

MOLEKULARNA GENETIKA I FARMAKOGENETIKA U ONKOLOGIJI DJEČJE DOBI

SANJA KAPITANOVIĆ*

Nastanak tumora proces je s više stupnjeva, koji nastaje kao posljedica niza genetskih promjena što normalnu stanicu vode u zloćudnu preobrazbu. Rezultati brojnih istraživanja upućuju na aktivaciju onkogeni i/ili inaktivaciju tumor supresorskih gena te gena za popravak DNA kao ključna zbivanja u procesu nastanka primarnog tumora te potom njegovog napredovanja do zloćudnog, invazivnog i metastatskog tumora.

Temeljem novih spoznaja proizašlih iz projekta humanog genoma medicina prilagođena pojedincu mogla bi uskoro postati stvarnost. Na kemoterapeutike primijenjene u standardnim dozama određeni broj oboljelih ne odgovori na terapiju, odgovori djelomično, ili se razviju neželjene nuspojave. Farmakogenetika se bavi nasljednim razlikama u genima čiji su proteinski produkti uključeni u odgovor na terapiju. Podatci dobiveni analizom genoma pojedinca mogli bi omogućiti precizniji odabir terapije, kako bi se postigao što bolji učinak liječenja uz što manje nepoželjnih i toksičnih nuspojava. Kako bi farmakogenetika ušla u svakodnevnu praksu, potrebno je provesti prospektivna farmakogenetska testiranja, kojima bi se ispitala povezanost pojedinih genskih lokusa s odgovorom na terapiju u ispitivanoj populaciji.

Deskriptori: TUMORI – dijagnoza, genetika; CITOGENETIKA – metode; CITOGENETSKA ANALIZA – metode

UVOD

Nastanak tumora proces je s više stupnjeva, koji nastaje kao posljedica niza genetskih promjena što normalnu stanicu vode u zloćudnu preobrazbu. Rezultati brojnih istraživanja upućuju na aktivaciju onkogeni i/ili inaktivaciju tumor supresorskih gena kao ključna zbivanja u procesu nastanka i napredovanja zloćudnih tumora (1, 2).

Zloćudni tumori dječje dobi specifični su po tome što se, s obzirom na to da se javljaju u ranoj životnoj dobi, u njih podrazumijeva naslijeđena genetska promjena, koja nosi predispoziciju za obolijevanje od raka. Obiteljska anamneza djeteta oboljelog od raka često otkriva druge

oboljele članove obitelji, što upućuje na to da je nasljeđivanje promijenjenog gena iz generacije u generaciju uzrok nastanku tumora u oboljelog djeteta. Danas je poznat veći broj onkogeni i tumor supresorskih gena koji su uključeni u nastanak tumora u dječjoj dobi (3-6).

ONKOGENI

Proto-onkogeni su geni koji u eukariotskoj stanici imaju ključne uloge u regulaciji rasta i sazrijevanja stanica. Zbog genetskih promjena kao što su mutacija, višestruko umnažanje, translokacija ili preuređenje, dolazi do njihove pretvorbe u onkogene, čime poprimaju sposobnost zloćudne preobrazbe stanice. Produkte onkogeni, ovisno o njihovoj strukturi ili ulozi u stanici, dijelimo na više skupina. Po svojoj funkciji mogu biti: faktori rasta, receptori za faktore rasta, proteini koji posreduju u prijenosu signala kroz staničnu membranu (sekundarni glasnici), proteini koji reguliraju ekspresiju drugih gena (transkripcijski faktori), ili drugi proteini važni za stanične funkcije. Danas je poz-

nato da aktivacija nekoliko dominantnih onkogeni dovodi do nastanka zloćudnih tumora u djece (1, 2).

Burkittov limfom. Proto-onkogen *c-myc* smješten je na dugom kraku kromosoma 8 u čovjeka i kodira jedan fosfo-protein stanične jezgre. U najvećem broju (90%) djece oboljele od Burkittova limfoma uključen je u translokaciju t(8;14), u kojoj *c-myc* onkogen bude translociran s dugog kraka kromosoma 8 na kromosom 14. Funkcijska posljedica ove translokacije je ta da gen *c-myc* ovom strukturnom promjenom dođe pod utjecaj pojačivača u regulatornoj regiji gena za teške lance imunoglobulina na kromosomu 14. U ovom je slučaju gen *c-myc* destabiliziran s jedne strane oštećenjem vlastite regulatorne regije, a također i smještajem pod regulatornu regiju jednog od imunoglobulinskih lokusa. Promijenjena transkripcija gena *c-myc* za posljedicu ima povećani broj progenitorskih B-stanica u proliferaciji. Kako su ove stanice podložne novim genetskim promjenama, krajnji rezultat svih tih promjena je nastanak tumora Burkittova limfoma (3-6).

* Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med., znanstvena savjetnica, Laboratorij za personaliziranu medicinu, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Bijenička c. 54, 10000 Zagreb, E-mail: kapitan@irb.hr

Neuroblastom. Jedna od strukturnih promjena onkogeni, karakteristična baš za tumore dječje dobi, višestruka je umnoženost gena *n-myc* u neuroblastomima u djece. Onkogen *n-myc* smješten je na kromosomu 2 u čovjeka i višestruko je umnožen, u prvom redu u uznapredovalim stadijima ovog tumora. Testiranje DNA neuroblastoma, jednog od najčešćih tumora dječje dobi, na višestruku umnoženost gena *n-myc*, može nam biti dobar pokazatelj u predviđanju odgovora oboljeloga na terapiju (3-6).

Ewingov sarkom. Promjena onkogeni *ETS1* koji kodira jedan transkripcijski faktor pokazala se korisnim biljekom za Ewingov sarkom i periferne neuroepiteliome. Gen *ETS1* smješten je u čovjeka na kromosomu 11. Kad je zbog strukturne promjene premješten na kromosom 22, njegova ekspresija biva promijenjena, no točna uloga gena *ETS1* u tumorigenezi još nije razjašnjena (3-6).

TUMOR-SUPRESORSKI GENI

I dok onkogeni djeluju na genetički dominantan način (tj. dovoljno je da bude promijenjen samo jedan alel gena da bi došlo do neprevilnog rasta i diobe stanica), istraživanja su pokazala da su nasljedni karcinomi rezultat promjene gena koji djeluju na genetički recesivan način (tj. nužno je da oba alela gena budu promijenjena, mutirana ili deletirana). Drugu skupinu gena čine tumor-supresorski geni. Suprotno onkogenima, tumor-supresorski geni su ona skupina gena čija je normalna funkcija da kontroliraju rast i diobu stanica i koče njihov nepravilan rast te posljedično i nastanak tumora. Ovi su geni često mutirani ili inaktivirani u tumorskim stanicama. U nasljednim sindromima prvi je alel inaktiviran od rođenja, a drugi se inaktivira tijekom života. U nastanku zloćudnih tumora u djece dokazane su promjene nekoliko tumor-supresorskih gena (1, 2, 7).

Retinoblastom. Istraživanje retinoblastoma u djece, odnosno genetskih promjena tumor-supresorskog gena *Rb*, koji je odgovoran za nastanak ovog tumora, pomoglo je u stvaranju teorije dvostrukog hitca u nastanku i napredovanju tumora. Knudsonova originalna *two-hit* hipoteza sugerira da oba alela jednog gena moraju biti promijenjena da bi došlo do nastanka tumora. Knudson je 1971. godine predložio ovu teoriju na osnovi promjena tumor-supresorskog gena *Rb* utvrđenih u

nasljednim i sporadičnim slučajevima retinoblastoma u djece. U obiteljskim slučajevima jedna od dviju promjena gena *Rb* prisutna je već u spolnim stanicama jednog od roditelja te djece, koja na taj način nasljeđuju predispoziciju da obole od retinoblastoma. Ako dođe do druge stečene promjene gena *Rb* u stanicama djetetove retine, razvit će se retinoblastom. Suprotno tome sporadični slučajevi retinoblastoma razvijaju se kao posljedica dviju uzastopnih stečenih promjena gena *Rb* u stanicama retine (3-7).

Li-Fraumeni sindrom. Stečena promjena gena *p53* smještenog na kromosomu 17 u čovjeka i proteina koji ovaj gen kodira jedna je od najčešćih genetskih promjena u sporadičnim karcinomima u čovjeka. Nasljedna promjena tumor-supresorskog gena *p53* povezana je sa sklonošću obolijevanju od zloćudnih tumora i opisana je kao Li-Fraumeni sindrom. Djeca koja naslijede mutaciju gena *p53*, češće obolijevaju od Wilmsova tumora, rabdomiosarkoma, Ewingova sarkoma te neuroblastoma (3-8).

Wilmsov tumor. Wilmsov tumor ili nefroblastom je embrionalni tumor, koji nastaje iz ostataka nerazvijenih bubrega, a javlja se s učestalošću od 1 na 10 000 djece. Genetska predispozicija za nastanak Wilmsova tumora povezana je s mutacijom tumor-supresorskog gena *WT1*, smještenog na kromosomu 11. Protein WT1 u svojoj strukturi posjeduje domenu koja mu daje sposobnost vezivanja na DNA, tj. pripada skupini transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju drugih gena. Mutacija gena *WT1* dovodi do gubitka sposobnosti vezivanja proteina WT1 na DNA, što za posljedicu ima nastanak Wilmsova tumora (3-6).

Nasljedna adenomatozna polipoza. Nasljedna mutacija gena *APC* smještenog na kromosomu 5, vezana je za obolijevanje od nasljedne adenomatozne polipoze. U oboljelih se u dječjoj dobi, u drugom desetljeću života, na sluznici debelog crijeva razvije na stotine, pa i tisuće adenomatoznih polipa različitog stupnja displazije. Ovi dobroćudni tumori posjeduju određeni zloćudni potencijal pa neki od njih dožive zloćudnu preobrazbu, najčešće u tridesetim i četrdesetim godinama života, ako se bolesnici ne liječe. Prva promjena gena *APC* u oboljelih od obiteljske adenomatozne polipoze odgovorna je za nastanak mikroadenoma u kriptama sluznice debelog crijeva, dok je druga stečena

promjena, tj. inaktivacija drugog alela odgovorna za prelazak mikroadenoma u makroskopski vidljive adenome, te uz mutacije gena *K-ras* i *p53* za zloćudnu pretvorbu. Karakteristika napredovanja neoplastičnog procesa, koji u podlozi ima nasljednu promjenu gena *APC*, ubrzana je inicijacija, tj. ubrzani početak procesa nastanka i napredovanja tumora (7, 9).

Neurofibromatoza tip 1. Neurofibromatoza tip 1 jedna je od najčešćih nasljednih bolesti u čovjeka i javlja se s učestalošću od 1 na 2000 živorođene djece. Bolest je vezana za nasljednu mutaciju tumor-supresorskog gena *NF1*, u čovjeka smještenog na kromosomu 17. Najozbiljnija komplikacija ove bolesti je velika sklonost obolijevanju od zloćudnih tumora. Djeca oboljela od neurofibromatoze tip 1 izložena su 16 puta većem riziku da obole od zloćudnog tumora prije petnaeste godine života. Najčešći zloćudni tumori koji se javljaju u oboljelih od neurofibromatoze tip 1 su tumori centralnog i perifernog živčanog sustava, akutne leukemije te sarkomi (4, 7, 10).

GENI ZA POPRAVAK DNA

Geni za popravak DNA (MMR od engl. *mismatch repair*) odgovorni su za održavanje integriteta staničnog genoma. Ovu obitelj gena čine: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6* te *hMLH3*. Produkti ovih gena djeluju u kompleksu, a sudjeluju u prepoznavanju te popravku pogrešno sparenih baza koje nastaju pri sintezi novih molekula DNA. Ako neki od proteina, zbog mutacije gena, postane nefunkcionalan i popravak DNA postaje nemoguć, posljedica toga je nakupljanje grješaka duž čitavog genoma i pojava fenomena koji se naziva "mikrosatelitna nestabilnost" ili "nestabilnost genoma". Nestabilnost genoma je promjena koja se pojavljuje u ponavljajućim slijedovima nukleotida koji su raspoređeni duž čitavog genoma. U čovjekovu genomu ovakvih repetitivnih polimorfni biljega ima oko 50.000-100.000 i teoretski u svima njima može doći do promjena zbog nasljedne mutacije gena *MMR* (1, 2).

Sindrom Lynch. Nasljedne mutacije gena *MMR* genetska su podloga za razvitak sindroma HNPCC (od engl. *hereditary non-polyposis colon cancer*) ili Lynchovog sindroma. Najveći broj slučajeva ovog sindroma vezan je za nasljednu mutaciju gena *hMSH2* (51%) te gena *hMLH1* (33%). Svi članovi obitelji HNPCC iz-

loženi su visokom riziku da u ranoj životnoj dobi obole od zloćudnih tumora koji se javljaju u sklopu Lynchovog sindroma. Molekularna dijagnostika omogućuje rano otkrivanje osoba koje su nositelji nasljedne mutacije i njihovo uključivanje u programe praćenja (11).

MYH polipoza. MYH polipoza je autosomno recesivna nasljedna bolest, koja je prvi put opisana 2002. godine, a povezana je s povećanim rizikom obolijevanja od karcinoma debelog crijeva. U oboljelih se na sluznici debelog crijeva razvija na desetine adenomatoznih polipa, koji pokazuju veliku sklonost zloćudnoj preobrazbi. Dokazano je da su nasljedne mutacije gena *MYH*, gena za popravak DNA, i to bialelna inaktivacija ovoga gena, uzrok nastanku ovog tipa polipoze. Učestalost MYH polipoze je još i sad nepoznata i često se može zamijeniti s obiteljskom adenomatoznom polipozom (FAP), ili atenuiranim oblikom nasljedne adenomatozne polipoze (AFAP). Danas se smatra da bi čak 33% slučajeva multiplih kolorektalnih adenoma (15 do 100 adenoma) te 7,5% oboljelih s klasičnim fenotipom nasljedne adenomatozne polipoze moglo biti posljedica bialelne mutacije gena *MYH* (12).

NASLJEĐIVANJE TUMORA

Pojam nasljedni rak upotrebljava se da bi se izdvojili oni zloćudni tumori koji nastaju nasljeđivanjem mutacije od roditelja, ili oni koji nastaju zbog *de novo* mutacije nastale u spolnim stanicama roditelja. Prema današnjim spoznajama učestalost karcinoma u djece koji su posljedica naslijeđene mutacije iznosi manje od 5%. Mutacija odgovorna za nastanak zloćudnog tumora može nastati i vrlo rano u embriogenezi. Nositelji ovako nastale *de novo* mutacije nisu roditelji oboljelog djeteta ni ne može se dokazati u njegove braće i sestara, no mutacija se od oboljelog prenosi na sljedeće generacije. Retinoblastom, neurofibromatoza tip 1 te obiteljska adenomatozna polipoza su bolesti povezane s velikim brojem novih mutacija (4, 9, 10).

FARMAMOGENETIKA

Upoznavanje čovjekova genoma te usavršavanje i uvođenje u molekularnu dijagnostiku brojnih novih metoda molekularne biologije omogućilo je razvoj

novog područja molekularne, personalizirane medicine. Projekt humanog genoma omogućio je detekciju brojnih SNP polimorfizama koji se mogu primijeniti u molekularnoj dijagnostici te razvoju novih lijekova prilagođenih pojedincu. Personalizirana medicina služi se podatcima o genotipu pojedinca kako bi identificirala osobe s povećanom sklonošću obolijevanju od određenih bolesti te ih uključila u odgovarajuće programe praćenja i preventivno liječenje. Budući da je odgovor svakog pojedinca na terapiju jedinstven, potreban je i personaliziran pristup odabiru optimalne terapije. Na velik broj lijekova primijenjenih u standardnim dozama određeni broj oboljelih ne odgovori na terapiju, odgovori djelomično ili se razviju neželjene nuspojave. S pojavom novih vrlo skupih i ciljanih lijekova nameće se potreba za što preciznijim odabirom terapije, kako bi se postigao što bolji učinak liječenja uz što manje toksičnih nuspojava. Tehnološki napredak u području molekularne genetike omogućio je otvaranje novog područja nazvanog farmakogenetika, koje se bavi nasljednim razlikama u odgovoru na terapiju. Cilj farmakogenetike je na osnovi poznavanja genotipa pojedinca odabrati odgovarajuću terapiju, kako bi se postigao što bolji učinak liječenja uz što manje nepoželjnih i toksičnih nuspojava (13, 14).

Veći je broj čimbenika odgovoran za različitost farmakokinetike i farmakodinamike pojedinog lijeka u pojedinca, a čine ih etnička pripadnost, dob, funkcija jetre i bubrega, druge bolesti u pojedinca, prehrana, pušenje i konzumacija alkohola. Međutim, u velikom broju oboljelih genetski čimbenici imaju čak veći učinak od prije navedenih. Danas je poznato da varijacije u genima koji kodiraju enzime važne za metabolizam lijekova, njihovu resorpciju i eliminaciju, utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku antitumorskih lijekova (15).

Danas je poznat veliki broj naslijeđenih polimorfizama gena koji kodiraju enzime što sudjeluju u metabolizmu lijekova i sve se više zna o njihovom utjecaju na učinkovitost, odnosno toksičnost antitumorske terapije (15, 16).

Enzimi I. faze I metabolizma lijekova, posebno citokrom P450 (CYP), mogu aktivirati ili inaktivirati primijenjeni lijek. Enzimi II. faze metabolizma lijekova, kao što su uridin difosfat glukuronosil-transferaze (UGTs), obično inaktiviraju aktiv-

ni oblik lijeka ili njegovog metabolita putem konjugacije. Polimorfizmi u genima koji kodiraju ove enzime mogu, dakle, utjecati na različite farmakokinetike i farmakodinamske profile lijekova. Polimorfizmi gena za P-glikoprotein (P-gp) i druge receptore mogu utjecati na resorpciju i eliminaciju lijeka, te tako utječu na specifičnu farmakokinetiku lijeka u pojedinca. Na isti način mijenja se i osjetljivost tumorske stanice na određeni kemoterapeutik, pa i farmakodinamski profil može varirati od pojedinca do pojedinca (15).

Jedno od osnovnih načela farmakogenetike je detektirati polimorfizme povezane s toksičnim nuspojavama, što bi u konačnici trebalo rezultirati identifikacijom pojedinaca koji ne smiju primati određeni lijek, ili ga moraju primiti u dozi prilagođenoj pojedincu. Drugo načelo je detektirati biljege uz pomoć kojih se može predvidjeti učinkovitost terapije. Znači, farmakogenetsko testiranje bolesnika prije početka terapije može nam pomoći da identificiramo pacijente izložene povećanom riziku da razviju toksične nuspojave, odnosno one koji će slabo odgovoriti na terapiju (17). Očekuje se da će rezultati prospektivnih farmakogenetskih istraživanja omogućiti terapiju prilagođenu pojedincu, odnosno „individualiziranu medicinu“.

LITERATURA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. 2000;100:57-70.
2. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nature Med 2004;10:789-99.
3. Malkin D, Portwine C. The genetics of childhood cancer. Eur J Cancer 1994;30:1942-6.
4. Pritchard-Jones K. Genetics of childhood cancer. Br Med Bulletin 1996;52:704-23.
5. Thorner PS, Squire JA. Molecular genetics in the diagnosis and prognosis of solid pediatric tumors. Ped Develop Pathol 1998;1:337-65.
6. Shannon K. Genetic predisposition and childhood cancer. Environ Health Perspect 1998;106:801-6.
7. Knudson AG. Cancer genetics. Am J Med Genet 2002;111:96-102.
8. Birch JM. Li-Fraumeni syndrome. Eur J Cancer 1994;30:1942-6.
9. Miyaki M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita, R, Muraoka M, Konishi M. Familial polyposis: recent advances. Crit Rev Oncol/Hematol 1995;19:1-31.
10. Von Deimling A, Krone W, Menon AG. Neurofibromatosis type 1: pathology, clinical features and molecular genetics. Brain Pathol 1995;5:153-62.
11. Lynch HT, Lynch J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling and prevention. J Clin Oncol 2000;18:19-31.
12. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RKS, Bisgaard M-L, Orntoft

TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJW, Tomlinson IPM. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. N Engl J Med 2003;348:791-9.

13. Nagasubramanian R, Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenetics in cancer treatment. Annu Rev Med 2003;54:437-52.

14. Weinshilboum R, Wang L. Pharmacogenomics: bench to bedside. Nature Reviews 2004;3:739-48.

15. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. Clin Pharmacokinet 2006;45:253-85.

16. Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. Br J Cancer 2004;90:747-51.

17. de Jonge ME, Huteima AD, Schellens JH. Individualised cancer chemotherapy: strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaption: a review. Clin Pharmacokinet 2005;44:147-73.

Summary

MOLECULAR GENETICS AND PHARMACOGENETICS IN PEDIATRIC ONCOLOGY

S. Kapitanović

Cancer is defined as an uncontrolled proliferation of cells that results in the transformation of a normal cell into a cancer cell. Progress in molecular genetics has led to our understanding of cancer as a genetic disease. Cancer is the result of many genetic changes in oncogenes, tumor-suppressor genes and MMR genes that lead to the development of a primary tumor from a previously normal cell and then to the growth, progression, and spread of this tumor to distant parts of the body (metastasis).

With the complete sequence of the human genome available, individualized medicine may soon become reality. Most patients show large interindividual variability in drug response. For chemotherapeutics given at standard doses, a substantial proportion of patients do not respond, respond only partially, or experience adverse drug reactions. Pharmacogenetics deals with inherited differences in the response to drugs. A major limitation that moderates the use of pharmacogenetic testing in the clinical setting is the lack of prospective clinical trials demonstrating that such testing can improve the benefit/risk ratio of drug therapy. Pharmacogenetic profiles database establishment is important for future research studies in the field of pharmacogenetics of childhood malignancies.

Descriptors: NEOPLASMS – diagnosis, genetics; CYTOGENETICS – methods; CYTOGENETIC ANALYSIS – methods

Primljeno/Received: 9. 10. 2009.

Prihvaćeno/Accepted: 9. 11. 2009.