

# **Az urotheliális hólyagdaganat molekulár-genetikai vizsgálata**

**Doktori értekezés (Ph.D.) tézisei**

**Dr. Beöthe Tamás**

Doktori iskola vezetője: Komoly Sámuel, MD, PhD, DSc  
Programvezető: Miseta Attila, MD, PhD, DSc  
Témavezetők: Kovács Gyula, MD, PhD, DSc, FRCPath  
Farkas László, MD, PhD

**Urológiai Klinika  
Pécsi Tudományegyetem**

**2012**

# BEVEZETÉS

## A hólyagdaganat epidemiológiája

A hólyagdaganat a 7. leggyakoribb malignoma, az összes tumor mintegy 3%-a. Összefoglaló néven a húgyhólyagot bélelő epithéliumról eredő összes daganatot – szövettani típustól függetlenül – hólyagdaganatnak nevezzük. Ezek között a leggyakoribb a tranzicionális (átmeneti sejt) vagy más néven urotheliális daganat. A hólyag daganatainak 90%-a urotheliális karcinóma (UC).

Az 1973-ban megjelent WHO (World Health Organization) klasszifikáció papillomát és 3 különböző grádusú daganatot különböztet meg: jól/közepesen/rosszul differenciált UC-t. Az International Society of Urological Pathology (ISUP) 1998-ban a nem invazív UC-k új beosztását javasolta. A vizsgálatok legnagyobb része az 1973-ban megjelent WHO beosztást veszi alapul. Az urológiai irányelvek szerint bármelyik klasszifikáció alkalmazható. A dolgozatban szereplő minták az 1973-as WHO klasszifikáció alapján kerültek besorolásra.

A daganatok kiterjedésének leírására a Tumor, Nyirokcsomó, Metasztázis (TNM) klasszifikációt alkalmazzuk. A hetedik kiadás 2010-ben jelent meg, de hólyagdaganatok tekintetében ez nem jelent lényeges változást a korábbi, 2002-ben megjelent kiadáshoz képest.

## A TNM és a „klinikai” klasszifikáció ellentmondásai

Klinikai szempontból a daganatokat nem izominvazív (pTa és pT1) és izominvazív (pT2-pT4) csoportba oszthatjuk. Biológiai szempontból ugyanakkor a pTa stádiumú daganatokat (mely a legnagyobb csoport) „jóindulatú” daganatoknak is tekinthetnénk, melyek csupán ritkán progrediálnak invazivitás felé. A pT1 és pT2-4 stádiumú daganatok a tumor-progresszió különböző stádiumainak felelnek meg, tehát a pT1 és pT2-4 stádiumú hólyagdaganatok közötti különbség elsősorban a klinikai felismerés időpontjában rejlik. A nem izominvazív és izominvazív elnevezések klinikai, és nem biológiai definíciók.

Az urológus szempontjából elsősorban a terápiás lehetőségek a meghatározóak, ezért ezek alapján osztjuk a daganatokat nem izominvazív és izominvazív csoportba. Mivel a nem izominvazív (pTa és pT1) daganatok a hólyagnyálkahártya felszínén helyezkednek el, endoszkópos módszerekkel könnyen eltávolíthatóak. Ezek a daganatok ugyanakkor gyakran recidiválnak, és ezért a betegek szigorú utánkövetése feltétlenül szükséges. A pTa stádiumú daganatok többszörös kiújulás után invazív pT1, G3 daganatok irányába progrediálhatnak, míg a recidiváló pT1, G3 daganatok majdnem mind invazívak. Izominvazív tumorok már nem gyógyíthatóak meg csupán endoszkópos módszerekkel. Ezekben az esetekben, még ha a daganat szervre lokalizált is, radikális műtét, sugárkezelés vagy kemoterápia szükséges.

Felismeréskor az UC lehet szoliter elváltozás, vagy multifokális daganat. Az ún. aszinkron multiplicitás (vagyis a gyakori recidíva) a papilláris daganat jellemző biológiai tulajdonsága. Amennyiben recidíva jelentkezik, a későbbi kiújulás esélye 78%-ig emelkedhet. Genetikai vizsgálatok igazolták, hogy mind a szinkron, mind az aszinkron multiplex daganatok monoklonális eredetűek, mely megfelel a levált daganatos hámsejtek intravesicális implantációjának („homing” mechanizmus). A ritkán előforduló poliklonális daganatok valószínűleg környezeti mutagenézis következményei (ún. „field effect”).

## Az UC genetikája

Számos vizsgálat történt, hogy UC-ra jellemző, biológiailag fontos genetikai eltéréseket azonosítsanak. Ezen eltérések közé tartoznak a csak egyes tumortípusokra jellemző genetikai hibák, a prognosztikai markerek és a terápiában is felhasználható elváltozások („targetek”).

UC-ban a leggyakoribb genetikai eltérés a 9. kromoszóma elvesztése. A kromoszóma teljes hosszában, minden génre kiterjedő allélvesztésére utal, ha minden vizsgált szakaszon

monoszómiát vagy a heterozigotizáció elvesztését (LOH) találjuk; ez az esetek 40%-ában látható. A fennmaradó esetekben további genetikai elváltozások (részleges deléciók) észlelhetők a 9. kromoszóma különböző részein. Rövid régiókat érintő, jellemző elváltozások segítségével sikerült azonosítani a CDKN2A/B, PTCH, DBC1 és TSC1 géneket. Nem ismert, hogy ezen gének elvesztése azonos gyakorisággal fordul-e elő a papilláris (pTa) és az invazívan növekedő (pT1-4) daganatoknál; vagy pedig ezen gének hiánya különböző daganat alcsoportokat jellemez.

A 8p kromoszómán – citogenetikai, CGH és DNS vizsgálatok is – különböző gyakorisággal ismétlődő hibákat mutattak. Majdnem minden vizsgálat összefüggést látott a 8p kromoszómán talált eltérések és a tumor progresszió között. További vizsgálatok szoros összefüggést igazoltak a 8p22 régióban észlelt LOH és a tumor grádus/metasztatikus növekedési képesség között. A feltételezett szuppresszor géneket a 8p21.1-pter és 8p21-q11.2 régiókra lokalizálták. Muschek és mtsai. egy gyakran deletálódó, rövid régiót határoltak körül, mely a CSMD1 gént is tartalmazza. In situ fluoreszcens hibridizáció (FISH) és mátrix-CGH vizsgálat is a 8p12 régió (mely az FGFR1 gént is tartalmazza) magas amplifikációját mutatta néhány UC esetében. Úgy tűnik, hogy a 8p kromoszóma több régiója olyan géneket tartalmaz, melyek szerepet játszanak az UC fejlődésében, fenntartásában ill. progressziójában.

CGH-analízis és deléciós mapping vizsgálatok különböző 11p kromoszóma régiók elvesztését igazolták, valamint az amplifikáció elvesztését a 11q13 régióban. Az érdeklődésre számot tartó területet alléltípusanalízissel határozták meg: a rövid kar D11S902 és D11S569, valamint a hosszú kar FGF3 gén és D11S490 lokusza közötti területeken. Összefüggést láttak a D11S490 és D11S928 lokuszokon előforduló LOH és gyakori recidívák jelentkezése között. Habár a 11q12-13 régió amplifikációját/alléltípusát is megfigyelték, nem találtak összefüggést a CCND1, FGF3, FGF4 és EMS1 gének ill. a daganatok stádiuma/grádusa között.

Számos más kromoszómális terület elváltozását is leírták, melyeket többnyire a daganatprogresszióval kötöttek össze. Ugyanakkor nem tudjuk, hogy a szekunder génelváltozások más, ezen területet érintő génelváltozások (pl. mutáció, metiláció vagy haploinsufficiencia) következményei; avagy egyszerűen csak a daganatos genom instabilitása miatt alakulnak ki.

### **UC progressziójának feltételezett molekuláris útvonalai**

Szöveti minták és genetikai vizsgálatok alapján több (különböző kromoszómális régiókat és géneket érintő) útvonalat feltételeztek, melyeken az UC fejlődése a displáziás urotheliumtól a malignus daganat felé halad. A legegyszerűbb modellek egyike felveti, hogy a papilláris daganat kialakulása a 9. kromoszómán jelentkező LOH-val függ össze, melyet a p53 gén mutációja követ, és ezzel kialakul az invazív daganat. Ugyanakkor a lapos daganatok (pl. a CIS) kialakulása a p53 mutációjával kezdődik. Újabban hasonló útvonalak lehetőségét vetették fel, egyik esetben a hiperpláziától a papilláris daganatig, melyet 60%-ban FGFR3 mutáció jelez. Egy másik feltételezett útvonalon a displázia, CIS, pT1+CIS és pT2 izominvazív daganatok szerepelnek, a daganatok 70%-ában a TP53 gén mutációjával/deléciójával. Habár számos vizsgálat nem csak nem invazív papilláris, hanem szolid, invazív UC esetében is mutatott LOH-t a 9. kromoszómán, továbbra sem tisztázott, hogy a 9. kromoszóma CDKN2A/B, PTCH, DBC1 és TSC1 géneket érintő elváltozásai az UC minden típusára jellemző „primér” genetikai elváltozások, vagy csak a papilláris daganat jellemzői.

### **A multiplex UC eredete: monoklonális vagy ún. mező-hatás (field effect) teória**

A szinkron és aszinkron multiplex UC-k eredete sokáig ellentmondásos volt. A „mező hatás” („field effect”) teória kimondta, hogy egy diffúz karcinogén hatás a hólyagban számos, genetikailag különböző daganat megjelenéséhez vezet. Mások ugyanakkor a multiplex UC-k klonális eredete mellett foglaltak állást. A választ a multiplex UC-k genetikai vizsgálata adta meg: a mikroszatellita vizsgálatok (melyek biztonságosan elkülönítik a szülői alléleket) ugyanazon szülői allélok elvesztését igazolták a különböző kromoszómális területeken. Ezek a vizsgálatok igazolták,

hogy a hólyag szinkron és aszinkron multiplex daganatok – ritka kivételtől eltekintve – monoklonális eredetűek. Így ezekben az esetekben a lokális, intravezikális metasztázis vezet a hólyagnyálkahártya felszínén megjelenő multiplex tumoros góckhoz. Néhány esetben azonban genetikailag különböző daganatok megjelenését észleljük, vagyis poliklonális daganatok fordulnak elő. Ez a „mező-effektus” elképzelést támasztja alá – legalábbis ezekben a kivételes esetekben.

A szinkron vagy aszinkron megjelenés, különösen az utóbbi a nem invazív daganatok jellemző biológiai tulajdonsága. Az ilyen esetekben észlelt 70% körüli recidíva-arány alátámasztja ezt a hipotézist. Ugyanakkor nem zárhatunk ki egy hasonló biológiai jellemzőt a magas grádusú, invazív (pT2-4) daganatok esetében sem. Ezt azonban nagyon nehéz bizonyítani, mivel ezen daganatok legtöbbször radikális műtéttel eltávolításra kerül. Mégis nagyon fontos lenne elkülöníteni azokat a daganatokat, melyek az intravezikális szórás ill. a „homing” képességével rendelkeznek azoktól, melyek nem adnak lokálisan sem metasztázist, és szoliterek maradnak. Hogy a multiplex tumorok miért jelennek meg egyes esetekben szinkron, más esetekben pedig aszinkron módon, még nem ismert.

### **Célkitűzések**

Vizsgálatainkban az UC specifikus molekuláris jellemzőit kerestük, különös tekintettel a következőkre:

- a 8p, 9, 11p és 17p régiók olyan – kisméretű – DNS elváltozásait kerestük, melyek az UC kialakulásával és progressziójával mutatnak összefüggést,
- olyan specifikus genetikai eltéréseket kerestünk, melyekkel a szoliter ill. szinkron és metakron multiplex UC-eket azonosítani tudjuk,
- valamint a fellelt genetikai elváltozások UC fejlődésében és progressziójában betöltött szerepét kívántuk megismerni.

## **ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **Szövetminták és klinikai adatok**

A daganatos minták gyűjtésében a marburgi Philipps Egyetem, a Mannheimi Egyetemi Egészségügyi Központ, a heidelbergi Karls Ruprecht Egyetem és Pécsi Tudományegyetem Urológiai Klinikái vettek részt. Mind a transzurethrális reszekció mind a radikális cisztektómia anyagai felhasználásra kerültek. Az eltávolított anyagok kisebb részét azonnal folyékony nitrogénben (–80°C) fagyasztottuk, a fennmaradó nagyobb mennyiséget az intézetekhez tartozó patológiai osztályok rutin szövettani vizsgálaton feldolgozták. A hematoxin-eozin festett szövettani metszeteket két patológus ismételtel kiértékelte (Prof. Kovács Gyula, és Prof. Antonio Lopez-Beltran). Szoliter daganatként értékeltük azokat az eseteket, melyekben a korábbi anamnézis negatív volt, és nem jelentkezett recidíva három éves utánkövetés alatt. Azokat az eseteket, melyekben a mintavételi műtét előtt vagy után szövettanilag igazolt UC került eltávolításra aszinkron multiplex daganatok közé soroltuk. Szinkron multiplex daganatok esetében legalább két daganatos terület került felismerésre az első észlelés során. Minden szövettanilag igazolt urotheliális daganatot vizsgáltunk, akár szolid, akár papilláris növekedést mutatott.

### **Laboratóriumi módszerek**

A tumoros sejteket a technikában gyakorlott patológus (Prof. Kovács Gyula) választotta el a stromális szövetektől. A DNS és RNS izolálása standard technikákkal történt. A tumorok jellemzése mikroszatellita allelotipizálással, nagy feloldású oligoarray-CGH-val, szekvenálással és metiláció specifikus PCR-ral, valamint egyes gének kifejeződése kvantitatív RT-PCR-ral standard laboratóriumi eljárások szerint történt. A technikák részletes leírása meghaladja ezen összefoglaló kereteit.

# EREDMÉNYEK

## A 8p kromoszóma genetikai vizsgálata

Összesen 122 hólyagdaganatos mintát vizsgáltunk, 34 mikroszatellita lókuszt a 8p, és további 3 lókuszt a 8q karon. Egy vagy több allél érintő változásokat (szignál csökkenése vagy hiánya) 58 esetben (48%) találtunk. A centromér közelében egy ún. „breakpoint cluster” (töréspont) helyezkedik el, mely 23 (19%) esetben a teljes 8p kar elvesztését okozta. A 8p különböző szakaszait érintő részleges deléciókat 35 (29%) esetben észleltünk. A 8q karon néhány esetben ugyan megfigyelhettük LOH előfordulását, de többnyire az ún. „allelic imbalance” jelenséget láttuk, mely a 8p kar elvesztésére és 8q szekvenciák duplikálódására utalhat.

### *Allél-változásokat tartalmazó rövid kromoszomális régiók azonosítása*

A 8p kromoszóma részletes mikroszatellita vizsgálata 5 rövid, nem szitenikus régióban mutatott allél eltéréseket; ezek feltételezett tumor-génekre utalhatnak. Az allélhibák egyike a 8p23 régióban a D8S504 lókuszon helyezkedik el, mely az ARHGEF10 gént tartalmazza. Csak az ARHGEF10 gént tartalmazó rövid szakaszt érintő elváltozás 3 esetben volt kimutatható. Ha azonban figyelembe vesszük az ezen régiót is érintő hosszú deléciókat is, akkor az ARHGEF10 gén 48 (39%) esetben hiányzik. A CSMD1 gén körül elhelyezkedő 2 Mb hosszú szekvencia 8 mikroszatellita régiót tartalmaz. Csak a CSMD1 génen belüli vagy csak a teljes gént érintő allél-változások 6 (5%) esetben fordultak elő. Összesen azonban a CSMD1 gén egyik allélja 57 (47%) esetben hiányzott. Egy másik feltételezett tumor-gén lókuszt, a 8p12 régióba a D8S1477 és D8S1758 lókuszt közé, egy 140 kb hosszú területre esett. Ez a terület a D8S375 és D8S278 lókusztokat is tartalmazza, melyek az NRG1 gén intronjai közé esnek. Egy UC kizárólag ezen a területen mutatott LOH-t, megtörve az NRG1 gén egyik alléljének integritását. Egy másik, mintegy 2.3 Mb hosszú terület a D8S1821 és D8S1104 lókusztok között helyezkedik el. A Wolf-Hirschhorn szindróma feltételezett génje, a LOC441345 fehérje, a transzmembrán protein 2-t (LETM2) tartalmazó „leucine-zipper-EF-hand” és az FGFR1 gén is ezen a területen helyezkedik el. Az utolsó, D8S1023 és D8S268 közötti mintegy 500 kb hosszú terület az SFRP1 és a FLJ13842 protein génjét tartalmazza.

### *A 8p karon jelentkező allél elváltozások összefüggést mutatnak a tumor grádusával*

Erős összefüggés volt megfigyelhető a 8p régiókon bekövetkezett LOH és a grádus között, függetlenül a tumor stádiumától. A G1 daganatok között kettő AI-t mutatott a 8p karon, egy másik AI-t a CSMD1 gének, míg egy további LOH-t az ARHGEF10 gének megfelelően. Így a 34 G1 UC közül csak 4 (12%) – melyek mindegyike a pTa stádiumba tartozott –, míg a G2 tumorok 41%-a, a G3 tumorok 71%-a mutatott allélikus változásokat a 8p régióban.

### *A 8p karon jelentkező allél elváltozások összefüggést mutatnak a tumor stádiumával*

Az UC stádiumának emelkedésével együtt az allélváltozások gyakorisága is emelkedett. Érdekes, hogy éles különbség látható az invazív és nem invazív daganatok között (függetlenül az invazivitás mélységétől). A nem invazív, papilláris daganatok csupán 21%-a, míg a nem izominvazív pT1 daganatok 71%-a és az izominvazív pT2-4 daganatok 73%-a mutatott allél eltérést a 8p karon. Ezek az eredmények megfelelnek annak, hogy invazív daganatokban nagyobb a magasabb grádus (G2 és G3) aránya.

### *UC-ban az NRG1 és SFRP1 gének down-reguláltak*

Mivel az NRG1, FGFR1 és SFRP1 rövid, intersticiális deléciók célpontjai voltak, expressziójukat egy 28 UC-t (pTa, pT1 és pT2-4 stádiumot, valamint egy diszpláziát) és 8 kontrollt tartalmazó panelen vizsgáltuk kvantitatív RT-PCR technikával. Az FGFR1 mind az egészséges, mind a tumoros sejtekben változó expressziót mutatott. Nem találtunk összefüggést az FGFR1 expressziós profilja és stádium/grádus között, az FGFR1 szerepe az UC progressziójában – legalábbis a LOH és haploinsufficiencia mechanizmusával – kizárható. Az NRG1 magas expressziót mutatott a kontroll

mintákban, miközben az összes daganatos mintában (és a diszplasztikusban is) az expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt, vagy hiányzott. Hasonló módon expresszáldott az SFRP1 az összes egészséges mintában, de egy kivétellel down-regulált volt a daganatos mintákban.

### ***UC-ban az SFRP1 gyakran metilált, LOH-val együtt, vagy anélkül***

Az SFRP1 génen megvizsgáltuk az 5'UTR régió és az 1. exon CpG szigeteinek metilációját. Legalább gyenge metiláció minden daganatos mintán megfigyelhető volt, a 19 esetből 11 alkalommal kifejezett metilációt észleltünk. Egyáltalán nem találtunk metiláció nélküli DNS szekvenciát 5 daganatos esetben. Metiláció nélküli szekvenciákat tartalmazott az összes kontroll minta, és a legtöbb daganatos minta is. LOH adatok 12 daganatos minta esetében álltak rendelkezésre: LOH vagy AI 4 esetben volt kimutatható azon 7 eset közül, melyek a promóter régióban metilálódtak, míg a metilált szekvenciát nem tartalmazó 5 esetből 3 mutatott LOH-t. Metiláció a Ta,G1 daganatok között éppen úgy előfordult, mint a T4,G3 daganatoknál. A súlyos diszpláziát mutató esetben nem találtunk LOH-t az SFRP1 lókuszon, azonban a gén CpG szigeteinek metilációja ebben az esetben is kifejezett volt.

## **A 9. kromoszóma genetikai vizsgálata**

### ***A 9. kromoszóma allél eltérései***

A 9. kromoszóma részletes mikroszatellita vizsgálatát 129 UC-n (minden grádusból és stádiumból) végeztük el, összesen 39 lókuszon, melyek átlagos távolsága 3.6 Mb. Az összes informatív lókuszt érintő LOH-t, mely monoszómiát jelent, 49 (38%) esetben találtunk. Az LOH és AI mellett egy négy gént érintő lókuszon homozigóta DNS vesztést találtunk, mely szerepet játszhat az UC genetikájában. Ahogyan az várható volt, a homozigóta vesztés a legnagyobb gyakorisággal a 9. kromoszóma rövid karján, a CDKN2A/B régióban fordult elő. További homozigóta vesztéseket találtunk a hosszú karon a DAPK1, PTCH és DBC1 lókuszeknek megfelelően.

Minden módosulást figyelembe véve, egy vagy több mikroszatellita lókuszt érintő elváltozás 114 (88%) esetben fordult elő. Ezen elváltozások mindkét karon közel azonos gyakorisággal jelentkeztek. Hetero- vagy homozigóta vesztések a 9p karon 93 (72%), míg a 9q karon 98 (76%) esetben fordultak elő. Ugyanakkor néhány daganat esetében csak egyik vagy másik karon találtunk elváltozást: kizárólag a 9p karon (és a 9q karon nem) 11 (9%) esetben, míg kizárólag a 9q karon (és a 9p karon nem) 17 (13%) esetben.

A 9. kromoszómán különböző stádiumban és grádusban észlelt allél elváltozások (hemizigóta v. homozigóta vesztés, allelic imbalance) kiértékelése során nem találtunk összefüggést ezen elváltozások és a stádium vagy grádus között. Habár az AI százalékos aránya magasabb volt G2 tumorokban, mint G3-ban, ezt magyarázhatja, hogy a G2/3 daganatok egy része T2-4 stádiumban elvégzett cisztekómiás mintából származott; és néhány esetben a daganatos DNS-t az infiltráló limfocitákból származó egészséges DNS szennyezhetette, így okozva „allelic imbalance” jelenségét.

### ***Két új, LOH-t mutató régió azonosítása a 9p kromoszómán***

Korábban már igazolták, hogy a 9p21 régiója a LOH előfordulásának fő területe a 9. kromoszómán. Ezért itt 5 mikroszatellita markert (D9S1749-től D9S1870-ig) vizsgáltunk, melyek egy, az MTAP és CDKN2A/B géneket is tartalmazó, 300 kb hosszú szekvenciát fednek le. Ezen gének területén LOH 85 (66%) esetben fordult elő. A CDKN2A, CDKN2B, vagy mindhárom gént érintő homozigóta deléció 40 (31%) esetben észleltünk. Három daganatban az egyetlen LOH a 9. kromoszóma rövid karján, a D9S1749 lókuszbán fordult elő, mely az MTAP gén szekvenciáira esik.

A nagy felbontású mikroszatellita vizsgálat két további rövid szakaszt azonosított, ahol allélikus változások figyelhetők meg. Ezek a szakaszok korábban még nem kerültek leírásra UC-ban. Átfedő allélikus változások láthatóak a 9p24.1 régióban, a D9S286, D9S921 és D9S269 lókuszekben. A D9S921 lókuszt a PTPRD gén intronjának megfelelően helyezkedik el, a D9S286

disztálisan 250 kb, míg a D9S269 proximálisan 450 kb távolságra a PTRD gén szekvenciáitól. Kizárólag ezeket a lókusztokat érintő allélikus változások 9 (7%) esetben figyelhetőek meg. Más géneket, akár a teljes kart vagy kromoszómát érintő nagyobb elváltozásokkal együtt 77 (60%) eset mutatott LOH-t a PTRD gén területén. Egy másik rövid régió a 9p22.3 területén a D9S156 és D9S157 lókusztoknak megfelelően mutatott allélikus változásokat; ez terület tartalmazza a BNC2 gént. A BNC2 géntől disztálisan 150 kb távolságra a D9S156 lókuszt, míg proximálisan 700 kb távolságra a D9S157 lókuszt találhatók. Hasonlóan, kizárólag ezt az 1 Mb-nál rövidebb területet érintő elváltozást 7 (5%) esetben mutattunk ki. A nagy deléciókat is idevéve 78 (60%) daganat mutatott LOH-t a BNC2 gén területén.

### ***Egy új, LOH-t mutató régió azonosítása a 9q kromoszómán***

A 9. kromoszóma hosszú karjának részletes vizsgálatát 18 mikroszatellita lókuszon végeztük el. Ezek a lókusztok tartalmazták három ismert gén PTCH (9q22.32), DBC1 (9q33.1) és TSC1 (9q34.2) területét, vagy azok környezetét is. Kizárólag a PCTH gént (D9S1809) érintő LOH 3 (2%) daganatban volt látható, de nagyobb régiókkal együtt a PCTH régiója deletálódott 80 (62%) esetben. Három (2%) daganatban a PCTH szekvenciája homozigóta veszteséget mutatott. A D9S1872 és D9S195 (DBC1) régióban LOH 86 (67%) esetben fordult elő, beleértve 18 (14%) mintát, ahol kizárólag ez a régió volt érintett. Két esetben a DBC1 területén homozigóta deléció jelentkezett. Csak a TSC1 régióját (D9S1830) érintő LOH-t 12 (9%) esetben találtunk, de a TSC1 régiója nagyobb területekkel együtt a 79 (61%) esetben volt deletált. Homozigóta allélvesztés ezen a génen nem jelentkezett.

A mikroszatellita allelotipizálás a 9q21.33 régióban egy rövid deléciót azonosított, melyet UC-ban még nem írtak le. A D9S257 lókuszon 12 (9%) esetben úgy jelentkezett LOH, hogy a környező lókusztok heterozigotitása megtartott maradt. Ez, a D9S257 lókuszt a DAPK1 gén intronjainak területére esik. Hat esetben a DAPK1 gén szekvenciáinak homozigóta vesztesését azonosítottuk. Amennyiben a nagyobb 9q deléciókat is figyelembe vesszük (beleértve a MAPK1 gén területét is), 80 (62%) eset mutatott LOH-t a DAPK1 gének megfelelően.

### ***Mind a hét régióban azonos gyakorisággal fordult elő LOH, stádiumtól és grádustól függetlenül***

A 9. kromoszóma hét rövid, nem szintenikus régiójában elhelyezkedő gének különböző biológiai funkciókért felelősek és más-más jelátviteli útvonalakban érintettek. Ezért csábító volt ezen gének sejtnövekedésben (grádus) és sejtmotilitásban/invázióban (stádium) betöltött lehetséges szerepét vizsgálni. Hogy a már ismert és újonnan azonosított lókusztok lehetséges szerepét értékeljük, az allelotipizálás eredményeit minden egyes régió esetében összevetettük a daganat grádusával és stádiumával. A PTPRD, BNC2, CDKN2A/B, DAPK1, PTCH, DBC1 és TSC1 gének területén minden stádiumban és grádusban közel azonos gyakorisággal fordult elő LOH.

Szoliter, szinkron és aszinkron multiplex daganatok esetében is – egy lókuszt kivételével – azonos eredményt kaptunk, amikor a hét régióban előforduló LOH-t kiértékeljük. Tehát a PTPRD, BNC2, CDKN2A/B, PTCH, DBC1 és TSC1 régiókat érintő elváltozások közel azonos gyakorisággal fordultak elő szoliter ill. multiplex tumorokban. Ugyanakkor, a DAPK1 gén területén a 81 recidíváló vagy multifokális növekedést mutató daganat közül 59 (73%) esetben, de a 41 szoliter daganat között csak 12 (29%) esetben volt LOH megfigyelhető. Ez a megfigyelés valószínűsíti a DAPK1 szerepét recidíva ill. a multifokális növekedés eseteiben.

## **A 11. kromoszóma allélikus változásai**

A 11. kromoszómát elsőként 18 mikroszatellita lókuszon vizsgáltuk, mely a 135 Mb szekvenciát átlagosan 7,5 Mb távolságokban fedte le. Mivel a 11p15.5, 11p11.2 és 11q12.1 kromoszóma területeken gyakori elváltozások voltak kimutathatóak, ezeket a területeket további mikroszatellita lókusztok vizsgálatával telítettük, hogy átlagosan 600 kb távolságot érjünk el a vizsgált lókusztok között. A vizsgált 121 UC-ból csak két esetben találtunk LOH-t minden informatív lókuszon, ami a 11. kromoszóma monoszómiának felel meg. A 11. kromoszóma rövid vagy hosszú

karjának hiánya ill. rövid, nem szintenikus deléciók 85 (70%) esetben fordultak elő, 5 (4%) esetben LOH csak egyetlen markeren jelentkezett.

### ***A 11p két, allélikus változásokat mutató régiója***

A leggyakoribb intersticiális deléciók a 11p15.5 régióban fordultak elő, melyet a második ciklusban 600 kb-ként elhelyezkedő mikroszatellita vizsgálatokkal telítettünk. A D11S922 and D11S1318 között átfedő LOH megfelel egy 600 kb hosszú, „imprinted” szekvenciának. Ez a terület tartalmazza az IGF2 (insulin like growth faktor=inzulin-szerű növekedési faktor) gént, mely csak az apai allélről expresszálódik, valamint a H19-t, mely csak az anyai ágon öröklődő nem kódoló RNS-szekvenciát expresszál. E két gén területén 49 (40%) esetben láttunk allélikus változásokat. A második átfedő LOH szintén az „imprinted” géndomainben, a 11p15.5 régió D11S2345 és D11S988 lókusza között helyezkedett el. Ez a kb. 700 kb nagyságú régió a RHOG, STIM1, RRM1 és TRIM21 géneket tartalmazza. Ebben a régióban 58 (48%) esetben találtunk allélikus eltéréseket. A harmadik, 11p11.2 régiót 10, mintegy 60 kb távolságban elhelyezkedő mikroszatellitával fedtük le. Ezek több, nem szintenikus veszteséget mutattak, mely valószínűleg e régió instabilitásából következik.

### ***Gyakori allélikus változások a 11q12.1 régióban***

A 11q21.1 régió D11S1920 and D11S4191 lókuszek közé eső mintegy 4.8 Mb hosszú szakasza gyakran mutatott a vizsgált 5 lókuszból csupán egyet vagy kettőt érintő, rövid nem szintenikus veszteségeket. Ez a terület tartalmazza az olfaktorikus receptorcsalád géneit. Az SSRP1, PRG3, FAM11A és CTNND1 gének a D11S1809 és D11S4191 lókuszek közötti rövid régióban helyezkednek el. Ez utóbbi szegmens 41 (34%) esetben volt érintett.

### ***A genetikai és patológiai adatok összefüggése***

Allélikus változásokat a 34 G1 daganat között 18 (53%), a 20 G2 között 13 (65%) és a 67 G3 között 56 (84%) esetben találtunk. Habár az eltérések gyakorisága a grádus értékével együtt emelkedett, még G1 daganatokban is nagy gyakorisággal fordultak elő. Hasonlóan, az 53 pTa papilláris tumor között 31 (58%), a 25 pT1 között 17 (68%) és a 44 pT2-4 között 38 (86%) daganat mutatott LOH-t a 11. kromoszómán. Ha csak a H19 és IGF2 géneknek megfelelő „imprinted” régiót vesszük figyelembe, akkor G1 daganatok 44%-ban, G2 és G3 egyaránt 50%-ban mutatott eltérést ezen a területen. A pTa stádiumú daganatok 28%-a, a pT1 52%-a és a pT2-4 47%-a mutatott LOH-t az „imprinted” régióban. Így tehát nem tudunk összefüggést megállapítani sem a 11. kromoszóma, sem annak valamely specifikus régiója között.

### **A 17. kromoszóma allélikus változásai és a p53 gén mutációja**

A 17. kromoszóma allélikus változásait és a p53 gén mutációját (minden stádiumot és grádust tartalmazó) 120 hólyagdaganatos mintán vizsgáltuk. Az 55 pTa stádiumú daganat legnagyobb része G1 grádust mutatott, és csak 3 esetben diagnosztizáltunk G3-t. A 65 pT1 és pT2-4 daganatok egyike sem mutatott G1-t, és közülük csak 4 bizonyult G2-nek; majdnem mindegyik G3 grádust mutatott. A 17p13.1 régió p53 lókuszában 44 (37%) esetben találtunk LOH-t. A LOH előfordulásának gyakorisága emelkedett az UC grádusának értékével, éles különbséggel a G1-2 és G3 daganatok között (16%, 17% vs. 55%). Az allélvesztés gyakorisága a 17p13.1 régióban hasonló volt az ún. nem izominvazív (felületes) pTa (20%) és pT1 (18%) daganatokban, de emelkedett a pT2 (55%) és pT3-4 (69%) daganatokban.

A p53 gén 5-8 exonjában 25 (21%) esetben találtunk mutációt. Az 5. exon szekvenciái 3 esetben, a 6. exoné 6, a 7. exoné 7, a 8. exoné 9 esetben változtak meg. A legtöbb daganat missense pontmutációt tartalmazott. Egyetlen (pT1,G3) kivételtől eltekintve mind a 25, p53 mutációt tartalmazó UC LOH-t is mutatott a 17p13.1 régióban. Az 55 pTa daganat közül egyetlen sem mutatott p53 mutációt, míg a minimálisan invazív pT1 daganatok 23%-a, az izominvazív pT2 és pT3-4 daganatok 36% ill. 37%-a tartalmazott mutációt. A G1-2 daganatok egyike sem mutatott eltérést a p53 gén 5-8. exonjában. Az LOH és p53 mutáció vizsgálatainak eredményeit összefoglalva

megállapíthatjuk, hogy a 17p13.1 régióban LOH ugyan különböző gyakorisággal, de minden stádiumban és grádusban előfordult. Ugyanakkor a p53 gén mutációja kizárólag magas grádusú (G3) UC-ban volt megtalálható (ideértve egy CIS esetét is). Az invazív pT1-4 daganatokban előforduló nagyszámú p53 mutáció megfelel annak a megfigyelésnek, hogy a G3 daganatok túlnyomó többségét ezekben a stádiumokban diagnosztizáljuk.

### **A 9. kromoszóma allélikus változásai és a p53 gén mutációja**

Többen úgy vélik, hogy a p53 gén deléciós/mutációs inaktivációja és a 9. kromoszómán bekövetkezett LOH az UC kialakulásának különböző útvonalait (papilláris vs. szolid daganat) jelzik. Huszonegy (p53 mutációt mutató) esetben 39 lókuszos LOH adatait vizsgáltuk. A 9. kromoszómán LOH összesen 19 (90%) esetben volt látható. A legtöbb daganat a 9. kromoszóma teljes hosszában mutatott LOH-t. Csak a 9p karon 3 esetben láttunk LOH-t, melyek egyike kizárólag a CDKN2A/B régióban mutatott homozigóta deléciót. Három daganat csak a 9q karon mutatott LOH-t, közülük két esetben csak a 9q22 (PTCH) és 9q33 (DBC1) régiókban. A CDKN2A/B régió 9 esetben mutatott homozigóta deléciót, míg a DAPK1 és PTCH gének egy-egy esetben.

### **Allélikus változások az UC genomjában**

A heidelbergi Molekulár-Onkológiai Laboratóriumban már korábban elvégezték hólyagdaganatos minták 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 18 és 20. kromoszómájának allelotipizálását (minden kromoszómán 3-5 lókuszon), ill. a 2q és 8p régiók további lókuszeit is vizsgálatra kerültek. Bulashevskaja és mtsi. Bayes hálózat valószínűségi következtetések alapján az allélikus változások progressziójának lehetséges útvonalait állították fel, melynek alapján, az UC patogenezisében elsődleges és másodlagos eseményeket véleményeztek. A 9. kromoszómán jelentkező LOH-t elsődleges, míg a 8., 11. és 17. kromoszómán bekövetkező LOH-t másodlagos genetikai változásnak találták. A 8., 9. és 11. kromoszóma nagy felbontású mikroszatellita vizsgálatának eredményei a fent említett eredményekkel együtt kerültek kiértékelésre. A korábbi és a jelenlegi vizsgálatok eredményeit összefoglalva azt találtuk, hogy a 9. kromoszómán bekövetkezett LOH (gyakran homozigóta veszteség) hasonló gyakorisággal jelenik meg G1, G2 és G3 daganatokban, valamint a különböző stádiumokban is. A 2q, 5, 6, 8p, 11p, 17p és 18q kromoszómák változásai gyakrabban láthatóak G2 és G3 daganatokban, azaz összefüggést mutatnak az UC-k grádusával. Hasonlóan, a 2q, 5, 6, 8p, 11p, 12q, 14q, 17p és 18q kromoszómán megfigyelhető LOH gyakrabban fordul elő T1-T4 daganatokban. A legtöbb UC különböző kromoszómális régiókban mutatott LOH-t. Csupán két esetben (egy Ta,G1 és egy Ta,G2) nem találtunk eltérést egyik vizsgált lókuszon sem.

### **A mikroszatellita allelotipizálás klinikai alkalmazása: recidív UC kimutatása vizeletmintából**

Egy hólyagdaganat kialakulásában számos kromoszómális lókuszos lehet érintett. Ezért, figyelembe véve, hogy 1. a vizeletből származó DNS nagy fokban „szennyezett” normál DNS-sel, és 2. nem tudjuk, melyik kromoszómális régiók érintettek (ha van egyáltalán érintett) a vizsgált daganat kialakulásában, nem tudjuk a mikroszatellita allelotipizálást daganatok szűrésére felhasználni.

Ugyanakkor, ha ismerjük a primér daganatban bekövetkezett genetikai változásokat, a rendszeres utóvizsgálatok során lehetséges a vizeletüledékből származó mintákon ezen specifikus genetikai elváltozások ellenőrzése. Már korábban, ill. saját vizsgálatainkban is megállapítottuk, hogy mind a szinkron, mind az aszinkron multiplex daganatok intravezikulális szóródással, intravezikulális metsztázisképzéssel alakulnak ki. Ez azt jelenti, hogy a multiplex és recidív UC-k túlnyomó többsége monoklonális eredetű. Ha ismerjük a primér daganat genetikai hibáit, kereshetjük ugyanazokat a vizeletüledékben is. Sajnos, a pTa,G1 daganatok gyakran csak néhány, esetenként ritka elváltozást tartalmaznak, ezért nehéz az ilyen daganatok genetikai elváltozásainak felismerése, ill. a vizeletüledékben ezen elváltozások kimutatása. Összesen 36 beteg megfelelő vér-, vizelet- és daganat-mintáit dolgoztuk fel mikroszatellita vizsgálattal. Négy esetet kizártunk, mivel itt nem találtunk eltérést a vizsgált 13 lókuszon. A daganatos mintákban LOH-t mutató 32 beteg vizeletüledékét vizsgáltuk mikroszatellita vizsgálattal. Legalább egy mikroszatellita markeren 25

esetben észleltünk allélikus változást, de 7 esetben az allelotipizálás nem mutatott eltérést a vizsgált lókuszon. A pilot vizsgálat eredményeit összefoglalva, a pozitív mikroszatellita markereket tartalmazó primér daganatokat az esetek 78%-ában sikerült diagnosztizálni szimulált, daganatot tartalmazó vizeletüledékből.

### **Multiplex és szoliter UC-k array-CGH vizsgálata**

A nagyfelbontású array-CGH vizsgálatnak számos előnye van a mikroszatellita allelotipizálással szemben. A vizsgálatunkban felhasznált array 60.000 lókuszon át enged bepillantást a teljes tumor genomba. Ezen túlmenően az array-CGH nem csak a DNS-szekvenciák hiányát, hanem duplikációkat és amplifikációkat is képes azonosítani. Ugyanakkor ez a technika nem tesz különbséget a szülői allélek között, és ezért nem is ad információt multiplex daganatok klonális növekedéséről. A vizsgálatunkban felhasznált multiplex daganatok klonális növekedését korábban Dr. Sigrun Langbein a Heidelbergi Egyetem Molekulár-Onkológiai Laboratóriumában mikroszatellita allelotipizálással bizonyította.

A mikroszatelliták megkülönböztetik a szülői alléleket, ezért segítségével megállapíthatjuk multiplex daganatok eredetét. Minden egyes, az array-CGH vizsgálatban felhasznált, multiplex daganat megfelelő kromoszóma régiói mikroszatellita vizsgálatra kerültek. Minden egyes, azonos betegről származó tumor ugyanazon szülői allél hiányát mutatta a különböző mintákban, így igazolta a daganatok monoklonális eredetét.

A multiplex daganatokban jelenlévő genetikai elváltozások kiértékelésével lehetővé válik a daganatok progressziója során lezajló klonális evolúció feltérképezése. A mindegyik daganatos sejtben és tumorban jelenlévő „primér” elváltozások, ill. egy vagy több metasztatikus szubklónban megjelenő „másodlagos” elváltozások alapján a genetikai fejlődés fa-struktúrában lépésről-lépésre felrajzolható.

### ***Multiplex és szoliter daganatok közötti átfogó DNS különbségek***

Célunk az volt, hogy olyan genetikai változásokat mutassunk ki, melyek jellemzően multiplex vagy jellemzően szoliter daganatokban fordulnak elő. Az array-CGH vizsgálatok eredményei alapján 2q, 8p és 18p kromoszómavesztés szoliter UC-re jellemző, míg multiplex UC-k esetében a jellemző tendencia: ugyanezen régiók kópiaszámának növekedése.

A 3p, 5p kromoszómák kópianyerése ezzel szemben multiplex tumorokban volt jellemző, míg szoliter daganatokban inkább ezen régiók elvesztése látható. A vizsgálat egyik legfontosabb felismerése, hogy a multiplex daganatokban gyakori a 9q, 10q, 11q, 18q és 21q kromoszóma elvesztése. Érdekes, hogy szoliter daganatok gyenge tendenciát mutattak ugyanezen területek másolati számának növekedésére; továbbá, szoliter daganatokban az X kromoszóma másolati számának növekedését is megtaláltuk. Több multiplex daganat esetében csak a 9. kromoszóma hosszú karja deletálódott, míg a rövid kar másolati szám változása nélkül megtartott maradt.

### ***A rövid szekvenciák kópiaszám-vesztése jellemzően multiplex UC-ban jelenik meg***

Az 56 esetben összesen 80 rövid homozigóta allélvesztést találtunk a 9p 10q, 11q, 18q és 21q kromoszómákon. Egyetlen szoliter UC sem mutatott homozigóta allélvesztést a 9p régió kivételével. A 32 multiplex daganat közül 28 esetben láttunk homozigóta allélvesztést a 9p kromoszómán, míg a 24 szoliter daganat közül csak 5 mutatott hasonló eltérést. A PTPRD gént tartalmazó 9p24.1-23 régió 2 Mb szekvenciája 6 multiplex és egy szoliter daganatban hiányzott. Nyolc multiplex UC-ban találtunk egy 1.54 Mb méretű, legkisebb átfedő régiót a C9orf93, BNC2 és CNTLN géneket tartalmazó 9p22.3-22.2 területen. A leggyakrabban a MTAP, CDKN2A és CDKN2B géneket tartalmazó 9p21.3 régió 0.417 Mb szakaszának homozigóta elvesztése jelentkezett, ez 13 multiplex, és négy szoliter UC-ban fordult elő.

A 10q kar 4 régiójának homozigóta allélvesztését 14 multiplex tumorban láttuk. Egy kivétellel mind a 14 esetben a 10q23.1 és 10q25.1 területek közötti hosszú heterozigóta deléción volt

látható. Ez tartalmazta az NRG3, PTEN és SORCS1 géneket is érintő rövid szakaszok homozigóta delécióját is. Homozigóta deléciót láttunk 8 multiplex UC esetében a 11q23.3 kromoszómán, egy 65 gént tartalmazó 6.7 Mb méretű legkisebb átfedő régióban. A DSC1-3, DSG1-4 géneket tartalmazó 18q12.1 régió homozigóta vesztését 7 daganatban azonosítottuk. Végül, a AM2, CLDN8 és CLDN17 géneket tartalmazó 21q21.3-22.11 régió 5.64 Mb szakaszának elvesztést, valamint a CLDN14, ERG, ETS és UMODL1 géneket tartalmazó 21q22.13-22.3 régió 7.5 Mb szakaszának elvesztése egyenként hét-hét daganatban volt látható.

### ***Kizárólag G3 daganatokban előforduló amplifikációk***

Összesen 32 amplifikált régiót találtunk magas malignitású daganatokban. A vizsgált 11 szoliter G3 daganatból nyolc esetben legalább egy kromoszóma régió DNS szekvenciák amplifikációját mutatta. Az amplifikált régiókban lévő gének száma kettőtől több, mint 100-ig emelkedett. Ide tartozik (mások mellett) az E2F2, E2F3, CCND1, FGF19, L3MBTL és YWHAB gén, melyekről ismert, hogy UC-ban gyakran amplifikáltak. Amplifikáció – a stádiumtól függetlenül – csak G3 daganatokban fordult elő. Érdekes, hogy az 5. betegtől származó nyolc szinkron multiplex pT2, G3 daganat nem mutatott amplifikációt, hanem a 9p22.3, 10q25.1 és 18q12.1 kromoszóma régiók homozigóta delécióját.

## **MEGBESZÉLÉS**

### **A 9. kromoszóma megváltozása valószínűleg az első genetikai esemény a papilláris és szolid UC-k kialakulásában**

Az elvégzett részletes allelotipizálás során a 9p24.1, 9p22.3 és 9q21.32 régiókban három új feltételezett tumor-gén lókuszt találtunk. Ezzel UC-ban, a 9. kromoszómán felismert rövid deléciók száma hétre emelkedett. A tumorok 88%-ában fordultak elő egy vagy több régiót érintő allélikus változások ezeken a területeken (PTPRD, BCN2, CDKN2A/B, DAPK1, PTCH, DBC1 és TSC1). Valószínű, hogy a 9. kromoszóma megváltozása központi szerepet játszik az UC kialakulásában. Korábban felmerült, hogy a 9p karon talált LOH és a betegség klinikai kimenetele összefügg. Mások a 9. kromoszóma eltéréseit másodlagosnak tartották. Mi a 9. kromoszóma genetikai eltéréseit az UC kialakulás indító eseményének tartjuk. Ezt a hipotézist támogatja az a megfigyelésünk is, hogy az UC-k minden stádiumában és grádusában LOH közel azonos gyakorisággal fordul elő ebben a hét régióban. Az eltérések egyike sem mutatott összefüggést a TNM klasszifikációval.

A sejtciklust szabályozó CDKN2A (p16 és p14<sup>ARF</sup>) és CDKN2B (p15) tumor szuppresszor géneket, mint a 9p kromoszóma delécióinak célpontjait, „mapping” vizsgálatokkal már korábban igazolták. Az UC-k 30-60%-ban leírták a p16 génen promoter metiláció miatt bekövetkező némítást (silencig-et). A heterozigóta alléldeléció és a másik allélen bekövetkező mutáció/hipermetiláció a gén inaktivációjához vezet. A p16 protein expressziójának hiánya a sejtciklust szabályozó funkció elvesztését, és következményes tumorsejt proliferációt okoz.

Eltekintve a CDKN2A/B lókusztól, két rövid LOH régiót találtunk a 9p karon. Ezek egyike a 9p24.1 területen a receptor protein tirozin foszfatáz delta (PTPRD) gént tartalmazza. A vizsgálatainkban azonosított, csak a PTPRD szekvenciáját tartalmazó, legkisebb átfedő deléció, arra utal, hogy ez a gén UC-ban is tumor szuppresszor funkcióval bírhat. A szelektív LOH egy másik, új lókuszt a 9p22.3 régióban találtuk meg. Ez a terület tartalmazza a DNS-kötő cinkujj-proteint kódoló BNC2 gént. A BNC2 lókuszt homozigóta elvesztése nyelősőrákban látható. Oesophagus sejtvonalakban a stabil BNC2 expresszió a növekedés leállításához vezetett.

Az UC genetikájában ill. a magas recidívarizikóban már régóta szerepet tulajdonítanak a 9q régiók elvesztésének. A PTCH gén deléciója vagy csökkent expressziója és a DBC1 gén homozigóta deléciója vagy metilációja alapján az UC biológiájában ezen gének szerepe feltételezhető. A TSC1 gén mutációja az UC-k 10%-ban látható. Mivel ez más típusú daganatokban

nem jellemző, feltételezhető, hogy a TSC1 mutációk vagy deléciók inaktiválása szerepet játszik az UC kialakulásában. Vizsgálatunkban a DAPK1 gén szekvenciáin jelentkező LOH összefüggést mutatott a multifokális növekedéssel és az intravezikális recidívával. Promoter metiláció miatt hiányzik a DAPK1 expresszió az UC-k 29-88%-ban, valamint más daganatokban is. Még fontosabb, hogy a DAPK1 gén metilációja szignifikáns összefüggést mutat a rövid időn belül jelentkező és nagyon gyakori recidívákkal. A DAPK1 az IFNA indukált apoptózis pozitív mediátora, és az is bizonyított, hogy szerepet játszik a p53-függő apoptózis útvonalon. A DAPK1 metiláció és LOH összefüggése a recidívával arra utal, hogy a DAPK1 gén a 9q deléciók egyik fő célpontja. Az azonban még nem tisztázott, hogy a DAPK1 milyen módon felelős az intravezikális terjedés gyakoriságáért.

### **A 8p kar elváltozásai összefüggést mutatnak az UC stádiumával és grádusával**

Vizsgálatainkkal összefüggést találtunk a 8p kromoszóma allélikus elváltozásai és az UC stádiuma/grádusa között, valamint kimutattunk egy töréspont régiót a 8p12-p11.2 területen. Nemrégiben Veltman és mtsai. UC-ban azonosítottak egy rendszeresen megfigyelhető töréspontot a 8p12 régió 9Mb hosszú területén. Feltételezésük szerint az egyik töréspont egy hosszú, 2.3 Mb méretű területen az NRG1 közelében, míg egy másik az FGFR1 közelében helyezkedik el. Adelaide és mtsai. szintén találtak egy 1.1 Mb hosszú területen elnyúló töréspont régiót az NRG1 gén területén emlő és pancreas sejtvonalakban. A két exon között néhány esetben egy különösen hosszú (900 kb) intron helyezkedett el. UC-ban és emlődaganatban e régió nagyfokú amplifikációja figyelhető meg. Az amplifikált régióban találhatóak az FGFR1, SFRP1 és TACC1 feltételezett tumorgének, míg az amplikon csak ritkán tartalmazza az NRG1 gént. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a 8p11.2-12 régió instabil DNS szekvenciákat tartalmaz, melyeken gyakran több gént érintő transzlokáció, deléció vagy amplifikáció következik be. Vizsgálatunkban leggyakrabban az NRG1 géntől proximálisan találtunk törést, mely a gén egyik alléljének elvesztését okozta.

Minden stádiumban és grádusban az NRG1 gén downregulációját találtuk, függetlenül a megfelelő lókuszon látott allélikus változásoktól. Adelaide és mtsai. azt is igazolták, hogy emlődaganatban az NRG1 izoformok expressziós mintája független a genetikai változásoktól. Ez arra utal, hogy az NRG1 egyetlen alléljét érintő töréseknek nincs transzkripciós következménye. Az NRG1 a sejt-sejt jelátviteli neuregulinek tagja, melyek az ERBB családba tartozó tirozin-kináz receptorok ligandjai. Az NRG1 különböző izoformjai függvényében következik be a proliferáció stimulációja vagy felfüggesztése, apoptózis, migráció, differenciáció és adhézió különböző sejt- és daganattípusokban. Az NRG1 szerepét UC-ban ugyanakkor még nem állapították meg.

A Wnt jelátviteli útvonal szerepét több daganatban – köztük UC-ban is – feltételezik. Az elválasztott frizzle-related fehérjék (sFRPs) a Wnt receptorok frizzled családjának cystein gazdag domain-jához hasonló N-terminális domain-t tartalmaznak. A Wnt kötő frizzled receptorok kompetitív antagonistái, a Wnt jelátvitel modulátoraiként hatnak. Az SFRP1 hiánya ezért a Wnt jelátviteli út fokozott működéséhez vezethet, és így fokozódhat a sejtproliferáció. Ugolini és mtsai. invazív ductális emlődaganatokban írtak le jelentősen csökkent, vagy hiányzó SFRP1 transzkripciót, de nem találtak összefüggést az SFRP1 expressziója és a tumor grádusa között. Más vizsgálatok az SFRP1 upregulációja és az apoptózis között vetették fel összefüggés lehetőségét. Újabban úgy tartják, hogy az SFRP1 funkcióvesztése invazív UC-ban a rövid túlélés független indikátora. Vizsgálatainkban minden stádiumban és grádusban az SFRP1 downregulációját találtuk, ami arra utal, hogy ebben a daganatban az SFRP1 funkciójának csökkenése vagy elvesztése inkább a daganat fejlődésére (proliferáció), mint a progressziójára (invazív növekedés) van hatással.

A legtöbb tumor-gén inaktivációjában az egyik allél elvesztése és a másik allél mutációk vagy metilációs elnémítása, „kikapcsolása” (silencing) játszik szerepet. Újabban a haploinsufficiencia jelenségét is a gén inaktiváció egy lehetséges útjának tartják. Az SFRP1 gén vizsgálata során kapott LOH, metilációs és expressziós eredményeink sokkal összetettebb mechanizmusra engednek következtetni. Pl. az SFRP1 gén teljesen „elnémul” UC-ban egy allél elvesztése és a másik allél metilációja során; ill. diszpláziában allélikus változások nélkül is,

kizárólag metilációval. Néhány esetben ugyanakkor nem tudunk különbséget kimutatni tumor és normál szövet között (sem a metilációs állapotban, sem az allélikus változásokban), az SFRP1 mégis downregulált volt. Az SFRP1 deléció/mutációs inaktiválását mások már korábban kizárták. Úgy tűnik tehát, hogy UC-ban az ismert genetikai (allélvesztés, haploinsufficiencia) és epigenetikai (metiláció) változások mellett más mechanizmusok is szerepet játszanak az SFRP1 gén elnémításában.

### **A 11p kromoszóma változásai nem mutatnak összefüggést az UC progressziójával**

A 11. kromoszóma allelotipizálása során az 11p15.5 „imprinted” kromoszóma régióban gyakran találtunk LOH-t. Ebben a régióban 12 gén ismert, közöttük a H19 és IGF2 gének. Az IGF2 (insuline-like growth factor 2), mely kizárólag az apai allélról fejeződik ki, a növekedési faktorok inzulin családjába tartozik. Az IGF2 nem expresszálódik normál sejtekben, de kifejezett expressziót mutat UC-ban, valószínűleg az elveszett „imprinting” miatt. A H19 egy másik ún. „imprinted” gén, nem kódoló RNS-t expresszál az anyai allélról. Ez csak normál urotheliális sejtekben fejeződik ki, UC-ban nem. Az IGF2 és H19 epigenetikai változásai Wilms' tumorra és Beckwith-Wiedemann szindrómával társulnak. E régió elváltozásai rhabdomyosarcoma, mellékvesekéreg daganat, tüdő, ovárium és emlődaganat esetén láthatóak. Az IGF2 „imprinting” vesztese prosztata és más daganatokban is szerepet játszhat.

Allélikus imbalance figyelhető meg a 11p15.5 régióban is. Ez a terület tartalmazza a RHOG, STIM1, RRM1 és TRIM21 géneket. Normál urotheliális sejtekben, az RRM1 (ribonucleotid reductase M1) kivételével ezek a gének nem expresszálódnak. A harmadik régió, melyben LOH-t találtunk, tartalmazza a SSRP1, PRG3, CTNND1 és FAM11A géneket. A CTNND1 gén deléciója és amplifikációja is megfigyelhető volt egyes esetekben. Vizsgálatunkban a CTNND1 gén amplifikációját egyetlen szoliter UC esetén észleltük array-CGH-val. A CTNND1 gén az Armadillo fehérjecsald egy tagját kódolja, mely a sejtadhézióban és a jelátvitelben játszik szerepet.

Vizsgálataink (és más vizsgálatok) továbbra sem tisztázták, hogy a 11. kromoszóma mely génei játszhatnak szerepet az UC kialakulásában és progressziójában. Nincs összefüggés a 11. kromoszóma egyetlen allélikus régiójának megváltozása és az UC stádiuma között. Gyenge összefüggést mutattunk ki az allélikus változások és a grádus között.

### **A p53 gén mutációja a magas grádusú daganatokkal mutat összefüggést**

A p53 gén 5-8. exonjában 21%-ban találtunk mutációt az egymás után operált daganatokban. Habár a p53 gén területén LOH minden stádiumban és grádusban előfordult, p53 gén mutációt kizárólag magas grádusú, invazív daganatokban találtunk. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a 17p13 régió allélikus változása csupán egy lépés az UC agresszív növekedése és proliferációja felé. Nem csupán CIS-ben, szolid növekedést mutató pT1,G3 és pT2-4 UC-ban találtunk p53 mutációt, de papillaris növekedést mutató pT1,G3 daganatokban is. Ez arra utal, hogy a p53 mutáció nem csupán a kialakulás útvonalával összefüggő genetikai változás, hanem a daganatok magas malignitásáért is felelős. A p53 mutációt mutató eseteknél nagyon gyakran (90%) találtunk a 9. kromoszóma egy vagy több lókusán LOH-t, és a homozigóta veszteséget a CDKN2A/B, DAPK1 és PTCH gének területén. Tehát mind papillaris, mind szoliter növekedést mutató invazív UC-k esetében együttesen találtunk a 9. kromoszóma LOH-t és p53 mutációt.

### **Az UC kialakulásának feltételezett, egyszerű útvonala**

Vizsgálataink és irodalmi adatok alapján alakítottuk ki az UC kifejlődésének genetikai modelljét. Az UC kialakulása során a legelső genetikai változás a 9. kromoszóma monoszómiája vagy uniparentális isodisómiája; vagy a PTPRD, BNC2, CDKN2A/B, DAPK1, PTCH, DBC1 és TSC1 géneket tartalmazó különböző 9. kromoszóma régiókban bekövetkező LOH. A PTPRD hemi- vagy homozigóta deléciója és mutációja különböző típusú daganatokban fordul elő. Ha PTPRD expressziója helyreáll a tumorsejtekben, akkor a növekedés szuppressziója és apoptózis következik be. A BNC2 és CDKN2A/B inaktivációja növekedési előnyhöz vezet. A DAPK1 expressziójának hiánya

(promoter metiláció miatt) az UC-k 29-88%-ában következnek be. A DAPK1 az IFNA mediált apoptózis mediátora, és bebizonyosodott, hogy a DAPK1 a p53-függő apoptózis útvonalon is szerepel. A PTCH deléciója és csökkent expressziója, ill. a DBC1 homozigóta deléciója vagy metilációja felveti lehetséges szerepüket az UC biológiájában. Az UC-k 10%-ában figyelhető meg a TSC1 gén mutációja. Mivel ez más daganatokban nem jellemző, ezért feltételezzük, hogy a TSC1 mutációs vagy deléciós inaktiválása szerepet játszik az UC kialakulásában. Így tehát legalább hét, különböző sejtfunkciók kontrolljáért (mint pl. proliferáció és apoptózis) felelős gén inaktiválódhat a 9. kromoszómán hemi- vagy homozigóta delécióval, mutációval és metilációval. Nagyon valószínű, hogy a 9. kromoszóma egy vagy több régiójában kialakuló kezdeti genetikai változások vezetnek hiperpláziához vagy diszpláziához, és meghatározzák az UC kifejlődésének következő molekulárpatólogiai eseményeit.

Urotheliális hiperpláziában és diszpláziában gyakran fordul elő LOH a 9. kromoszómán. Ez a megfigyelés is valószínűsíti a 9. kromoszóma kulcsszerepét preneoplastikus és neoplastikus sejtproliferációban. Ha az ilyen sejtekben az FGFR3 gén aktiváló mutációja következik be, papilláris pTa,G1 UC alakul ki. Ezek a daganatok, mint szoliter vagy multiplex pTa,G1 UC-k, több alkalommal recidíválhatnak. Ugyanakkor néhány esetben G1 → G2-3 átalakulás következik be, nagy valószínűséggel p53 mutáció után. Ritka esetben a p53 inaktiváció már a papilláris tumor nagyon korai stádiumában bekövetkezik, és primér papilláris pTa,G3 UC alakul ki. Néhány pTa,G3 papilláris UC már a felismerés előtt invazív vá válhat, ezek a tumorok mind FGFR3 és p53 mutációt, mind a 9. kromoszóma LOH-t mutatnak.

Ha a 9. kromoszóma eltérést tartalmazó hiperplastikus vagy diszplastikus sejtekben p53 mutáció következik be, (vagy környezeti karcinogenezis miatt már p53 mutációt hordoznak), citológiaiilag "vad", aneuploid csoportként növekedni kezdenek (pl. CIS). A legéletképesebb sejtklón szelektálódásával invazív, pT1,G3 UC alakulhat ki. Ezek a tumorok csak 9. kromoszóma LOH-t és p53 mutációt hordoznak, de nem mutatnak FGFR3 mutációt. Így tehát a pT1,G3 UC-k a két különböző útvonal kereszteződésében helyezkednek el, és idővel izominvazív tumor irányába fejlődnek.

Számos más, különböző kromoszómaregiókat és géneket érintő genetikai eltérés szerepel az UC genetikájában, ezek legtöbbször késői stádiumban figyelhető meg. Ezek a gének befolyásolják a differenciációt, morfológiát és a növekedési kapacitást; invazív növekedést indíthatnak, vagy egyéb biológiai és morfológiai jellemzőket határozhatnak meg. Ugyanakkor ezek a változások másodlagosak a 9. kromoszóma eltérései után. Korábban Bulashevskaja és mtsi. Bayes hálózat valószínűségi következtetései alapján feltételezték, hogy az UC patogenezisének első eseménye a 9. kromoszómán bekövetkező LOH.

Goebell és Knowles vetette fel, hogy az FGFR3 mutációja alacsony grádusú papilláris UC-t jelöl; míg a TP53 mutációja és/vagy deléciója a CIS, pT1, izominvazív karcinóma útvonalát jelenti. Ha elfogadjuk ezt a hipotézist, akkor az FGFR3 és p53 mutációk a pTa,G1 és CIS kölcsönösen kizáró mintáit jelölik, míg a pT1,G3 (és pT2-4) UC mind p53 és FGFR3 mutációt is tartalmaznak. Ezzel szemben FGFR3 és p53 mutációk csak a pT1,G3 daganatok 9%-ban jelentkezik. Ez azt mutatja, hogy az FGFR3 mutációt hordozó papilláris UC-k invazív irányba progrediálnak, ha p53 mutáció következik be. Jelen vizsgálatban 9 papilláris, pT1,G3 UC mutatott p53 mutációt és LOH-t. Az invazív G3 UC-ban gyakran együtt megjelenő p53 mutáció és 9. kromoszóma eltérések arra utalnak, hogy a 9. kromoszóma LOH szolid növekedést mutató daganatokban is gyakran megjelenik.

### **A mikroszatellita vizsgálat csak korlátozásokkal alkalmas a betegség monitorizálására**

Számos klinikai vizsgálat javasolta vizeletüledék mikroszatellita vizsgálatát UC kimutatására és követésére, ugyanakkor ennek a technikának még sincs helye a mindennapi diagnosztikában. Habár a bemutatott pilot-vizsgálat szenzitivitása meghaladja a citológiáét, nem éri el a gold-standard cisztoszkópia 93%-os szenzitivitását. Egyrészt olyasmit kell keresnünk, ami

elveszett, másrészt a vizeletüledéket normál DNS szennyezheti, így a szignálcsökkenés nem azonosítható egyértelműen. Általánosságban elmondhatjuk, hogy az előrehaladott tumor több genetikai hibát tartalmaz, mind kvantitatív (deléció, amplifikáció), mind kvalitatív (mutáció) módon. Az alacsonyabb stádiumú daganatok észlelése nehezebb, mivel az azonosítható genetikai eltérések alacsonyabb számban fordulnak elő, vagy hiányoznak.

### **A multiplex urotheliális daganatokkal összefüggő homozigóta veszteségek**

A nagyfelbontású array-CGH vizsgálat feltárt majdnem minden DNS változást, melyről úgy tartjuk, hogy szerepet játszik az UC kialakulásában és progressziójában. a 2q, 8p és 18p régiókban bekövetkező kópiaszám veszteségek, melyek elsősorban a progresszióval mutatnak összefüggést, elsősorban szoliter daganatokban fordultak elő. Multiplex daganatokban a 9q, 10q, 11q, 18q és 21q régiókban jelentkezett nagy gyakorisággal kópiaszám veszteség, valamint ugyanezekben a régiókban gyakran figyeltük meg a rövid genom-szekvenciák homozigóta allélvesztését. Ennek alapján feltételezzük, hogy ezek a gének az intravezikális terjedéssel függenek össze.

Érdekes felismerés volt, hogy multiplex daganatokban nagyon gyakori a heterozigóta veszteség a 9q kromoszómán. A 9q kar hiányát már korábban összekötötték a magas recidíva-rizikóval. A PTCH (9q22.32) deléciója és csökkent expressziója, valamint a DBC1 (9q33.1) homozigóta vesztesége vagy metilációja alapján lehetséges, hogy ezek a gének is szerepelnek az UC biológiájában. A TSC1 (9q34.2) gén mutációja az esetek kb. 10%-ban jelentkezik, így valószínű, hogy a TSC1 is felelős az UC kialakulásáért.

Ugyanakkor még nem tisztázott, hogy ezen gének funkcióvesztése hogyan okozhat intravezikális terjedést. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a DAPK1 (9q21.33) promoter metilációja szignifikáns összefüggést mutat a rövid időn belül, és nagyobb arányban jelentkező recidívával. Nem találtunk ugyan olyan rövid deléciót, mely kizárólag a DAPK1 gént érintette volna, de a 9q kromoszómával együtt a gén egyik allélje deletált volt multiplex daganatokban. Ez arra utal, hogy a DAPK1 gén lehet a 9q deléciók fő célpontja, különösen multiplex daganatokban.

A rövid szekvenciák homozigóta delécióit és amplifikációit részletesen elemeztük, hogy az UC egyik vagy másik csoportjával asszociált gének lókuszeit megtaláljuk. Egy 417 kb hosszú átfedő homozigóta deléció a 9p21.3 területen (mely a CDKN2A/B géneket is tartalmazza) mind szoliter, mind multiplex UC-ban jelentkezett. A CDKN2A (p16 és p14<sup>ARF</sup>) és CDKN2B (p15) sejtciklus regulátor, tumor-szupresszor géneket a 9p kar deléciók célpontjaiként azonosították, szerepüket az UC genetikájában már korábban tárgyaltuk.

Vizsgálatainkban a 9p kromoszómán – a CDKN2A/B régió kivételével – két, nem szintenikus homozigóta veszteséget láttunk. Egyet a 9p24.1-23 régióban, mely a PTPRD (receptor protein tirozin foszfatáz delta) gént tartalmazza. A PTPRD gyakran deletált, mutált vagy metilált glioblastoma multiformában, neuroblastomában és tüdődaganatban. A PTPRD gént érintő legkisebb átfedő homozigóta deléció (biállélikus inaktiváció) arra utal, hogy ez a gén UC-ban is tumor szupresszor funkcióval bír. Egy másik új célregiót azonosítottunk a 9p22.3-p22 területen, ahol a C9orf03, BNC2 és CNTLN gének helyezkednek el. Újabban egy új, ovárium daganatra hajlamosító lókuszt találtak a 9p22 régióban a BNC2 génnél. A BNC2 egy DNS-kötő cinkujj fehérjét kódol, mely kifejezett expressziót mutat normál ováriumban és herében. A BNC2 gén homozigóta elvesztése látható nyelöcsőrákban, és a BNC2 stabil expressziója a növekedés megállását okozta nyelöcsőrák sejtvonalon.

Vizsgálatunk legfontosabb megfigyelése volt a 9p régió kivételével elhelyezkedő rövid homozigóta veszteségek és a multiplex UC-k összefüggése. Kizárólag multiplex UC-ban észleltük a 10q, 11q, 18q és 21. kromoszómákon előforduló gyakori homozigóta veszteségeket. Ez arra utal, hogy ezek a területek olyan géneket tartalmaznak, melyek szerepet játszanak a tumorsejtek intravezikális szóródásában. Az ilyen gének biállélikus inaktivációja a daganatsejtek leválásához és más hólyagterületeken való megtelepedéséhez (homing) vezethet. Például a 18q12.1 terület homozigóta

allélvesztése során a cadherin (sejtdhéziós molekula) szupercsaládba tartozó DSC (desmocollin) és DSG (desmoglein) gének elvesznek. A DSC2 és DSG2 normál urothéliumban éppúgy kifejeződik, mint UC-ban. Multiplex UC-ban a DSC2 és DSG2 gének elvesztése a sejtdhézió megszűnését okozhatja, és a sejtek más területeken való megtapadásához vezethet. Hasonlóan a 21q kar két régiójában bekövetkező homozigóta veszteség, és a CLDN8, CLDN14 és CLDN17 integrált membrán proteinek következményes hiánya, (melyek az ún. „tight junction” alkotóelemei), intravezikuláris metasztázisok kialakulásához vezethet.

Különböző genom szekvenciák amplifikációját már igazolták magas grádusú UC-ban. Néhány ilyen, E2F3, CCND1, ORAOV1, YWHAB és SDC4, már korábban leírtak különböző vizsgálatokban. A mi vizsgálatunkban ilyen amplifikációk kizárólag magas malignitású, G3 daganatokban fordultak elő. Habár Nord és mtsai. "magas grádusú és recidív daganatokban a fokális amplifikációk overrepresentációját" találták, számos magas malignitású, de recidív daganatot is belevettek vizsgálatukba. Az általunk bemutatott adatok arra utalnak, hogy ezek az amplifikációk általában a magas grádussal, míg a homozigóta deléciók a multiplicitással (szinkron/aszinkron) mutatnak összefüggést.

Több klinikopatológiai faktort javasoltak recidíva és progresszió predikciójára "felületen" (pTa és pT1) daganatokban: grádus, multifokálitás, korai recidíva, együttes CIS vagy tumorméret; de csak kevés genetikai elváltozásnál sikerült összefüggést kimutatni szinkron/aszinkron multiplex daganatokkal. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a sejtes adhézióért felelős gének biállélus inaktivációja (homozigóta deléció) elsősorban multiplex daganatokban fordul elő, így ez a daganatsejtek intravezikuláris szóródásáért felelős lehet.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. A 8p kromoszóma allelotipizálása során a CSMD1 és NRG1 géneket érintő rövid intersticiális deléciókat azonosítottunk. Ezek a változások a progresszióval (azaz a daganatok stádiumával és grádusával) összefüggést mutattak.

2. A 9. kromoszóma nagy felbontású allelotipizálása (a már ismert CDKN2A/B, PTCH, DBC1 és TSC1 gének genetikai elváltozásai mellett) három új génlókus azonosításához vezetett: PTPRD, BNC2 valamint DAPK1 gén lókusok. Ezek a genetikai elváltozások azonos gyakorisággal fordultak elő minden stádiumban és grádusban, valamint szolid és papilláris növekedés esetén is. Ez a jelenség az eltérések igen magas gyakoriságával (88%) együtt azt mutatja, hogy a hét gén közül legalább egy az UC elsődleges genetikai elváltozásai közé tartozik.

3. A 11p15 régió „imprinted” területén különböző genetikai változásokat figyeltünk meg. Mivel nem tudtunk összefüggést kimutatni sem a stádiummal sem a grádussal, ezért ezen elváltozások biológiai hatását illetően nem tudtunk következtetéseket levonni.

4. A 17p13 terület elvesztése a p53 gén egyik allélének elvesztésével együtt az UC bármely stádiumában és grádusában előfordulhat, de p53 mutációk kizárólag magas malignitású, G3 daganatokban fordultak elő.

5. A dolgozatban bemutatott eredmények és irodalmi adatok alapján mind a szolid (diszplázia, CIS, invazív UC), mind a papilláris növekedést mutató (pTa, recidívák ill. invazív növekedés lehetőségével) daganatok kialakulásának egy egyszerű, egységes útvonalát rajzoltuk fel.

6. A multiplex és recidíváló urotheliális daganatok – grádustól és stádiumtól függetlenül – kópiaszámvesztést mutattak a 9q, 10q, 11q, 18q és 21q kromoszómákon, ennek következtében a sejtdhézióban szerepet játszó gének homozigóta elvesztése is megfigyelhető volt. A szoliter daganatok elsősorban a 2q, 8p és 18p kromoszómákon mutattak kópiaszám veszteséget, ill. szoliter daganatokra a különböző kromoszómákon bekövetkező génamplifikációt találtuk jellemzőnek.

7. Ha ismerjük a primér daganat genetikai profilját, akkor korlátozottan ugyan, de a vizelet üledék mikroszatellita vizsgálata alkalmazható a recidíváló daganatok kimutatására.