

**Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Program 1. Főirány: Életminőség javítása**

***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium  
a daganatos halálozás csökkentésére***

**1/48/2001**

**Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.**

**RP.1. Molekuláris epidemiológiai kutatások**

**Dr. Oláh Edit**

**Országos Onkológiai Intézet**

## **RP1. Molekuláris Epidemiológiai Kutatások**

### **A./ Az emlő-/petefészekrák iránti genetikai fogékonyságot fokozó, örökölt génkárosodások spektrumának meghatározása, a mutációk jellemzése**

**Témavezető: dr Oláh Edit, Országos Onkológiai Intézet**

- 1. Az emlő-/petefészekrák iránti genetikai fogékonyságot fokozó, örökölt génkárosodások spektrumának meghatározása, a mutációk jellemzése**
  - 1.1. Csírasejtes BRCA1/BRCA2 mutációk meghatározása családirag halmozódó daganatokban, szelektált daganatcsoportokban és rákmegelőző állapotokban
- 2. Az örökletes emlő- és petefészekrákra hajlamosító új gén(ek), génváltozások megismerése**
  - 2.1. A 13q21 kromoszómaregió genotipizálása BRCA1/BRCA2-negatív családokban, azzal a céllal, hogy felmérjük a lókuszt szerepét 10 hazai nagykockázatú emlőrákos család vizsgálatával.
  - 2.2. Nagy genomialis átrendeződések azonosítása nagykockázatú BRCA-negatív családokban
  - 2.3. BRCA1/2 negatív családok DNS mintáinak további elemzése a Nemzetközi Emlőrák Konzorcium kijelölt központjában.
- 3. Az emlőrákkockázatot módosító gének tanulmányozása**
- 4. Az örökletes rákhajlamot közvetítő, a sejtproliferációt és a genom épségét szabályozó gének expressziójának, azok zavarainak meghatározása**
  - 4.1. A BRCA1 gén expressziójának vizsgálata.  
Megvizsgáljuk hipotézisünk (Orbán és Oláh, TIG, 2001) helyességét, hogy a BRCA1 gén mRNS-ének adott szakasza valóban szerepet játszik-e az alternatív splicing szabályozásában. Ennek kapcsán a feltételezett szabályozó elemek vizsgálnánk az adott régióban leírt, illetve in vitro mutagenézissel létrehozott mutációk tesztelésével.
  - 4.2. A génextpresszió szabályozása és az alternatív splicing szerepének meghatározása más rákra hajlamosító génekre (BRCA2, stb.)  
A BRCA1 mintájára tervezzük más gének eddig nem ismert mRNS-izomformáinak azonosítását, illetve az azonosított variánsok relatív expressziójának vizsgálatát normális és tumoros szövetekben és sejttényeszetekben
  - 4.3. A sejtproliferáció kulcsfontosságú molekuláris célpontjainak azonosítására tervezzük a daganatellenes szerek hatására bekövetkező, a sejtszaporodást meghatározó onkogén és tumorszuppresszor gén expressziók változásainak meghatározását (cDNS-chip vizsgálatok).
  - 4.4. Génextpressziós profilok eltéréseinek vizsgálata kisszámú BRCA1/2 mutáció hordozó és nem hordozó beteg tumorában *cDNS-chip* felhasználásával.
- 5. Szomatikus génkárosodások feltárása emlő-/petefészekrák szindrómák tumoraiban**
- 6. Genetikai epidemiológiai vizsgálatok**
  - 1.1. Emlőrákos populációk szűrése a magyar és kelet-közép európai familiáris megbetegedésekre jellemző mutációk és polimorfizmusok szerepének meghatározására
  - 1.2. Az BCLC kérdőíveken szereplő genetikai adatok, kockázati tényezők és klinikai adatok továbbítása a Nemzetközi Emlőrák Konzorcium kijelölt adatbázisába.

Az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztálya 1986-ban történt megalakulása óta a daganatképződés hátterében álló molekuláris genetikai károsodások feltárásával foglalkozik. A rákra (elsősorban női és férfi emlőrákra) hajlamosító gének kutatása, az így nyert tudományos ismeretek klinikai hasznosítása a munkacsoport kiemelt tevékenysége. A pályázat támogatásával folytattuk azon vizsgálatokat, amelyek célja 1) a rákra hajlamosító gének működésének megértése 2) az örökletes megbetegedéseket okozó genetikai hibák (mutációk) feltárása, 3) ezen mutációk következtében kialakult hazai daganatos megbetegedések arányának meghatározása az összes daganatos megbetegedésen belül, 4) annak felmérése, hogy az öröklött hajlamosító mutációt hordozó egészséges személyek mekkora kockázatban vannak a daganatos megbetegedésekre nézve, és 5) új hajlamosító gének felfedezése (nemzetközi együttműködésben folytatott kutatás).

A kutatási eredményeket az öröklött rákhajlam (egyéni rákkockázat) pontos meghatározását lehetővé tevő *genetikai tesztek* kifejlesztésére használjuk.

A pályázati téma aktualitását mutatja, hogy az *EU FP6* ez évi kiemelt témája a “Prevention of cancer in high risk populations” (LSH-2004-2.2.0-4), amelyben két elbírálás alatt lévő pályázattal veszünk részt.

A jelen pályázati támogatással valamennyi célterületen új tudományos ismeretek születtek, amelyeket vezető nemzetközi szakfolyóiratokban publikáltunk.

## EREDMÉNYEK:

Folytatódott a célkitűzések megvalósítását biztosító *szövet- illetve DNS bank* fejlesztése. A beszámolási időszakban a DNS bankunk 520 daganatos család/személy vér- és szövetmintáiból nyert új DNS mintával, illetve újabb 900 anonim gyűjtött populációs kontroll mintával gyarapodott.

A rák iránti **genetikai fogékonyság** legjobban daganatos családokban tanulmányozható. Munkánk jelentős részét teszi ki az emlőrák és egyéb daganatos megbetegedés iránti genetikai fogékonyságot fokozó **öröklött génkárosodások (mutációk)** megismerése.

**1. A *BRCA1* és *BRCA2* gének öröklött mutációi nagy kockázatot jelentenek emlőrák szindrómák kialakulására.** A mutációk és egyéb DNS szekvencia-változások azonosítása, a génfunkcióra gyakorolt hatásuk meghatározása nélkülözhetetlen a daganatok eredetének és természetének megértéséhez. Kutatásainkban a legérzékenyebb módszereket alkalmaztuk a DNS-szekvenciaváltozások elemzésére, és számos új módszert vezettünk be a hagyományos módszerekkel nem kimutatható nagy deléciók és átrendeződések azonosítására.

A vizsgálatok kezdete óta közel 400 daganatos családban azonosítottunk *BRCA1*, *BRCA2* és egyéb hajlamosító génmutációt. 34 különböző *BRCA1* és 2 mutációt írtunk le, amelyek többsége ún. alapító (közös ősökre visszavezethető, több családban előforduló) DNS-szekvenciaváltozás. Számos új mutációt azonosítottunk, amelyek közül egy *BRCA2* mutáció kizárólag magyar származásúakban fordul elő.

Igazoltuk, hogy minden huszadik női emlőrák, minden kilencedik petefészekrák és minden negyedik férfi emlőrák Magyarországon a *BRCA* gének öröklött meghibásodásával kapcsolatos. A népesség szintjén a *BRCA* mutációk nagyon ritkán (0,3 %-ban) fordulnak elő, ezért sem indokolt a populáció szintjén végzett molekuláris szűrés.

A daganatos családok kóroki mutációinak megismerése jó alapul szolgált a kutatási program további célkitűzéseinek megvalósításához.

**2. Folytattuk azon nemzetközi együttműködésben végzett kutatásainkat, amelyek célja olyan új gének/génváltozások azonosítása, amelyek kóroki szerepűek az emlőrák/petefészekrák és egyéb gyakori daganat (pl. hererák) kialakulásában.**

3. A DNS szintű változások megismerése mellett szükséges a génműködés RNS-szinten jelentkező zavarainak tanulmányozása. A BRCA1 és BRCA2 gének esetében különösen indokolt ennek kutatása, mivel a genom épségét szabályozó BRCA gének szomatikus mutációi rendkívül ritkák. Ezért kezdtük meg a genom épségét szabályozó **gének expressziójának**, és azok zavarainak vizsgálatát.

Azt kívántuk tisztázni, hogy csírasejtes és szomatikus mutációk hiányában a BRCA1 gén milyen molekuláris mechanizmusok révén vesz részt az emlőtumorok jelentős hányadát adó sporadikus daganatok kialakulásában. Sejtvonalakon végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a génről az alternatív illesztés (*splicing*) mechanizmusával képződő RNS izoformák szövetspecifikus eloszlási mintázata, illetve ennek megváltozása esetleg szerepet játszhat a malignus transzformációban. Emlőrákos betegek tumor, illetve leukocita mintáin végzett vizsgálataink igazolták a szabályozás szövetspecifikus voltát, de nem tudtuk egyértelműen összefüggésbe hozni az expressziós szintek változását a tumorképződéssel. A BRCA1 RNS formák eloszlása nagy változatosságot mutatott, amely a tumorok közötti különbségek mellett a szövet-specifikus génextpressziós eltérésekből is adódhatott. További vizsgálataink a gyakori BRCA1 izoformák funkciójának a megértését célozzák. Ennek kapcsán RNS interferencia (RNSi) módszerrel tervezzük az adott variánsok vizsgálatát. Ezen eredmények birtokában talán közelebb kerülünk annak a paradoxonnak a feloldásához, hogy egy ilyen, általános sejtelettani funkciókkal rendelkező gén örökletes hibája miért vezet szövetspecifikus daganatképződéshez, elsősorban az emlőben és a petefészekben.

*Génextpressziós profil* vizsgálatokat végeztünk. A sejtszaporodást meghatározó onkogének és tumorszuppresszorgének kölcsönhatásait, a daganatgátlás kulcsfontosságú molekuláris célpontjait 41 ezer gént, illetve génterméket tartalmazó **cdNS-array** (Agilent) felhasználásával tanulmányoztuk daganatsejt-tenyészetekben. A sejteket antimetabolittal (Ribavirin) és természetes előfordulású daganatellenes szerrel (IP6) kezeltük. Több, a daganatképződés szempontjából meghatározó szignálút eltéréseit, és a daganatgátlás kulcsfontosságú molekuláris célpontjait azonosítottuk.

4. A genetikai és nem genetikai kockázati tényezők feltárása céljából komplex **genetikai epidemiológiai** kóroki elemzést végeztünk 700 emlőrákos beteg esetében.

80 BRCA mutációt hordozó személy anonimizált adatait továbbítottuk az Európai Unió "Európa a Rák Ellen" programjában elfogadott projekt koordináló intézetébe (WHO Nemzetközi Rákkutató Intézet, Lyon), ahol megtörtént – a többi európai genetikai központból megküldött anyaggal együtt – az adatok statisztikai elemzése, majd az eredmények közös publikálása.

5. A jelen pályázat támogatásával folytathattuk azon nemzetközi együttműködéseinket is, amelyek a **BRCA mutációt hordozók kockázatát** mérik fel emlőrákos és egyéb daganatos megbetegedésre. (A világ vezető rákgenetikai centrumaival, Nemzetközi Konzorciumok keretében fennálló együttműködés.) A munkacsoportunk által analizált 38 BRCA család daganatos beteg adatait is tartalmazó közleményeink az eddig közölt legfontosabb kockázati értékeket tartalmazzák.

### **Referált folyóirat cikkek:**

**Orbán, T.I., Oláh, E.:** *Purifying selection on silent sites – a constraint from splicing regulation?* TRENDS GENET 17: 252-253, 2001 IF: 12.417

Thompson, D., Szabo, C.I., Mangion, J., Oldenburg, R.A., Odefrey, F., Seal, S., Barfoot, R., Kroeze-Jansema, K., Teare, D., Rahman, N., Renard, H., KconFab Consortium, Mann, G., Hopper, J.L., Buys, S., Andrulis, I.A., Senie, R., Daly, M.B., West, D., Ostrander, E.A., Offit, K., Peretz, T., Osorio, A., Benitez, J., Nathanson, K.L., Sinilnikova, O.M., **Oláh, E.**, et al.: *Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium.* P NATL ACAD SCI USA. 99:2 827-831, 2002 IF: 10.700

Thompson D., Easton D. F., The Breast Cancer Linkage Consortium (McGuffog, L.M., Weber, B, Gad, S., Stoppa-Lyonnet, D., Korn, V., Kroiss, R., Langbauer, G., Muhr, D., Wagner, T, Goldgar, D., Lenoir, G., Lynch, H.T., Narod, S., Sinilnikova, O., Gayther, S., Ponder, B., Taylor, A., Klijn, J.G.M., Meijers-Heijhoer, H., **Oláh E.**, et al.: *Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers.* J NATL CANCER INST 94: 1358-1365., 2002 IF: 14.500

Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., **Oláh, E.**, et al. : *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history, a combined analysis of 22 studies.* AM J HUM GENET 72(5) 1117-1130, 2003 IF.10.649

Weber G., Shen F., **Orban T. I., Kökény Sz., Oláh E.**: *Targeting signal transduction.* ADV ENZYME REGULAT 43: 47-56, 2003. IF2002: 2.548

**Orbán T. I., Oláh E.**: *Emerging roles of BRCA1 alternative splicing.* J CLIN PATHOL: MOL PATHOL – Review 56: 191-197, 2003. IF2002: 2.549

Looijenga L.H.J, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp R, Stoop H, Gillis AJ, de Gouveia de Brazoa CA, Weber RFA, van Dijk T, von Lindren M, Geczi L, **Oláh E.**, Nesland JM, Fossa SD, Oosthuis JW: *Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ cell tumors.* CANCER RES 63: 7674-7678, 2003. IF:8.318

E.A. Rapley, S. Hockley, W. Warren, L. Johnson, R. Huddart, G. Crockford, D. Forman, M.G. Leahy, D.T. Oliver, K. Tucker, M. Friedlander Hogg, M.A.S. Jewett, R. Lohynska, G. Dugaard, S. Richard, A. Heidenreich, I. Geczi, I. Bodrogi, **E. Oláh**, et al.: *Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours –* BR J CANC (90), 2397-2401, 2004 IF<sub>2003</sub> 3.894

A.C. Antoniou, P.D.P. Pharoah, S. Narod, H.A. Risch, J.E. Eyfjord, J.L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D.M. Eccles, N. Tang, **E. Oláh**, et al.: *Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies –* J MED GENET, (közlés alatt - 2005)

SR. Lakhani , JS. Reis-Filho, L. Fulford, F. Penault-Llorca, M. van der Vijver, S. Parry, T. Bishop, J. Benitez, C. Rivas, YJ. Bignon, J. Chang-Claude, U. Haumann, CJ. Cormelisse, P. Devilee, M. Beckmann, C. Nestle-Krämling, PA. Daly, N. Haites, J. Varley, F. Lalloo, G. Evans, C. Maugard, M. Fiche, H. Meijers-Heijboer, JGM. Klijn, **E. Oláh**, et al.: *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and “basal’ phenotype. -* CLINICAL CANCER RES (közlésre beküldve 2004)

**Oláh E**, Papp J, Kökény Sz, Orban T, van der Looij M, Limon J, Csókay B, Wysocka B, Brozek I, Tihomirova L, Foretova L, Raicevic L, Özdog H, Özccelik H, Yannoukakos D, Szabó É, Gődény M, Köves I, Horti J, King MC, : Breast cancer predisposing alleles in Central and Eastern Europe – (kézirat 2004)

Orbán T. I., Kökény Sz, **Oláh E.**: *Heterogeneity and tissue specificity of BRCA1 transcription and alternative splicing in breast tissue and leukocyte samples of breast cancer patients* (kézirat 2004).

**Kökény Sz., Orbán T. I., Oláh E.**: *Mechanisms in the antiproliferative action of Ribavirin.* (kézirat 2004).

### **Absztraktok:**

**Orbán, T., Oláh, E.**: Expression profiles of predominant BRCA1 splice variants in normal breast, breast tumors and leukocytes of breast cancer patients. PROC AMER ASSOC CANCER RES 44:1149, 2003. **Az Amerikai Rákkutató Társaság (AACR) és az Avon Foundation Scholar-in-Training díját elnyert absztrakt** (AACR 94. kongresszusa, Washington, 2003. július).

**Kökény Sz., Orbán T. I., Oláh E.**: A ribavirin antiproliferatív hatásának mechanizmusai Mechanisms in the antiproliferative action of Ribavirin. MAGYAR ONKOLÓGIA, 47(3): 277, 2003