alapján a kimutatott polimorfizmusok hatással lehetnek a fehérje működésére, de nagyobb tumoros populáció vizsgálata szükséges annak megítélésére, hogy van-e szerepe ezeknek a CRC kialakulásában. Miután a legeggyértelműbb hatása a c.1300delC eltérésnek lehet, ezt vizsgáltuk meg sporadikus CRC-s esetek tumormintáiban, de az eltérés nem volt kimutatható.

Érdekes módon, amilyen nagyszámú publikáció alkalmazza a Ki-67 expressziót a proliferáló sejtek arányának meghatározására, annyira kevés vizsgálat foglalkozik a Ki-67 fehérje biokémiai és funkcionális tulajdonságaival. Saját adatainkon kívül genetikai eltérés a Ki-67 fehérje génjében még nem került leírásra. Elképzelhető, hogy a fehérje (funkció) teljes hiányát okozó genetikai eltérések az adott sejt pusztulását okozzák. Nem mond ennek ellent az általunk talált STOP kodont eredményező c.1300delC mutáció léte sem, hiszen ez a 7. exonban található és a Ki-67-nek ismert egy gyakoribb splice variánsa, ami ezt az exont nem tartalmazza. Elképzelhető, hogy ebben az esetben a Ki-67 izoformák arányának megváltozása lehet hatással a sejtproliferációra és lehet esetleg szerepe a tumoros transzformációban.

5.2 Az FLT3 génben lévő ITD kimutatására alkalmas elektroforetikus módszerek analitikai paramétereinek értékelése

Az FLT3-ITD az egyik leggyakoribb genetikai eltérés felnőtt AML-es betegekben. Kimutatására a rutin diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott 3 módszer a PCR-t követő agaróz, poliakrilamid illetve kapilláris elektroforézis. Vizsgálataink során AML-es betegek DNS mintáin teszteltük ezt a három detektálási módot és meghatároztuk ezek analitikai paramétereit.

Az ITD-pozitív minták aránya mindhárom vizsgálati módszerrel egyforma volt a vizsgált betegpopulációban, mely a 3 módszer hasonló érzékenysége utal. Ugyanakkor, a CE néhány kisebb intenzitású mutáns sávot is kimutatott, melyek AGE vagy PAGE segítségével nem voltak láthatóak. Ennek megfelelően a vizsgálati módszerek detektálási küszöbe 1-2% volt AGE és PAGE, illetve 0,28% volt CE esetében. A korábbi FLT3-ITD közlemények többségében hasonló szenzitivitást találtak az AGE és PAGE esetében, míg két cikk valamivel magasabb értéket közölt (5-6%). A CE-t illetően 0,8-2% szenzitivitást írtak 5 közleményben, míg 3-10%-ot 4 másik cikkben. A CE valamivel magasabb szenzitivitása, melyet a munkánk során megfigyeltünk, az általunk a mérési csúcs észlelésére használt alacsonyabb RFU küszöbértékkel magyarázható. Új mintáknál az RFU>50 jelet fogadtuk el csúcsnak, a nyomon követés során pedig, ismert csúcs-pozíciójú mintáknál akár a 15 feletti RFU értékeket is pozitívnak tekintettük. Ezzel ellentétben a korábbi tanulmányok 150-es RFU küszöbértéket használtak. Ezen alacsony szignálú ITD-eltérések jelenlétének bizonyítására, ismételt vizsgálatokat végeztünk, és csak ha reprodukálható volt a csúcs jelenléte, akkor tekintettük a mintát pozitívnak. A viszonylag alacsony észlelési küszöb ellenére csak a 1,5% feletti mutáns allél arányt lehetett még elfogadható reprodukálhatósággal megmérni, ezért ezt az értéket fogadtuk el, mint kvantitálási küszöböt a CE során.

Habár ezek a nagyon alacsony arányban jelenlévő mutáns allélek nem voltak kimutathatóak AGE és PAGE során, számos nagyobb méretű extrasávot

találtunk ezekkel a módszerekkel, amelyek viszont a CE elektroforetogramjáról hiányoztak. DNS szevenálással és heteroduplex analízissel vizsgálva ezek a nagyobb méretű extrasávok a vad-típusú és mutáns allélok által létrehozott heteroduplexeknek feleltek meg. Korábbi publikációk szintén leírták ezt a jelenséget.

AML-es betegeink mintáit vizsgálva alkalmunk nyílt a különböző elektroforetikus módszerek felbontását is összehasonlítani. Habár mindegyik módszer alkalmas a sávok/csúcsok közötti 9 bp-nyi különbség felismerésére, 3 bp-nyi különbség feloldására csak a CE képes. Hasonlóan nagy felbontást észleltek két korábbi tanulmányban, mely alátámasztja ennek a technikának a fontosságát a multiplex ITD-k kimutatásában.

A multiplex ITD-k aránya tanulmányunkban – CE-vel meghatározva – 50% (9/18) volt, ami valamivel magasabb, mint a korábban közölt 11-32%. Ez is nagy valószínűséggel az alacsonyabb RFU küszöbértékkel magyarázható, melyet a CE során a csúcsok meghatározására használtunk.

Ami az ITD méretét illeti, alapvetően három különböző technikát alkalmaztak eddig ennek meghatározására. DNS szekvenálás, CE és az Agilent Bioanalyzer használatával 3-400 bp-nyi ITD méreteket mutattak ki, 24-70 bp közötti átlagértékekkel. Saját eredményeink is ezen határok közé esnek, mivel az észlelt ITD méret intervalluma 9-178 bp volt 40 bp-os középértékkel. Adataink azt mutatták, hogy a CE segítségével végzett ITD méret meghatározás reprodukálhatósága megfelelő, még a legrövidebb szakasz (9 bp) esetében is 11%-os interassay CV%-ot kalkuláltunk. A duplikálódott/inzertálódott nukleotidok száma azonban nem minden esetben volt hárommal osztható, amit két korábbi közleményben is prezentáltak már. Ez a jelenség a vad-típusú és mutáns allélról amplifikálódott PCR termék méretének variabilitásával magyarázható, ami ± 1.0 bp változást idézhet elő az ITD méretében. Emiatt az a módszer, amelyik pontos ITD méret meghatározást biztosít, az vagy a DNS minta direkt szekvenálása, vagy az izolált és klónozott ITD fragmentumok

szekvencia analízise. Az előbbi megközelítést követve 10 ITD-t tartalmazó mintát szekvenáltunk, és a talált ITD soha nem okozott olvasási keret eltolódást. Ugyanakkor a szevenálással meghatározott ITD méretek valamivel nagyobbak voltak, mint amit CE során kaptunk. Irodalmi adatokra és saját tapasztalatunkra alapozva javasoljuk a DNS szekvenálás használatát a pontos ITD méret meghatározására, különös tekintettel arra, hogy újabb adatok szerint a duplikáció/inzerció helye is prognosztikus jelentőséggel bírhat.

Több mint 20 cikk tanulmányozta eddig az AML-betegek mintáiban a mutáns allél arányát, négy különféle módszert alkalmazva. Szemikvantitatív AGE vagy PAGE 5 publikációban szerepelt, míg kvantitatív adatokat nyertek dHPLC, Agilent Bioanalyzer és CE használatával 1, 2 illetve 13 közleményben. Az eredményeket alapvetően kétféleképpen közlik a publikációkban; a mutáns/vad típusú vagy a mutáns/(vad típusú+mutáns) allél hányadost használják közel egyenlő gyakorisággal. Emiatt saját vizsgálatunk során mindkét hányadost meghatároztuk. A mutáns/vad-típusú allél hányados középértéke a betegcsoportunkban 0,144, ugyanakkor a mutáns/totál allél hányados középértéke 12,5% volt, ami valamivel alacsonyabb, mint a korábban közölt adatok (mutáns/vad-típusú allél arány: 0,530-0,836; mutáns/totál allél hányadost: 30-47%). Valószínűleg ez is az általunk alkalmazott alacsonyabb RFU küszöbértékkel magyarázható, amit a csúcs meghatározáshoz használtunk. Ami ezeknek a meghatározásoknak a reprodukálhatóságát illeti, adataink azt mutatják, hogy a mutáns/vad-típusú és a mutáns/totál allél hányados 0,020 és 1,5% felett <25% interassay CV% értékkel jellemezhető, így ezeket az arányértékeket tekintjük a módszer kvantitálási küszöbértékeinek.

5.3 A JAK2 V617F és az FLT3-ITD és -TKD mutációk jelentősége sporadikus és örökletes colorectalis tumorokban

Bár a JAK2 gén mutációi dominálónan a krónikus myeloproliferatív kórképek és ezen belül is elsősorban a polycythemia vera kialakulásával

mutatnak összefüggést, de nagyszámú kísérletes adat szól amellett, hogy a JAK/STAT szignalizációs útvonal aktiválódása fontos szerepet játszhat a CRC patogenezisében is. A STAT3 aktivált, foszforilált változata fokozott mértékben mutatható ki a tumoros sejtek magjában és ez a jelenség összefüggést mutatott a tumor kifejezettebb invazivitásával, fokozott metastasis képző hajlammal, a tumor progressziójával és az egyértelműen rosszabb prognózissal. CRCs sejtvonalakat vizsgálva a JAK2/STAT3 inhibítorai csökkentették a tumoros sejtek proliferációját, invazivitását, migrációját, és fokozták ezek apoptózisát.

Mindezek alapján logikusnak tűnik a feltételezés, hogy a JAK2 és a kapcsolódó szignalizációs útvonal génjeinek mutációi, amelyek konstans szignalizációt és ezzel együtt aktivációt eredményeznek, szerepet játszhatnak a CRC kialakulásában. Két nagyobb vizsgálat analizálta a humán genom kinázokat kódoló génjeinek mutációi és bizonyos daganatok kialakulása közötti összefüggéseket, és a CRC esetében a JAK/STAT rendszer fehérjéi közül a JAK1 p.E886K és TYK2 p.H732R. mutáció volt – alacsony incidenciával – kimutatható. Négy tanulmány vizsgálta közvetlenül a JAK2 V617F mutáció előfordulását CRC-s sejtvonalakban és sporadikus CRC-s betegek tumormintáiban, azonban egyetlen esetben sem sikerült a mutációt kimutatni. Saját eredményeink is azt mutatták, hogy a sporadikus daganatokban ez a mutáció nem fordul elő.

Valamennyi felsorolt publikáció sporadikus CRC-s eseteket vizsgált, azonban a betegek kisebb hányadát kitevő örökletes esetekben nem tesztelték még a JAK2 V617F mutáció előfordulását. A vizsgálatunk során 6 Lynch szindrómás és 32 familiáris CRC X beteg mintáját vizsgáltuk meg, de ezekben az esetekben sem sikerült a JAK2 V617F mutációt kimutatni.

A JAK2 V617F mutáció hiánya többféleképpen is magyarázható. Felmerül annak a lehetősége, hogy a vizsgált genetikai eltérés kimutatására használt PCR+RFLP módszer érzékenysége nem megfelelő, és a kis mennyiségben jelenlévő tumoros mutált allél kimutatására már nem alkalmas.

Miután a CRC-s betegek esetében a DNS izolálás parafinos metszetekből történt, amelyek úgy lettek kiválasztva, hogy dominálónan tumoros szövetet tartalmazzanak, ez a magyarázat nem túl valószínű. A másik lehetőség, hogy a JAK2 génben további genetikai eltérések is ismertek, így pl. a 12. exon mutációi illetve további ritka eltérések, amelyeket nem vizsgáltunk, és amelyek magyarázhatják a fokozott JAK/STAT szignalizációt. Nem elképzelhetetlen, hogy a JAK2 és a további szignalizációs elemek epigenetikai változásai is befolyásolhatják ezek működését. Végül, bizonyos negatív reguláló elemek, (SOCS fehérjék) kiesése is eredményezhetik a fokozott JAK/STAT aktivációt.

Az FLT3 gén expressziója és mutációi dominálónan a hematopoetikus sejtekben fordulnak elő, de viszonylag nagy mennyiségben mutatható ki ez a fehérje illetve ennek mRNS-e a placentában és a központi idegrendszerben is. Sokkal kisebb az FLT3 expressziója a szervezet egyéb szöveteiben, így pl. a vastagbélben. Miután korábban ilyen vizsgálat nem történt, meghatároztuk az FLT3 mutációinak előfordulását sporadikus és örökletes CRC-s betegek tumormintáiban, de genetikai eltérés nem volt kimutatható. A mutációk kimutatására alkalmazott módszerek érzékenysége megfelelőnek tűnik, és vélhetően nem ez áll a mutációk hiányának hátterében, hiszen a kontrollként vizsgált AML-es populációban az FLT3-ITD és -TKD eltérések gyakorisága 25,2% és 5,6% volt, ami megfelel az irodalmi adatoknak.

A vizsgálatban résztvevő 6 Lynch szindrómás beteg mutáció analízise más szempontból is érdekes volt. Ezekben az esetekben az MMR gének mutációi igazolhatóak voltak és magyarázták az örökletes CRC kialakulását. Az FLT3 és a JAK2 mutációi nem voltak kimutathatóak ezekben a betegekben sem, így ezek kialakulása a MMR gének kiesése esetében sem tűnik valószínűnek és vélhetően nincs szerepük sem az örökletes, sem a sporadikus CRC patogenezisében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A vastagbélrák (CRC) a fejlett országok többségében a második leggyakoribb daganatos halálozási okként szerepel. Mind a sporadikus, mind az örökletes CRC hátterében környezeti és genetikai tényezők is közrejátszanak, amelyek közül jónéhányat sikerült már azonosítani. Munkánk során sporadikus és örökletes CRC-s esetek mintáit vizsgáltuk Ki-67, FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk után kutatva. Olyan fehérjék vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt, melyek vagy a sejtosztódás szabályozásában töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, vagy mutációik révén sejtproliferációt indukálnak. Az általunk vizsgált genetikai eltéréseket örökletes CRC-s betegekben korábban még nem tanulmányozták, a sporadikus eseteket illetően is kevés adat áll rendelkezésre.

A Ki-67 fehérje szerepet játszik a magasabb rendű kromatin struktúra és a sejtciklus szabályozásában, így a fehérje hiánya vagy szerkezetének módosulása szerepet játszhat bizonyos daganatok kialakulásában. Négy tumoros sejtvonalat vizsgálva 8 féle genetikai eltérést sikerült azonosítani a Ki-67 génben, melyek közül egy – korábban még le nem írt – 1-nukleotidos deléció kereteltolódást és trunkált fehérjét eredményez, 1 nem jár aminosavcserével, míg további 6 eltérés aminosav cserével járó polimorfizmus volt. A c.1300delC mutáció jelenlétét 26 sporadikus CRC-s beteg mintájában is megvizsgáltuk, de az eltérés nem volt kimutatható.

Az FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk a myeloid malignómákhoz társuló gyakori genetikai eltérések. Első lépésként az FLT3-ITD kimutatására alkalmas genetikai módszerek validálását végeztük el, amit hasonló részletességgel korábban még nem publikáltak. Adataink azt mutatták, hogy a CE-t használó vizsgálmódszer a legalkalmasabb az FLT3-ITD mutáns/totál allél arány kimutatására és kvantitációjára. A multiplex ITD jelenlétének igazolása CE segítségével lehetséges, ha a mutáns allél aránya

0,28% felett van, míg az ITD méretéről és helyéről a DNS szekvenálás adhat megbízható információt. A kontrollként szolgáló akut myeloid leukemiás populációban (107 beteg) az FLT3-ITD és -TKD gyakorisága 25,2% és 5,6%, míg a polycythaemia vera betegek (99 személy) esetében a JAK2 V617F mutáció frekvenciája 86,9% volt, ami lényegében megfelel az irodalmi adatoknak. Ezután 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-s beteg mintájában vizsgáltuk meg az FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk jelenlétét, azonban nem sikerült ezeket az eltéréseket kimutatni. Az FLT3 és a JAK2 mutációi nem voltak kimutathatóak a 6 Lynch szindrómás betegünk esetében sem, így ezek kialakulása az MMR gének kiesése esetében sem tűnik valószínűnek és vélhetően nincs szerepük sem az örökletes, sem a sporadikus CRC patogenezisében.

7. A DISSZERTÁCIÓ ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

7.1 Tumoros sejtvonalak cDNS-ében 8 genetikai eltérést találtunk, amelyből 7 a normál populációban kisebb-nagyobb gyakorisággal előforduló polimorfizmusnak bizonyult. Egy 1 nukleotidos deléciónak – c.1300delC – azonban elvileg egyértelműen lehet patogén hatása csonkolt fehérje képződéshez vezető STOP kodon létrejöttén keresztül.

7.2 A c.1300delC jelenléte nem volt kimutatható sporadikus CRC-s betegek tumormintáiban.

7.3 Az FLT3-ITD kimutatására alkalmas genetikai módszerek validálását végeztük el, amit hasonló részletességgel korábban még nem publikáltak. Adataink azt mutatták, hogy

- a CE-t használó vizsgálómódszer a legalkalmasabb az FLT3-ITD mutáns/totál allél arány kimutatására és kvantitációjára
- A CE metodika esetében a mutáns/totál allél arány kimutatásának analitikai érzékenysége 0,28%-ra növelhető
- a multiplex ITD jelenlétének igazolása CE segítségével lehetséges
- az ITD méretéről és helyéről a DNS szekvenálás adhat megbízható információt

7.4 Az FLT3-ITD, –TKD és a JAK2 V617F mutációk nem fordultak elő sporadikus és örökletes CRC-s betegek tumormintáiban.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, ILLETVE EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/297/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Bubán Tamás

Neptun kód: UBS096

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bubán, T.**, Koczok, K., Földesi, R., Szabó, G., Sümegi, A., Tanyi, M., Szerafin, L., Udvardy, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (2), 301-310, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.762>
IF:2.15
2. **Bubán T.**, Tóth L., Tanyi M., Kappelmayer J., Antal-Szalmás P.: Ki-67: Egy régi játékos új arcai.
Orvosi Hetilap. 150 (23), 1059-1070, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28638>
3. **Bubán, T.**, Schmidt, M., Broll, R., Antal-Szalmás, P., Duchrow, M.: Detection of mutations in the cDNA of the proliferation marker Ki-67 protein in four tumor cell lines.
Cancer Genet. Cytogenet. 149 (1), 81-84, 2004.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00297-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00297-8)
IF:1.577



További Közlemények

4. Tanyi, M., Olasz, J., Tanyi, J.L., Tóth, L., Antal-Szalmás, P., **Bubán, T.**, András, C., Urbancsek, H., Garami, Z., Csuka, O., Damjanovich, L.: Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families.
Fam. Cancer. 11 (3), 519-524, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-012-9515-9>
IF:1.302 (2011)
5. Tanyi, M., Olasz, J., Lukács, G., Tanyi, J.L., Tóth, L., Antal-Szalmás, P., Rész, Z., **Bubán, T.**, András, C., Damjanovich, L.: A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas.
Eur. J. Surg. Oncol. 35 (10), 1128-1130, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2009.03.011>
IF:2.564
6. Bodnár, Z., **Bubán, T.**, Várvolgyi, C.: Submucosal tumor-like gastric wall abscess.
Gastrointest. Endosc. 59 (4), 599-599, 2004.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107\(03\)02724-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107(03)02724-X)
7. Várvolgyi, C., **Bubán, T.**, Szakáll, S., Hargitai, Z., Galuska, L., Jeney, C., Kakuk, G., Gaál, J.: Fever of unknown origin with seronegative spondyloarthritis: An atypical manifestation of Whipple's disease.
Ann. Rheum. Dis. 61 (4), 377-378, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.4.377>
IF:3.593
8. Várvolgyi C., Mátyus J., Balogh Z., Bodnár Z., **Bubán T.**, Kakuk G.: Szűrővizsgálatok a gastroduodenalis fekélybetegség kockázatának felmérésére vesetranszplantációs listán lévő betegekben.
Magyar Belorv. Arch. 52 (4), 339-344, 1999.



Összesített impakt faktor: 11.186

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.727

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.10



9. TÁMOGATÁSOK

A disszertáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



SZÉCHENYI TERV
