

dr sc Izet Eminović,  
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Tuzli

mr sc Vesna Hadžiavdić  
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Tuzli

UDK 616.345-006

## **Gubitak heterozigotnosti tumor-supresor gena kod nasljednog karcinoma debelog crijeva (HNPCC)**

### **Sažetak**

Kolorektalni karcinom je jedan od najučestalijih tipova karcinoma u razvijenim zemljama i predstavlja javni zdravstveni problem. Razumijevanje uloge genetike u etiologiji kolorektalnih karcinoma veoma brzo se povećava u posljednjoj deceniji. Ovakva saznanja su veliki napredak u molekularnoj genetici. Cilj naših istraživanja je bio da odredimo gubitak heterozigotnosti kod HNPCC pacijenata i da li ona mogu biti brz i efikasan skrining za detekciju karcinoma. U istraživanja su uključena 54 uzorka tumorskog i okolnog zdravog tkiva pacijenata s karcinomom debelog crijeva, dok je, prema Amsterdamskim kriterijima, 9 pacijenata pripadalo skupini nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva. Naša studija je pokazala da genetičkih alteracije tumor supresor gena APC se pojavljuje 88, 89% uzoraka, zatim NM 23 tumor supresor gen u 55,56%, DCC 2 u 44,44%, tumor-supresor gen DCC1, P53 i RB1u 22,22% tumorskih tkiva.

**Ključne riječi:** gubitak heterozigotnosti, LOH, tumor-supresor gen, HNPCC

Magistarski rad: *Molekularno-genetička identifikacija karcinoma debelog crijeva kod stanovništva Tuzlanskog regiona*, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu

## Uvod

Sporadični karcinom debelog crijeva je genski uslovljeno oboljenje. U ovom slučaju, se radi o mutacijama u somatskoj ćeliji. Oko 80% oboljelih od karcinoma debelog crijeva ima sporadičnu formu bolesti, a 20% ima nasljednu formu bolesti.

Knudsonova hipoteza je u potpunosti prihvaćena u objašnjenju inaktivacije tumora supresorskih gena i bazirana je na mutacijama DNK sekvence i gubitku heterozigotnosti. Ova hipoteza daje mogućnost uključivanja epigenetičkih mehanizama inaktivacije gena, kao što je metilacija promotorskog regiona. Prema ovoj hipotezi, „dva pogodka“, smatra se da prvo dolazi do mutacije ili metilacije u DNK sekvenci promotora, a zatim do gubitka heterozigotnosti zbog mutacije ili metilacije i u drugom alelu (Jones i sar, 1999).

Volgstein i sar. (1988) su pokazali da postoji višestepeni model genetičkih događaja u razvoju kolorektalnih karcinoma. Prema toj teoriji, ćelija može akumulirati kombinacije četiri do pet defekata, uključujući mutacijsku aktivaciju onkogeni i inaktivaciju tumor-supresor gena, nakon čega podliježe malignim transformacijama. Ovi mutacijski događaji upotpunjavaju „adenom-karcinomsku sekvencu“ razvoja tumora. U osoba koje imaju oba alela genetički aktivna u svim ćelijama dešavaju se dvije odvojene mutacije: prvo, alteracija u jednoj kopiji, a onda, druga mutacija u drugoj kopiji, u istoj somatskoj ćeliji. Tek nakon ove mutacije razvija se tumorska ćelija. Mutacije u tumor-supresor genima su rezultat, najčešće, delecija, misens ili nonsens mutacija.

Obično, kad se i drugi alel tumor supresor-gena izgubi ili inaktivira u somatskoj ćeliji, govorimo o gubitku heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity-LOH*) koji predstavlja marker za lokalizaciju i identifikaciju tumor-supresor gena.

U osoba koje imaju oba alela genetički aktivna u svim ćelijama, dvije odvojene mutacije se dešavaju: prvo alteracija u jednoj kopiji, a onda druga mutacija u drugoj kopiji, u istoj somatskoj ćeliji. Tek nakon te mutacije, razvija se tumorska ćelija.

Istraživanja tumor-supresor gena je izuzetno važan model za upostavljanje *linkage* analize kod skupine ispitanika s kolorektalnim tumorom.

Cilj naših istraživanja je bio da analiziramo gubitak heterozigotnosti tumor-supresor gena kod pacijenata s HNPCC.

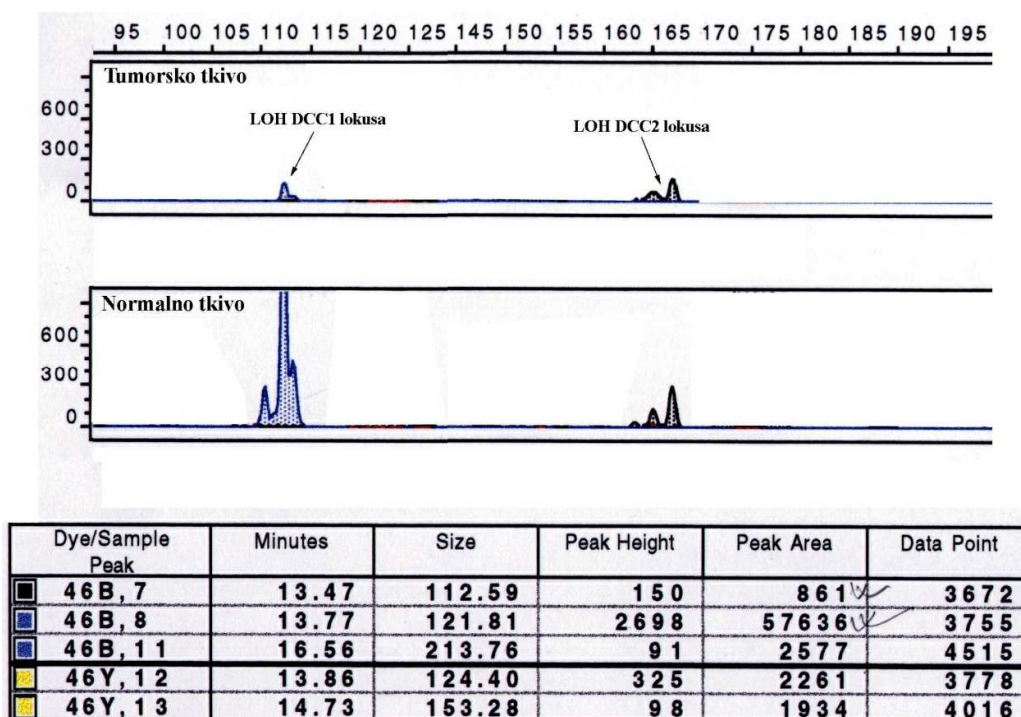
### **Materijali i metode**

Analizirana su 54 uzorka tumorskog i okolnog zdravog tkiva pacijenata s karcinomom debelog crijeva. Uzorci su uzeti u saradnji s Gastroenterološkom i Hirurškom klinikom Univerzitetskog Kliničkog Centra u Tuzli. Tumorsko i zdravo okolno tkivo fiksirano je u formalinu i ukalupljeno u parafinske blokove. Molekularna genetička analiza gubitka heterozigotnosti je urađena na Institutu za molekularnu biologiju, Medicinskog fakulteta u Ljubljani. Metoda izolacije genomske DNK zasnovana je na deparafinizaciji tkivnih rezova i na proteolizi ćelija tkiva proteinazom K. Fluorescentana; lančana reakcija sinteze DNK je metoda koja ima veoma široku primjenu u detekciji tumora, a posebno kod gubitka heterozigotnosti (*LOH*) tumor-supresor gena. Za detekciju *LOH*, koristili smo intragenske markere za sljedeće tumor-supresor gene: NM23, p53, APC, RB1, DCC1 i DCC2 (Cawkwell i sur., 1999).

Uvjeti umnožavanja u radnoj smjesi (engl. *Master mix*-u) do konačnog volumena 25 $\mu$ l: 2,5  $\mu$ l 10 x Puffer; 1 $\mu$ l DNA (5-10 ng); 2  $\mu$ l (25mM) MgCl<sub>2</sub>; po 0,5  $\mu$ l (2,5 mM) svakog dNTP-a; 0,1 $\mu$ l (0,5 U) AmpliTaq Gold polimeraze (Perkin-Elmer); 1 $\mu$ l forward primer (12,5 pmol) i 1 $\mu$ l reverse primer (12,5 pmol) svakog para početnih oligonukleotida za svaki intrageni marker; te do 25 $\mu$ l volumena sterilnu vodu. Amplifikacija je postavljena na PCR Thermocycler 9600 (Perkin-Elmer).

Za razdvajanje amplificiranih produkata, koristili smo automatski sekvenator 310 ABI PRISM, (Genetic Analyser 310, Perkin Elmer), koji omogućava razdvajanje i kvantifikaciju DNK fragmenata po principu kapilarne elektroforeze.

Gubitak heterozigotnosti je matematički izračunat (Anonymous, 1999). Za heterozigotne slučajeve, odnos alela je izračunat za svaki par normalnog i tumorskog tkiva prema formuli  $T1:T2/N1:N2$ , u kojem T1 i N1 vrijednosti polja kraće alelske dužine i T2 i N2 polja vrijednosti dužih alela za tumorski i zdravi uzorak. Rezultat je rangiran od 0.00-1.00 (Slika 1). Ako je rezultat bio manji ili jednak s 0.50, onda je prikazan signifikatni gubitak heterozigotnosti, i to dužeg alela. Homozigotni slučajevi ne mogu se uzeti za ovo računanje. Za statističku obradu podataka korišteni su  $\chi^2$  test i Fisher's exact test (Arcus Quickstat biomedical for Windows).



Slika 1. Gubitak heterozigotnosti tumor-supresor gena DCC 1 i DCC 2

## Rezultati i diskusija

Genetičke alteracije tumor-supresor gena APC pojavljuju se 8/9 (88, 89%) uzoraka, zatim NM 23 tumor-supresor gen u 5/9 (55,56%), DCC 2 u 4/9 (44,44%), tumor-supresor gen DCC1, P53 i RB1u 2/9 (22,22%) tumorskih tkiva.

Najviši broj homozigotnih lokusa je prisutan kod DCC 1 tumor-supresor gena u 4/9 (44,44%), kod DCC 2 u 3/9 ili 33,33% (tabela 1).

**Tabela 1. Genetičke alteracije tumor supresor gena**

Genetičke alteracije	Tumor supresor geni											
	NM23		P53		APC		RB1		DCC1		DCC2	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
AI	5	55,56	2	22,22	8	88,89	2	22,22	2	22,22	4	44,44
NAI	4	44,44	7	77,78	1	11,11	7	77,78	3	33,33	2	22,22
H	0	0	0	0	0	0	0	0	4	44,44	3	33,33
Ukupno	9	100,00	9	100,00	9	100,00	9	100,00	9	100,00	9	100,00

«AI» alelski debalans ili gubitak heterozigotnosti (*LOH*)

p<0,05

«NAI» nema gubitka heterozigotnosti

«H» homozigotan lokus

Analiza genetičkih alteracija i kliničkopatoloških karakteristika pokazala je da je gubitak heterozigotnosti u lokusu APC, RB1 i NM23 gena zastupljeniji kod žena 2/2 (100%), a kod muškaraca je gubitak alela uočen u lokusu APC u 6/7 (85,71%).

U starosnoj skupini manjoj od 50 godina izražen je gubitak heterozigotnosti u lokusu APC gena u 3/3 (100%) uzoraka, a u starosnoj skupini starijoj od 50 godina, pojavljuje se gubitak heterozigotnosti u lokusu APC u 5/6 (83,33%) uzoraka.

Kod lokalizacije tumora gubitak heterozigotnosti je zastupljeniji kod ljevostranih tumora u lokusu APC u 6/7 (85,71%), a kod desnostranih tumora gubitak alela u lokusu u APC, DCC1 i DCC2 u 2/2 (Tabela 2).

**Tabela 2. Odnos genetičkih alteracija tumor supresor gena i kliničkopatoloških karakteristika**

Genetičke alteracije tumor-supresor													
Kliničkopatološke karakteristike	N	NM 23		P53		APC		RB 1		DCC1		DCC2	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
Spol													
m	7	3	42,86	1	14,29	6	85,71	0	0,00	2	28,57	4	57,14
ž	2	2	100,00	1	50,00	2	100,00	2	100,00	0	0,00	0	0,00
Dobna kateg. (god.)													
>50	6	3	50,00	1	16,67	5	83,33	1	16,67	2	33,33	3	50,00
<50	3	2	66,67	1	33,33	3	100,00	1	33,33	0	0,00	1	33,33
Lokalizacija tumora													
ljevostrani	7	4	57,14	2	28,57	6	85,71	2	28,57	1	14,29	2	28,57
desnostrani	2	1	50,00	0	0,00	2	100,00	0	0,00	2	100,00	2	100,00
Histopatološka klasifikacija													
mucin.adenokar	1	0	0,00	0	0,00	1	100	0	0,00	1	100,00	1	100,00
adenokarcinom	8	5	62,50	2	25,00	7	87,5	2	25,00	1	12,50	3	37,5

p>0,05

Nema signifikantne razlike ( $p>0,05$ ) u pojavi genetičkih alteracija u tumorskim tkivima s gubitkom heterozigotnosti i kliničkopatoloških karakteristika.

Prema Aaltonen i sar. (1993), alteracije tumor-supresor gena p53 kod *HNPCC* pacijenta je bila prisutna u 64% slučajeva, a alteracije gena APC u 57% slučajeva. Analize gubitka heterozigotnosti kod APC i P53 tumor-supresorskih gena

su bila signifikatno manja kod tumora *HNPCC* u odnosu na sporadične tumore (Konishi i sar, 1996).

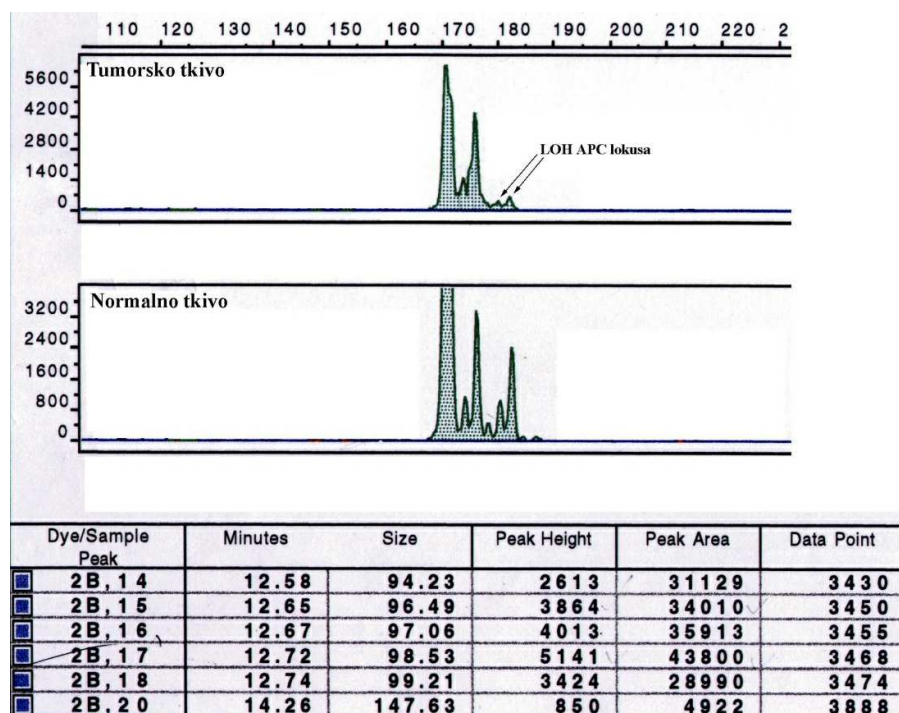
Cawkwell i sar. (1994) ustanovili su da gubitak heterozigotnosti DCC gena kod kolorektalnih karcinoma iznosi oko 29%, a Huag i sar. (1993) oko 33%. Gubitak DCC gena kod gastričnih karcinoma je oko 60% (Uchino i sar, 1992).

Prema Dieumegardu i sar. (2000) uočeno je da 81% MSI tumora *HNPCC* ne pokazuje genetičke alteracije u p53 tumor supresor-genu, dok 93% *MSS* tumora sporadičnih tumora ima genetičke alteracije u tumor-supresorkom genu p53. Njihova istraživanja sugeriraju da ove informacije mogu biti dovoljne za razlikovanje porodičnog od sporadičnih slučajeva.

Kod *HNPCC*, mutacija u zametnoj liniji prisutna je u svakoj ćeliji i samo jedan dalji događaj. Obično, gubitak heteozigotnosti može inaktivirati MMR gene. Ovo se dešava u ranijem stadiju, prije inaktivacije APC tumor-supresorkog gena, a rezultat je brza progresija od adenoma do karcinoma tzv „adenom-karcinomska sekvenca“.

Gubitak funkcije APC gena vodi ostalim mutacijama, najčešće mutacijam ras onkogen. Zatim se događa treća mutacija u tumor-supresoru DCC genu, koja vodi pojavi kasnog adenoma. Tek kad obje kopije p53 tumor supresor-gena postanu defektne, ćelije se maligno transformiraju, a za razvoj karcinoma neophodno je najmanje sedam „pogodaka“: po dva na svaki tumor supresor gen (APC, DCC i p53) i jedan na ras onkogen.

Rezultati naših istraživanja su pokazali da je gubitak heterozigotnosti izražen kod tumor-supresor gena APC sa 88,89% (slika 2), a ostali tumor-supresori su imali znatno manji procenat gubitka alela. Naši rezultati se slažu s prethodnim po tome što je gubitak heterozigotnosti P53 gena kod ove skupine pacijenata izražen s 22,22%.



Slika 2. Gubitak heterozigotnosti tumor supresor gena APC

### Zaključak

Gubitak heterozigotnosti tumor-supresor gena pokazuje izuzetno visoku senzitivnost kod tumor-supresor gena APC s 88,89%. Ovo nam ukazuje da taj tumor supresor-gen postaje marker izbora u molekularno-genetičkoj analizi pacijenata s karcinomom debelog crijeva. Prema izloženim argumentima, gubitak heterozigotnosti APC gena je oko 50% slučajeva i u ostalim istraživnjima i smatra se da je mutacija APC rani događaj u karcinogenezi. Analiza genetičkih alteracija i kliničkopatoloških karakteristika pokazala je da je gubitak heterozigotnosti u lokusu APC, RB1 i NM23 gena zastupljeniji kod žena (100%), a kod muškaraca je gubitak alela uočeni u lokusu APC (85,71%). Značajno je istaći da je u starosnoj skupini mlađoj od 50 godina izražen gubitak heterozigotnosti u lokusu APC gena 100%, a

u visokom procentu i u starosnoj skupini iznad 50 godina pojavljuje se gubitak heterozigotnosti u lokusu APC (83,33%) uzoraka.

Naša istraživanja ukazuju da je pozitivan mutacijski test-rezultat jak marker mutacije supresor-gena a, s druge strane, negativan rezultat je dobra indikacija da su ti geni, vjerovatno, još funkcionalno normalni.

Rezultati istovremeno doprinose uspostavljanju početne jedinstvene baze podataka u BIH na osnovu mutacijskih analiza. Prema tome, implikantno se odražava i na dijagnostiku karcinoma, te na taj način doprinosi uspostavljanju rane dijagnoze karcinoma. Istraživanja su pokazala da je gubitak heterozigotnosti dobar skrining-test za lociranje i detekciju mutacija tumora debelog crijeva a, isto tako, može predstavljati i metod efikasne identifikacije mogućih slučajeva *HNPC*.

### Literatura

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW; Vogelstein B, De La Chapelle A (1993): *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science 260:812-16.
2. Anonymous. *Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer Syndrome*, (1999): Mayo Press, Mayo Clinic, Mayo:1-7.
3. Cawkwell LA, Levis FA, Quike P (1994): *Frequency of allele loss of DCC, p53, Rb1, Wt1, Nf1, Nm 23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction*. Br J Cancer 70:813-818.
4. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Jarvis P, Shepard N, Qiuurke P (1999): *Choice of manager strategy for colorectal cancer based on diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair system*. Gut 45: 409-15.
5. Diuemegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, Le Bihan ML, Iefere B, Pignon JP, Rougier P, Lasser P, Benard J, Couturier D, Bressat B (2000): *Extensive molecular*

*screening for hereditary non polyposis colorectal cancer Br J Cancer 82 (4): 871-880.*

6. Huang THM, Quesenbery ST, Martin MB, Loy TS, Diaz Arias AA (1993): *Loss of heterozigosity detected in formalin fixed, paraffin embeded tissue of colorectal carcinoma using a microsatellite located within the deleted in colorectal carcinome gene.* *Diagnosis Mol Pathol* 2:90-91.
7. Jones PA, Laird PW (1999): *Cancer epigenetic comes of age.* *Nat Genet* 21: 103-107.
8. Konishi M, Kikuchi R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishii N, Iwama T, Mori T, Kolke M, Uslilo K, Chiba S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M (1996): *Molecular nature of colon tumor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, familial polyposis and sporadic colon cancer.* *Gastroenterology* 111 : 307-17.
9. Uchino S, Tsuda H, Noguchi H, Yokota , Terada M, Saito T, Kabayashi M, Sugimura T, Hirohashi S (1992): *Frequent loss of heterozigosity at the DCC locus in gastric cancer.* *Cancer Res.* 52: 3099-3102.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Presinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL (1988): *Genetic alterations during colorectal – tumor development.* *N Engl J Med* 319:525-532.