

# A Rák Molekuláris Biológiája

## BEVEZETÉS

**DIA 1, 2** A fejlett országokban a rák (a szív- és érrendszeri betegségeket követően) a 2. legfontosabb halál ok, melynek aránya országonként változik, átlagosan 20% feletti az esélyünk arra, hogy rákos betegségben fogunk meghalni. A rák két fő jellemzője a kontrollálatlan sejtszaporodás és a testen belüli terjedés. A rák genetikai betegség. A „genetikai” szót azonban kétféle értelemben használjuk: az egyik az, hogy öröklődő, a másik pedig, hogy a DNS megváltozása okozza a betegséget. Az örökölhető rák az összes rákos betegségnek csupán 10%-át teszi ki. Az emberi tumorok körülbelül 20%-át fertőzés (főként vírus) okozza, 70%-a pedig szporadikus eredetű, tehát az egyén sejtjeiben történő mutációk, ill. epigenetikus változások okozzák. Megjegyzés: az öröklődő rák fogalma nem teljesen egyértelmű. Vannak ugyan olyan öröklődő allélok, amelyek közel 100%-os bizonyossággal rákot okoznak a hordozókban, a valóság azonban az, hogy a betegség penetrációja 0 és 100% közötti. Nem feltétlenül helyes az alacsony szintű fogékonyságot okozó allélokat a rák öröklődő tényezőinek tekinteni, s rendszerint, nem is ismerjük ezeket. A rák azért különleges a genetikai betegségek között, mert akár egyetlen testi sejtben bekövetkező mutáció is okozhatja, mivel a mutáns DNS-t tartalmazó sejt elszaporodhat és áttéteket képezhet a testben. Egyéb szomatikus mutációk nem okoznak betegséget, mert néhány sejt elvesztése nem jelent problémát a sok trillió sejtet tartalmazó szervezet számára. A „rák” kifejezés nem egyezik meg a „tumor”-al, az utóbbi tágabb fogalom. Egy tumor ugyanis lehet jóindulatú, pre-malignus (rák előtti; ha nem kezelik, rákhoz vezethet) és rosszindulatú (malignus; ez a rák). Több mint 100 ráktípust ismerünk. A rákok kb. 85%-a ektoderma eredetű epitél sejtekben keletkezik, ezek a **karcinómák** (pl. kolon karcinóma – a vastagbél daganata; adenokarcinóma, a mirigyekből kialakuló rák). A mezoderma sejtekből (pl. csont, izom) keletkezett rákot **szarkómának** (pl. oszteoszarkóma – a csont rákja) nevezzük. Ezek az ún. szolid (tömör) tumorok, szemben a **leukémiával**, ami a fehérvérsejtek rákja, s nem képez lokális gócpontokat. A **limfóma**, a limfociták rákja, azonban szolid tumorokat képez a testben. A hagyományos terápiák (sebészet, kemoterápia és radioterápia) alkalmazása az esetek nagy részében hatástalan. Emiatt az utóbbi években a figyelem az alternatív megoldások felé fordult. Áttörésről azonban a rák gyógyításában még egyáltalán nem beszélhetünk, bár, bizonyos ráktípusokat ma már hatékonyan tudunk gyógyítani (pl. gyermekkori leukémia, bőrrák, emlőrák). Nem ez a helyzet a diagnosztikában, az utóbbi években ezen a területen egy óriási ütemű forradalom zajlik. A különböző nem-invazív (nem-beavatkozó) módszerekkel (pl. PET/CT) a betegség korai észlelése vált lehetővé. A különféle molekuláris biológiai technikák (PCR, DNS chip, új-generációs szekvenálás) pedig a tumorok azonosításában játszanak alapvetően fontos szerepet. A rák genetikai okainak megértésében is óriási lépéseket tett a tudomány az utóbbi években. A mutációk két fő gén típust érintenek. Az egyik a tumorszupresszor gének, melyek termékei a sejtosztódás normális menetét szabályozzák. A tumorszupresszor génekben való mutációk a kontroll megszűnését okozhatják. A másik rákgén típust a proto-onkogének gének képviselik. Ezen gének fehérjetermékei a sejtosztódásra stimuláló hatással vannak. A proto-onkogének mutációk hatására onkogénekké alakulhatnak át, melyek, a mutáció típusától függően, folyamatosan aktív állapotban maradnak, vagy a normálisnál nagyobb mennyiségben termelődnek. Mára az a meggyőződés alakult ki, hogy a tudomány megtalálta a végső választ a rákképződés okára, amely szerint a rák nem más, mint a rákkal kapcsolatos génekben való mutációk felhalmozódása. Az utóbbi néhány évben azonban új fejlemények láttak napvilágot, melyek más megvilágításba helyezik a rákképződés kialakulásának folyamatát (ld. Új elméletek c. fejezet). A modern molekuláris genetikai kutatások fő törekvése a betegségekre (pl. rák) való hajlam kimutatása a betegség megjelenése előtt, mely lehetőséget ad a prevenció (megelőzésen alapuló) eljárások kidolgozására (gyógyszeres kezelés, gyakori vizsgálatok, életmódváltás, stb.).

## TUMORKÉPZŐDÉS

**Intelligens tumorok DIA 3** A tumor képződése egy több lépésben végbemenő folyamat. A testet felépítő kb. 100 trillió ( $10^{14}$ ) sejtnek kooperálnia kell egymással, hogy a testet átlagosan 80 évig egészségben tartsák. Hogyan lehetséges az, hogy ha ilyen sok sejtünk van, s ezek mindegyike képes rákosan elfajulni, hogy az emberi populáció nagyobbik felében mégsem fejlődik ki ez a betegség. A magyarázat erre az, hogy egy sejtnek számos rendkívüli képességre kell szert tennie ahhoz, hogy malignussá váljon. Legalább 7 különböző genetikai szabályozó rendszerben kell, hogy zavar keltődjön a rákká váláshoz. A tumorsejteknek számos problémát kell megoldaniuk (genetikai módszerekkel) lépésről lépésre azért, hogy elszaporodjanak, majd elterjedjenek a testben. **(1) Beragadt a gázpedál** A tumorsejtek osztódnak olyan körülmények között is, amikor a normális sejtek nem teszik ezt. Egy normális sejtnek külső serkentő szignálra van szüksége az osztódáshoz, a tumorsejtek megvannak enélkül is. Szemléletesen olyan a helyzet, mintha beragadt volna a gázpedál. **(2) Nincs fék** Egy tumorsejtnek figyelmen kívül kell hagynia az „állj le az osztódással” parancsokat, melyet a sejt saját apparátusa vagy a szomszédos sejtek küldenek probléma esetén. Egy ilyen aberrációt úgy lehet szemléltetni, mintha elromlott volna a fék egy autóban. **(3) Ne öld meg magad!** A tumorsejtek képződésük és terjedésük folyamán is stresszes körülmények között léteznek (pl. kevés az oxigén és a táplálék, DNS törések, kromoszómaszám változás, stb.), melyek normálisan apoptózishoz vezetnek. Ugyancsak apoptózishoz kellene, hogy vezessen a szomszédos sejtek által küldött halál jelek, ill. a túlélési jelek hiánya. A tumornak tehát ki kell iktatnia az önmegsemmisítő mechanizmusát. **(4) A vérerek vonzása** A borsószemnél nagyobb méretű tumorok oxigén és táplálékhiánytól szenvednek, hiszen a belső sejtekhez diffúzióval már nem jutnak el ezek az anyagok. Ezért a tumoroknak meg kell győzniük a környékbeli vérereket, hogy hálózzák be őket. **(5) Halhatatlanság** A testi sejtek normálisan a testben és sejt kultúrában is meghatározott számú (50-70) osztódáson mennek keresztül, aztán leállnak. A sejtek szaporodásának egyik korlátja a telomer rövidülés. A tumoroknak aktiválniuk kell a telomeráz enzimüket, hogy ezt a korlátot kiiktassák. **(6) Invázió** A tumoroknak a testben való elterjedéséhez számos problémát meg kell oldaniuk: ki kell szabadulniuk az extracelluláris mátrix fogságából, enzimekkel fel kell oldaniuk a vérerek falát, s sikeresen meg kell telepedniük egy új helyen. A rák okozta megbetegedések 90%-át a metasztázis okozza. **(7) Az immunrendszer figyelmen kívül hagyása** A kontroll nélkül szaporodó sejteket az immunrendszer gyorsan eltávolítja. Egy sikeres tumorsejtnek ezért vagy blokkolnia kell ezeket a mechanizmusokat, vagy el kell tüntetni az árulkodó jeleket.

### Proto-onkogének & tumorszupresszorok

**(1) Onkogének** („tumor-ozó gének”) **DIA 4** A legtöbb tumorsejtben az ún. proto-onkogének legalább egyike mutációt szenved (ilyenkor onkogénnek, „rákot okozóknak”, nevezzük őket). A proto-onkogének a sejtek szaporodását serkentő módon szabályozzák. Ezek a gének növekedési faktorokat, ezek receptorát, egyéb szignál proteinekét és transzkripciós faktorokat kódolnak. Egy proto-onkogént kétféle mutáció alakíthat onkogénné: **(a)** a fehérje szerkezetét megváltoztató domináns-negatív hatást okozó mutáció; **(b)** a genetikai szabályozó szekvenciában létrejövő mutáció, ami magasabb szintű génextpressziót okoz. A megváltozott proto-onkogén a továbbiakban folyamatosan sejtosztódásra ad parancsot, ezért a nem-osztódó sejtek osztódni kezdenek, az eleve osztódó sejtek pedig gyorsabb ütemű osztódásba kezdenek. Az abnormalis viselkedés megjelenéséhez a proto-onkogén gének két allélja közül elegendő egyiknek a mutációja.

**(2) A tumorszupresszor gének DIA 5** általában a tumorra való hajlamot örökítő gének. Azért beszélünk hajlamról, mert ezek a gének gyakran recesszív öröklődésűek, s így az egy hibás allélt hordozók tünetmentesek lehetnek. Rendszerint, e gének mindkét kópiájának mutánsnak kell lennie (vagy hiányoznia kell) ahhoz, hogy a rák kialakulhasson. Tehát, a rák előfeltétele egy proto-onkogén egy alléljának és egy tumorszupresszor gén mindkét alléljának a diszfunkciója.

# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

---

**A két-találat hipotézist DIA 6** Alfred Knudson 1971-ben javasolta annak magyarázatára, hogy miért fordul elő a retinoblasztóma (a retinában képződő tumor) már korai gyermekkorban és miért jelenik meg mindkét szemben. Az elmélet szerint egyetlen (öröklött) allél (első találat) nem elegendő a tumor kialakulásához. A második találat az élet során későbbiekben alakul ki egy testi sejtben, s ez okoz rákot. Nemrégén kiderült azonban, hogy ez a hipotézis nem igaz, legalábbis a retinoblasztómára. A betegség öröklött formája ugyanis autoszómális domináns módon öröklődik, csak kevesebb, mint 100%-os a penetranciája. A sporadikus (nem öröklődő) retinoblasztóma viszont valóban recesszív (az öröklődő forma a gén egy speciális lokuszán mutáns). Néhány tumor-szupresszor génre viszont igaz a hipotézis, bár egyre több esetben derül ki, hogy a mutáció nem recesszív, hanem nem-teljes penetranciájú domináns jelleg.

**A heterozigóta állapot elvesztése DIA 7** Az öröklődő rákbetegségeknél az egyének rendszerint heterozigóták. Egyes tumorszupresszor génekben való mutációkra heterozigóta egyének fogékonyak a betegségre, de nem lesznek rákosak, mert a normális allél helyettesíti a beteg allél funkcióját. A heterozigóta állapot elvesztése bekövetkezhet a normál allélban történő pontmutáció vagy deléció által, kromoszómavesztéssel, egyenlőtlen transzlokációval, mitotikus rekombináció útján, vagy kromoszóma-vesztést követő újrakettőződéssel.

**A több-találat hipotézis DIA 8** Az öröklődő vastagbélrák (kolon karcinóma vagy kolorektális karcinóma) annak az alapelvnek a klasszikus példája, hogy több, egymást követő mutáció szükséges a rák kialakulásához. A familiáris adenomatosis polyposis (FAP) egy olyan betegség, amelynek során a páciens vastagbélében polipok alakulnak ki, melyek közül egyesek rákosan elfajulhatnak. A betegség kialakulásának első lépése a tumor-szupresszor FAP gén mutáns alléljának öröklése, melyet a normális allél mutációja követ. Ez a folyamat jóindulatú polipokat (adenómák) eredményez. A karcinóma kialakulása felé vezető úthoz a *K-ras* (*Kristen rat sarcoma*) onkogén aktiválódása szükséges. A *DDC* (*deleted in colorectal carcinoma*) gén mutációja a metasztázis előfeltétele. Ezt követi, vagy meg is előzheti, a *p53* gén mutációja. A FAP a vastagbélrákok 1%-át képviselik (a vastagbélrákok 5%-a öröklődő).

**A gyulladás szerepe a rákképződésben DIA 9** Néhány virális vagy bakteriális fertőzés krónikus gyulladást eredményezhet, ami rákképződéshez vezethet. A gyulladás a gazdaszervezet védekezési mechanizmusa a kórokozók és a sérülések ellen, s a sebgyógyulási folyamat része. Normális viszonyok között ez egy szabályozott, rövidéletű folyamat, melynek a gyulladásgátló faktorok vetnek véget. A legújabb eredmények azt mutatják, hogy az elhúzódó, krónikus gyulladások rákhoz vezethetnek, akár kórokozók nélkül is. A gyulladás kulcsfaktora az NF- $\kappa$ B. Ez a transzkripciós faktor a gyulladáson kívül több más olyan downstream hatásban is részt vesz, ami rákképződést okozhat. Tehát, az NF- $\kappa$ B a molekuláris kapocs a gyulladás és a rákképződés között. Az NF- $\kappa$ B gén onkogén aktivitását többféle emberi tumorban is megfigyelték, pl. többszörös (multiple) mielóma, akut limfocita leukémia, prosztatata- és emlőrák (= mellrák). A *Helicobacter pylori* egy baktérium, amely gyomorfekélyt okozhat. Ezért a felfedezésért Barry Marshall és Robin Warren 2005-ben Nobel Díjban részesültek. A baktérium a gyomorban krónikus gyulladást okoz, ami karcinogenezishez vezethet. Ennek az esélye azonban csupán 1%. Figyelem: a két Nobel Díjas nem foglalkozott a *Helicobacter* tumorképző sajátágaival!

## Onkogének, proto-onkogének

**DIA 10** Az **onkogéneket** eredetileg állati retrovírusokban fedezték fel. Több mint 20 olyan virális onkogén (*v-onc*) ismert, melynek a celluláris megfelelője (*c-onc*) is ismert. Nyilvánvalóan, ezeknek a vírusoknak az ősei lopták el a géneket sejt genomból évmilliókkal ezelőtt. A celluláris proto-onkogének szerkezete evolúciósan erősen konzervált, ami arra utal, hogy rendkívül fontos szerepet játszanak az eukarióta sejtek életében. Gyakorlatilag, minden ismert esetben az onkogének a szignál transzdukciós útvonalak komponensei, s olyan jeleket fognak fel (receptorok), ill. utasításokat hajtanak végre (intracelluláris jelfelhérjék), amelyek az osztódás serkentésére vonatkoznak. Az onkogéneket aktiváló genetikai változások a következők lehetnek: **(1) strukturális mutációk**, melyek a gén szerkezetét változtatják meg, s azt

# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

eredményezik, hogy az általuk kódolt fehérje beérkező jel híján is folyamatosan aktív lesz (pl. egyes protein kinázok, vagy a *Ras*); (2) szabályozási mutációk, melyek egy gén kifejeződését változtatják meg: megnövekedett génextpresszió, vagy génkifejeződés rossz helyen, rossz időben (pl. növekedési faktorok és transzkripciós faktorok). A genetikai okok mellett, egy gén epigenetikai változások eredményeként is onkogénné válhat.

## Virális onkogének

(1) **Rous sarcoma vírus (RSV; a csirke retrovírusa)** **DIA 11** Peyton Rous 1911-ben fibroszarkómából (kötőszöveti tumor) származó mintákat izolált csirkéből, feldarálta azokat, majd centrifugálással eltávolította a sejteket. A felülúszót olyan kispórusú szűrőn szűrte át, amelyen még baktérium sejtek sem jutottak át, majd a szűrt oldatot csirkékbe oltotta. A legtöbb beoltott csirkében szarkóma alakult ki. Később kimutatták, hogy a fertőző ágens egy vírus melyet, felfedezőjéről, Rous sarcoma vírusnak neveztek el. 55 évvel később, 1966-ban Rous Nobel Díjat kapott a felfedezéséért. Bebizonyosodott, hogy az RSV egy retrovírus, melynek RNS genomja reverz transzkripcióval DNS-sé alakul, s beépül a csirke genomba. A nem-transzformáló retrovírusok *gag*, *pol*, és *env* géneket tartalmaznak, melyek a vírus szerkezeti elemeit, a reverz transzkriptázt és egyéb fehérjéket kódolnak. A tumoros transzformációt okozó retrovírusok, mint pl. az RSV, tartalmaznak egy plusz onkogént is, amely az RSV esetében a *v-src* gén (a *sarcoma* szóból; kiejtése „szárk”). A rákkutatásban a következő áttörés 1977-ben történt, amikor Michael Bishop és Harold Varmus kimutatták, hogy a csirke és más fajok genomja tartalmaz egy a *v-src*-al rokon gént. Ezt a normális celluláris proto-onkogént *c-src*-nek nevezték el, hol a „c” a celluláris eredetet jelzi, szemben a „v” virálissal. Bishop-ék 1989-ben részesültek Nobel Díjban e felfedezésükért, amely alapvetően megváltoztatta a rákkutatás addigi orientációját, mivel kiderült, hogy nem csupán vírusok hordoznak onkogéneket, hanem normális celluláris gének is átalakulhatnak ezekké. Megjegyzés: a legtöbb onkogén retrovírus nem néhány nap alatt, hanem hónapok, esetleg évek múltán okoz rákot. Ezek a „lassú” vírusok egy fontos sajátágban különböznek a „gyors” retrovírusoktól (mint amilyen pl. az RSV): nincs onkogénjük. A „lassú” retrovírusok azáltal okoznak rákot, hogy egy celluláris proto-onkogén közelében integrálódnak a genomba, megváltoztatván annak kifejeződését. Ez az integráció sok vírus esetében nem véletlenszerű, hanem célzottan egy adott proto-onkogén szabályozó régiójának meghatározott helyére történik (hely-specifikus rekombináció).

**DIA 12 (2) A humán papilloma vírus (HPV)** duplaszálú DNS genommal rendelkezik, s a bőr és a nyálkahártya epitél sejtjeit támadja meg. Harald zur Hausen 1976-ban publikált egy hipotézist, mely szerint a HPV fontos szerepet játszik a méhnyak rák kialakulásában. A német kutató 1984-ben be is bizonyította a hipotézisét, melyért 2008-ban Nobel Díjban részesült. A vírus két onkogént tartalmaz: az E6 fehérje ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik, s a sejt p53 fehérjéjének proteaszómákban való degradációját idézi elő. Az E7 fehérje pedig az Rb-hez kapcsolódik, s ezáltal meggátolja annak E2F transzkripciós faktorokat gátló hatását. Az E2F faktorok a DNS replikáció génjeit aktiválják, s mivel a HPV-vel fertőzött sejtekben ezek a transzkripciós faktorok aktívak (nem gátolja őket az Rb), nem áll akadály a DNS replikáció és a sejtosztódás előtt.

(3) Az **Epstein-Barr vírus (EBV)** egy humán patogén gamma-herpeszvírus. Az EBV több olyan virális fehérjét kódol, amely a gazdasejt jelút folyamataira van hatással. Az egyik ilyen az **LMP1**, amely képes tenyésztett sejteket tumorossá alakítani. Az LMP multifunkcionális hatásának egyike olyan gének aktiválása, amelyek a (1) sejtosztódás serkentésében játszanak szerepet (pl. EGFR – *epidermal growth factor receptor*; epidermális növekedési faktor receptor) és (2) gátolják az apoptózist (pl. az antiapoptotikus *Bcl-2* aktiválása által). (3) Az LMP1 szintén aktiválja az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort. Az EBV a B-sejt limfoproliferatív betegség és a nazofaringeális karcinóma oki tényezője, míg csupán közrejátszik a Burkitt's limfóma kialakításában (pl. a maláriával együtt).

(4) **Kaposi szarkóma-asszociált herpeszvírus (KSHV = human herpesvirus 8; HHV8; béta-herpeszvírus)** a Kaposi szarkóma (bőr és kötőszöveti rák) ko-faktora. A Kaposi szarkóma gyakran jelenik meg AIDS-ben szenvedő páciensekben. A KSHV többféle mechanizmus által járul hozzá a tumor képződéshez. Néhány virális fehérje citokinek és növekedési faktorok termelődését indukálja a fertőzött sejtben, amely a szomszédos nem-fertőzött sejtekre hat (parakrin hatás). Továbbá, a KSHV több anti-apoptotikus fehérjét is termel (pl. *vBcl-2*), ill. a **LANA** virális protein zavarja az Rb és a p53 fehérjék funkcióját.

(5) **Hepatitis B vírus (HBV)** Erős korreláció áll fenn a HBV fertőzés és a májrák (hepatocelluláris karcinóma) között. A gazdavirus kölcsönhatás immunválaszt vált ki, amely nekrozist, gyulladást majd regenerációt eredményez. Ezek a hatások a felnőtt



# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

páciensek 10%-ában tartósan fennmaradnak, ami krónikus fertőzést, s így krónikus gyulladást okoz. Az a feltételezés, hogy a sejtek megnövekedett szaporodási rátája, és/vagy a gyulladás által okozott oxidatív stressz, onkogén mutációhoz vezet. A **HBV X** multifunkcionális fehérje fontos szerepet játszik a karcinogenezisben; transzgenikus egérben májrakot okozott. A HBV X fehérje különféle jelutakban a proto-onkogéneket aktiválja: a kináz kaskádokat (pl. a RAS-MAPK útvonal), az NF- $\kappa$ B-t, ill. inaktiválja p53 fehérjét.

## Proto-onkogének és celluláris onkogének

**DIA 13** Ha a **celluláris onkogének** normálisan fejeződnek ki, akkor, proto-onkogéneknek nevezzük őket. A vírusok onkogénjének a „normális” működése a tumorképzés, ezért ők nem rendelkeznek proto-onkogénekkel.

(1) A celluláris proto-onkogének kétféle **genetikai mechanizmus** révén alakulhatnak át onkogénekké.

(1a) **Kvantitatív változás** (mennyiségi, genetikai szabályozásbeli változás): a proto-onkogén fehérjék mennyiségi változása (a gén amplifikációja) vagy a génexpresszió megjelenése olyan sejtekben, ahol eddig nem volt jellemző (szabályozási mutáció: mutáció a promóter/enhanszerben, vagy kromoszómális transzlokáció, melynek révén a gén más szabályozó elemek irányítása alá kerülhet). E változások eredményeként a kérdéses fehérjék aminosav összetétele nem változik, „csak” nagyobb mennyiségben lesznek jelen, mint normálisan, ill. megjelennek olyan sejtekben, ahol eddig nem fejeződtek ki. Ha a genom transzpozonjai vagy a genomba integrálódó vírusok (retrovírusok) a proto-onkogének szabályozó régiójába épülnek be, akkor a génexpresszió megváltozhat, mert a vírus vagy a mobilis elem saját promóterei átvehetik a szomszédos gén kifejeződésének irányítását.

(1b) **Kvalitatív változás** (minőségi, szerkezeti változás): a proto-onkogén kódoló régiójában történő, aminosav változással járó, pontmutáció vagy deléció. A keletkezett onkoprotein serkentő stimulusok nélkül is aktív: folyamatosan sejtsztódást serkentő jeleket küld. Továbbá, kromoszómális transzlokáció következtében új funkcióval rendelkező fúziós onkoprotein jöhet létre (pl. Philadelphia kromoszóma).

(2) A proto-onkogének onkogénekké alakulhatnak **nem-genetikai mechanizmusok** által is, melyek lehetnek epigenetikai változások (pl. hiszton acetiláció, vagy demetiláció, miRNS hatások, stb.) vagy különféle (pl. gyulladási vagy virális) faktorok hatásra.

**Vadászat onkogénekre. DIA 14 (1) A *c-src* proto-onkogén felfedezése.** Bishop és munkatársai a következő módszerrel mutatták ki a celluláris *src* gén létezését. Az RSV vírusból izolálták a *v-src* gént, majd a kapott DNS fragmentet radioaktívan megjelölték. A jelölt DNS-t próbaként használták a csirke genommal való hibridizációhoz. A Southern-blot analízis kimutatta, hogy a *v-src*-nek celluláris megfelelője van, ez a *c-src*. **DIA 15 (2) Humán onkogének klónozása.** Ha humán húgyhólyagból származó tumorsejtek DNS-ét (30-50 ezer bázispárnyi szakaszokra való törést követően) tenyésztett egér sejtekbe juttatjuk, akkor az tumort indukál ezekben a sejtekben. A transzformált sejtek hozzávetőlegesen egymillió bázispárnyi emberi DNS-t tartalmaztak, amelyek sok különféle DNS fragmens független beépüléséből származtak. A tumor kialakulása szempontjából azonban e fragmensek nagy része irreleváns volt. Mivel egy tumorossá vált egérsejtből származó klón túl sok emberi DNS-t tartalmazott, nem volt egyértelmű, hogy melyik felelős közülük a transzformációért. Ezért a transzformált egérsejteket felszaporították (minden egyes klón egyetlen sejtől származott!), s újra DNS-t nyertek belőlük, majd a DNS fragmentálást (törést) követően, ezekkel a DNS-ekkel egy második transzformációt végeztek. Ezért a transzformált egérsejteket felszaporították (minden egyes klón egyetlen sejtől származott!), s újra DNS-t nyertek belőlük, majd a DNS fragmentálást (törést) követően, ezekkel a DNS-ekkel egy második transzformációt végeztek. Az emberi és egér DNS-t az Alu szekvenciák alapján lehet egymástól elkülöníteni: az egér DNS-ben nincs Alu, az emberi genomban viszont átlagosan néhány tízezer bázispárnyi távolságokban szétszóródva előfordul. Az Alu szekvenciát radioaktívan megjelölve próbaként használhatjuk, a restriktív enzimekkel darabokra vágott transzformált egérsejtek DNS-hez való hibridizációjához. A Southern blot-on látható, hogy az első transzformáció során még sok humán DNS épült be egyetlen egérsejtbe, míg a 2. transzformációnál már csak 1, esetleg 2-3 fragmens. Ha összehasonlítjuk a különböző klónokból kapott DNS fragmenseket, akkor a mindegyikben közös lesz az az onkogén, amit keresünk, s már csak meg kell

# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

szekvenálni azt az azonosítást végezték. A további vizsgálatok azt mutatták, hogy az *src* gén sokféle organizmusban megtalálható, pl. az emlősökön kívül a rovaroknál is. A *src* génnel kapcsolatos kutatások a rákbiológia azon alapvető felismeréséhez vezettek, hogy az onkogének rendszerint a normális proto-onkogének megváltozott formái.

**DIA 16 A proto-onkogének főbb típusai** a következők: (1) növekedési faktorok, (2) növekedési faktor receptorok, (3) intracelluláris jelátalakítók, (4) transzkripció faktorok, melyek mitogén (osztódás serkentő) hatásukat a génexpresszió szabályozása révén fejtik ki, (5) sejtciklus szabályozók és (6) sokféle mikroRNS. A legtöbb növekedési faktor receptor tirozin kináz aktivitással bír.

Megjegyzések: A tirozin kinázok egy fehérje tirozin-, a szerin/treonin kinázok pedig a szerin vagy treonin aminosavait foszforilálják. A foszfát csoport szolgálhat egy másik fehérje (pl. egy másik kináz) számára felismerő helyként és/vagy megváltoztathatja a fehérje térszerkezetét, s ezáltal (fehérje típustól függően) aktiválhatja, vagy inaktíválhatja az adott fehérjét.

**DIA 17 Onkogénné válás** – ld külön file: 1b.

## Tumorszupresszor gének

**DIA 19** Az emberi testben vannak olyan mechanizmusok, amelyek a sejtek osztódását szabályozzák, s vigyáznak arra, hogy a DNS rendben replikálódjon. Ezek a tumorszupresszor gének, melyek közül többen stop jelként hatva, gátolják a sejtek szaporodását, elősegítik a differenciálódásukat, és szükség esetén apoptózist indukálnak. A celluláris onkogénekkal szemben, amelyek normális funkciója egyetlen allél mutációja esetén megváltozik, a tumorszupresszor gének esetében a megváltozott funkcióhoz gyakran mindkét allél mutációja (vagy epigenetikai gátlása) szükséges. Ezt a jelenséget a két találat hipotézis magyarázza. Ha a gátló szignál eltűnik, szabályozatlan sejtszaporodás lesz az eredmény, ami a rák ismertetőjegye. Más tumorszupresszor gének a DNS javításban játszanak szerepet. Ha ezek inaktíválódnak, a kijavíthatatlan DNS mutációk rákhoz vezethetnek. Az adott tumor lehet öröklődő vagy szporadikus eredetű. **(I) Öröklődés** esetén, mindkét szülőtől származhat egy-egy hibás kópia (az ilyen embrió általában életképtelen), vagy csak az egyik szülőtől. Az utóbbi esetben a másik allél mutációja már a páciens testében alakul ki embrionális korban vagy születés után bármikor az élet során. **(II) A nem-öröklődő (szporadikus) tumorok** kétféleképpen alakulhatnak ki: (1) az egyik mutáció szülők ősvarsejtjében jön létre (ez tk. öröklődő, mégis szporadikusnak nevezzük, mert a szülő testi sejtjei nem tartalmazzák a hibás allélt), a másik mutáció pedig az utódban jön létre; vagy (2) mindkét mutáció *de novo* (újonnan) alakult ki a páciens testében. Ha az adott gén teljes mértékben recesszív öröklődésű, akkor az utóbbi (2 független mutáció) ritkán alakul ki. Ha az egyén már eleve egy hibás alléllal rendelkezik, akkor a kockázat magas. Magyarázat: a tumorokban a mutációs ráta általában magas (ld. Modern elméletek c. részt).

**DIA 20 (1) Sejtfelszíni molekulák** Számos sejtfelszíni fehérje molekula, - ellentétben a proto-onkogén receptorokkal, - a sejtosztódásra gátló hatással van.

(a) A TGF- $\beta$  receptor (*Transforming growth factor receptor*) gátló hatását a CDKI-k (CDK inhibitorok) stimulálásával éri el: a gátlás serkentése magasabb szintű gátlást eredményez.

(b) DCC (*Protein product deleted in colon carcinoma*) a sejtosztódást azáltal szabályozza, hogy integrálja a sejt környezetéből származó jeleket.

**DIA 21 (2) Intracelluláris szignál transzdukciós proteinek** Ezek a molekulák az intracelluláris proto-onkogénekre gátló hatással vannak. (a) A Neurofibromatózis faktor-1 (NF)-1 és a (b) GTPáz-aktiváló proteinek (GAP-ok) a Ras GTPáz funkcióját aktiválják (a GTP GDP-vé való átalakulásának serkentése). (c) Adenomatosis polyposis coli (APC) a  $\beta$ -katenin (sejtosztódás serkentő transzkripció faktor) degradációját segíti elő.

**(3) Transzkripció faktorok**

# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

**DIA 22 (a)** A retinoblasztóma (Rb) az elsőként felfedezett tumorszupresszor gén. A retinoblasztóma egy ritka gyermekkori rák 1:20,000 előfordulási gyakorisággal. Két formája van: öröklődő (familiáris; 40%) és a nem-öröklődő (szporadikus; 60%). A leggyakoribb öröklődő *Rb* mutáció egy csonka fehérjét eredményez. Ez a mutáció (szemben a tumorszupresszor gének recesszív jellegével) domináns, melynek penetranciája 90% körüli. Öröklött betegség (egy hibás kópia) esetén a korai gyermekkorban megjelennek mindkét szemben a tumorok. Több, kevésbé gyakori öröklődő retinoblasztóma recesszív öröklésmentet mutat. Szporadikus retinoblasztóma esetén az *Rb* gén rendszerint szintén recesszív mutációt szenved, s ezért mindkét allélnak mutálódnia kell a tumor kialakulásához. Ez utóbbi esetben a betegség csak későn és csak az egyik szemben jelenik meg. **Figyelem:** a legtöbb fellelhető irodalomban az öröklődő retinoblasztómát recesszív allélok által kódoltként tárgyalják, s ez nem helyes. Az *Rb* gén szolgált modellül a két-találat hipotézishez, mely szerint az egyik hibás *Rb* kópia a szülőktől öröklődik, a másik pedig később alakul ki. A betegség leggyakoribb öröklött formájára ez nem igaz! Az azonosított mutációk főként deléciók, kereteltolódások, nonszensz, vagy misszensz mutációk, amelyek az *Rb* funkció elrontásához vezetnek. Mivel az Rb útvonal központi szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a tumor iniciációt bármilyen mutáció előidézheti, amely blokkolja az Rb funkciót, és így az E2F-et felszabadítva, lehetővé teszi, hogy ez a transzkripció faktor a növekedési szignálok hiányában is aktiválja a génexpressziót. Megjegyzés: az Rb az E2F transzkripció faktor család tagjait gátolja: az Rb/E2F komplex a sejtosztódásra gátlóként hat. Az Rb protein megakadályozza a sérült DNS-el rendelkező sejteket, hogy a sejtciklus **G1** állapotából **S**-be kerüljenek. Habár, az *Rb* gén minden szövettípusban kifejeződik, mégis csak retinoblasztómát és nagyon kevés más típusú szövetben okoz rákot a gén diszfunkciója. Az Rb útvonal azonban a legtöbb tumorban inaktivált (csak nem az *Rb*, hanem más gének érintettek). Továbbá, az Rb útvonal és maga az *Rb* gén is a tumor vírusok támadáspontja.

**DIA 23 (b)** Tumor protein 53 (TP53, vagy egyszerűbben p53 protein; → a *TP53* (egyszerűbben: *p53*) gén kódolja) DNS sérülés vagy celluláris stressz (hipoxia, egyéb sejtciklus anomáliák) hatására aktivizálódik. A p53 fehérje kétféle módon fejt ki a hatását: **(1) A sejtciklus leállítása** A p53 indukálja a p21 transzkripcióját, amely gátolja az Rb foszforilációját a CDK/ciklin által. A foszforilált Rb a G1-ből S fázisba való átmenethez szükséges. **(2) Apoptózis** Ha a hibát nem lehet kijavítani, a p53 fehérje apoptózisra ad parancsot. Egy ép sejtben a p53 protein az MDM2 fehérjéhez kapcsolódik (ez a chaperon biztosítja a p53 inaktivitását).

**P53: javíts vagy ölj!** **DIA 24** A *p53* gén tumorszupresszor és egyben pro-apoptotikus gén is. A humán tumorok közel felében nem működik. A p53 feladata tehát az, hogy figyelje a DNS és a sejt sérüléseit, és a károsodás mértékének függvényében a válaszlépéseket dolgozza ki. Ha kicsi a kár, akkor megállítja a sejtciklust, amíg a javítás meg nem történik, ha nagy a károsodás, akkor a p53 az apoptózis útvonalat indítja be. A fent említett sejtbeli események különféle jelutakat aktiválnak, ami az MDM2 chaperon p53 fehérjéről való disszociációját idézi elő, s ez aktiválja a p53-at. A hagyományos anti-tumor technikák (kemoterápia és radioterápia) nem közvetlenül károsítják a tumorsejteket, hanem sejtes stresszt és DNS sérüléseket idéznek elő, amely indukálja p53 gén apoptotikus aktivitását. Magyarul, a kemoterápia és a sugárterápia nem közvetlenül, hanem a *p53* gén aktivizálása által pusztítja el a tumorsejteket. Tehát, működőképes p53 gént nem tartalmazó tumorok esetében ezek a technikák nem alkalmazhatóak.

**DIA 25 A p53 szerepéről részletesebben** – külön lapon!

**(4) DNS javító gének** A DNS hibák javítása egy rendkívül fontos tevékenység. A mutációs ráta ugyanis jóval magasabb, mint amennyi mutáció végül megmarad. Ennek oka az, hogy a mutációk zömét kijavítják a hibajavító enzimek.

**DIA 26 (a)** BRCA 1 (Breast Cancer Type 1 susceptibility protein; 1-es típusú emlőrákra hajlamosító fehérje) és BRCA2 Mindkét gén által termelt fehérje a DNS hibajavításában játszik szerepet. A BRCA1 bizonyos variánsai megnövelik az emlőrák rizikóját. A kutatók több száz olyan mutációt azonosítottak, amelyek megnövekedett kockázatot jelentenek. Abnormális BRCA1 vagy BRCA2 génekkel rendelkező

# 1. A RÁK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

nők 60%-os eséllyel lesznek emlőrákosak 90 éves korukra (persze ha más okból meg nem hálnak előtte); a petefészek rák esélye pedig 55% BRCA1 és 25% BRCA1 mutáció esetén. A leggyakoribb rákot okozó BRCA1 mutáció abnormálisan rövid fehérjét eredményez, ami nem képes elvégezni a hibajavító funkcióját. A BRCA1 mutáció, az emlőrák mellett, növeli a petefészek és a hererák kockázatát is.

**DIA 27 (b) Xeroderma pigmentosum (XP) gén** Eddig 8 olyan gént találtak, amelyek az XP nevű betegséget okozzák: XPA-tól XPG-ig. Mindegyikük a nukleotid kivágásos DNS javításban vesz részt. A DNS sérülést UV sugárzás, ill. különböző kémiai karcinogének okozhatják. Ha tumorszupresszor gének (pl. p53) is sérültek, az eredmény rendszerint rákképződéssel jár. Az ilyen betegségben több mint ezerszeres a bőrrák kialakulásának kockázata. A rák rendszerint tíz éves kor előtt kialakul. Az UV sugárzásnak való kitettség (napozás) rendkívüli mértékben megnöveli a bőrrák kockázatát.

(5) A **miRNS-ek** nem csak onkogének, hanem tumorszupresszorok is lehetnek. Nem részletezzük.

## Egyéb rák gének

**Egyéb rákkal kapcsolatos gének – nem sokat tudunk DIA 28** Az onkogének és a tumorszupresszor gének mellett, a ráksejtek rendszerint több olyan egyéb génben is mutációt szenvednek, ami a testben való terjedésüket segíti elő (metasztázis gének). Ezek a mutációk a következő feladatokra teszik alkalmassá a tumort: a szomszédos szövetekbe való behatolás, az immunrendszer figyelmének kijátszása, ill. az immunműködés gátlása, új vérerek képzése (angiogenezis gének), elterjedés a testben és új helyek célbavétele (targeting), megtelepedés, majd új kolonizáció. E folyamatok eredménye a sikeres metastázis.

**Metasztázis DIA 29** A legtöbb sejt nem változtatja a helyét, az adott szövetben tartózkodik élete végéig (kivételesen pl. a vérképző őssejtek); egy májsejt a májban marad, s sohasem fordul elő a tüdőben, és *vice versa*. A „metasztázis” annak a folyamatnak a neve, melynek révén a tumorsejtek a keletkezési helyüktől a test más pontjaira vándorolnak. A metastázis képessége az alapvető különbség a jó- és rosszindulatú daganatok között. Habár egy rák metastázisa gyakran bekövetkezik, egyetlen ráksejt esélye a megtapadásra csupán 1:10,000-hez, tehát, a legtöbb ráksejt nem képez áttétet. Az elsődleges tumort rendszerint egyszerű eltávolítani, míg a több száz vagy ezer metastázist gyakorlatilag lehetetlen. Sajnos mire a rákot diagnosztizálják, addigra a szolid tumorok több, mint 50%-a elterjedt a testben. A ráksejtek vetélkednek a normális sejtekkel a tápanyagért és az oxigénért, és más egyéb módon is rontják a megtámadott szerv funkcióját. A különböző tumorfajták preferált helyeken telepsznek meg. A metastázis preferenciák fő oka a vérkeringésben keresendő. Mivel a vér szállítja a tumorsejteket, ezek a rákos szövethez közel fekvő szervekben nagyobb eséllyel telepednek meg. Érdekes módon, a metastázisok 1/3-a nem magyarázható a fenti elvvel. Például, az emlőrák főként a csontokba ad metastázist, pedig ez anatómiailag nem indokolt. Ezt a megfigyelést már több mint 100 éve az ún. **Mag és Talaj elmélettel** magyarázzák. Az elmélet szerint a ráksejtek („magok”) optimális környezetet („talaj”) igényelnek a szaporodásukhoz. A sikeres metastázishoz a tumorsejtek sejtfelszíni molekulái kapcsolatba lépnek a környező sejtek és az extracelluláris mátrix molekuláival, s ahol kedvező a kölcsönhatás, ott megtelepsznek. A legújabb megfigyelések szerint a kapillárisok falán elhelyezkedő receptorok befolyásolják a metastatikus sejtek célpontját. A Mag és Talaj Elméletet támasztja alá az ún. **pre-metastatikus niche koncepció**, mely szerint a jövőbeni metastázis helye úgy változik meg, hogy az kedvező legyen a ráksejtek megtapadásához. Tehát, a rák nem-tumorsejtek segítségével előkészül a tumorsejtek befogadására. E folyamat molekuláris háttere egyelőre még nem ismert. Annyit tudunk, hogy a csontvelőben a jövőbeni metastatikus helyeken megjelennek a VEGFR1 receptort (*vascular endothelial growth factor receptor 1*) kifejező prekurzor sejtek, előre kialakítván az eljövendő tumor helyét (niche). Ennek értelme az lehet, hogy a VEGFR receptorok a VEGF kapcsolódás hatására angiogenezist (vérképződést) okozó jelfolyamatokat indítanak be. A pre-metastatikus niche helyek célzott gátlása, jelentős terápiás értékkel bírhat a rák elleni küzdelemben.

**DIA 30 A metastázis lépései:** migráció, intravazáció (a szerveket körülvevő alapmembránon keresztül történő behatolás a vérerekbe), vér általi transzport, extravazáció (kilépés a kapillárisból, bejutás a cél-szervekbe), kolonizáció (megtapadás az adott szervben), majd angiogenezis (vérképződés). A metastázis leglassúbb lépései a migráció és a kolonizáció.



## Epigenetikai faktorok

**DIA 31** Az epigenetikai faktoroknak a rák kialakulásában való szerepükről egyelőre keveset tudunk. Ha egy DNS hibák kijavításában szerepet játszó gén szabályozó szakasza metilálódik, az a többi gén mutációs rátájára is hatással van. Egy recesszív proto-onkogén gén metilációja szintén tumorigenezist indukálhat, ha a gén másik allélja mutáns. Az epigenetikai faktorok a gének kifejeződését szabályozzák a DNS metilációja, vagy a hiszton metilációja és acetilációja által. Ezek a faktorok képesek megváltoztatni a fenotípust változatlan genetikai háttér mellett is. Például az emlő- és a petefészek rák valószínűbb az olyan nőknél, akiknél korán jelenik meg az első menstruáció (menarche) és kései a menopauza, ill. akiknek nincs gyerekük, vagy 30 év után születik. Ez a jelenség valószínűleg az ösztrogének és progeszteron epigenetikai hatásának tulajdonítható.

## Általános aspektusok

**DIA 32 Ugyanaz az allél, különböző lokusz, különböző fenotípus** Ugyanabban a génben való különböző mutációk eltérő fenotípust hozhatnak létre. Jó példa erre a *RET* proto-onkogén (*RET*: *rearranged after transfection* = transzfekeció után átrendeződött). Az öröklött mutációk 2-es típusú többszörös endokrin neopláziához (*MEN*: *multiple endocrine neoplasia*) vezetnek. A betegség attól függően változik, hogy a *RET* génen belül hol történt a mutáció: *MEN-2A*, *MEN-2B*, vagy familiáris medulláris pajzsmirigy rák. Megjegyzés: Rendszerint a helyzet azonban az, hogy ugyanabban a génben történő mutáció ugyanazt a betegséget okozza. Nem minden génfunkciót elrontó mutáció vezet rákhoz, ami főként a proto-onkogénekre igaz, ahol egy adott funkcióért (pl. ligand kötés) felelős domén mutációja okoz csak rákot.

**DIA 33 Más lokusz, ugyanaz a fenotípus** Sok esetben, különböző génekben történő mutáció ugyanazt a ráktípust okozza. Például, az öröklődő emlő- és petefészek rákra való fogékonyságot két különböző kromoszómán elhelyezkedő gén is okozhat: a *BRCA1* és *BRCA2*.

**DIA 34 Autoszómális domináns öröklődés** A legtöbb öröklődő rákbetegség autoszómális kromoszómát érint (nem XY). A domináns öröklődés azt jelenti, hogy egyetlen mutáns allél elegendő a betegség megjelenéséhez. Teljes penetrancia esetén minden generációban megnyilvánul a betegség.

**DIA 35 Autoszómális recesszív öröklődés** esetén az érintett gén mindkét kópiájának mutánsnak kell lennie a rák kialakulásához. A hordozókban csak egy allél mutáns, ezért nem lesz beteg az illető.

**DIA 36 Penetrancia** Néha előfordul, hogy egy domináns allélt hordozó személyben nem fejeződik ki a betegség, míg másokban ugyanaz a mutáció betegséget okoz. Ez a nem-teljes penetrancia esete. Az első esetben a rák kialakulásához a második allél mutációja szükséges. Tehát, az egyik beteg allélt örökli a páciens (minden sejtben jelen van, de nem okoz rákot), míg a másik mutáció valamelyik testi sejtjében alakul ki. Valójában, a két találat hipotézis is rendszerint ilyen típusú öröklődésen alapul (nem pedig egy recesszív mutáns allél öröklésén és egy további allél későbbi mutációján).

**Előfordulás és alapítóhatás DIA 37** Egyes populációkban bizonyos rákkal kapcsolatos alléleknek magasabb az előfordulási gyakorisága, mint más populációkban. Ennek egyik oka az ún. alapító hatás lehet, melyet egy kis populáció hirtelen nagyra való növekedése okoz. Ez lehet egy kis populáció elvándorlása is, melyet később izoláció követ. Az izoláció lehet olyan szaporodási elkülönülés is, amikor egy népcsoport tagjai rendszerint egymással kötnek házasságot. Erre példa az askenázi (kelet európai) zsidók esete. Ezeknél az embereknél 40 egyénből egy hordozza a *BRCA1* génben az ún. 185delAG mutációt (a 185. pozícióban egy AG dinukleotid deléciója), s emiatt nagy gyakorisággal fordul elő közöttük emlő- és petefészek rák.