

Ph.D. értekezés tézisei

Daganat-kialakulásban szerepet játszó gének expresszió-változásai kémiai karcinogének hatására

Gyöngyi Zoltán

Programvezető: Prof. Dr. Soltész Gyula

Témavezető: Prof. Dr. Ember István

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Humán Közegészségtani Intézet

Pécs, 2002.

## Bevezetés

Magyarország az első helyen áll daganatos halálozásban a férfiak között, és nők között a harmadik helyen (52 adatszolgáltató ország közül). Becslések szerint a fejlett országokban 2000-ben a korszpecifikus halálozás 13%-al csökkent a primer prevenció, és 6% -al a korai diagnózis és a szűrés jóvoltából. A daganatbiológiában alkalmazott molekuláris genetikai - biológiai módszerek egyre több lehetőséget adnak a daganatkeletkezés korai észlelésére, a magas rizikójú egyének és populációk azonosítására. A daganatok elsődleges megelőzésének (primer prevenció) alapfilozófiája az, hogy elkerüljük a daganatkeltő ágenssel való expozíciót. Biomarkerek jelezhetik az expozíciót (az expozíció biomarkerei) a betegség kialakulása előtt, és segítségükkel felmérhetjük a biológiai hatást (a biológiai hatás biomarkerei). Biomarkerek lehetnek az adott vegyületek és metabolitjaik, a DNS- és fehérje adduktok, a daganatok kialakulásában érintett (proto)onkogének, vagy a tumor szuppresszor gének mennyiségi és minőségi változásai.

Környezetünkben számos kémiai karcinogén fordul elő. Különösen veszélyes, pluripotens karcinogének a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH), melyek foglalkozási expozíciót jelent kőolajszármazékokkal dolgozók körében, de számos más foglalkozás esetében is, ahol fűtőolajat, gázolajat használnak, de sok van a dohányfüstben és a belső égésű motorok kipufogógázaiban is. Hatásukra mutációk érhetik a (proto)onkogéneket és tumor szuppresszor géneket és ennek következményeként génexpresszió-változásokat is tapasztalhatunk. A (proto)onkogének és tumor szuppresszor gének expressziójának változásai, és az azokat esetleg okozó szomatikus genetikai eltérések (mutáció, amplifikáció, stb.) már évekkal megelőzhetik a manifeszt daganat kialakulását, így már pretumoros, preblasztomatózisos (premorbid) állapotban is detektálhatók. Egyes gének expressziójának változása figyelmeztethet a veszélyre a betegség megjelenése előtt, vagy annak kezdetén, így lehetőség nyílhat a veszélyeztetett csoportok kiemelésére, a káros hatás megszüntetésére, mielőtt a betegség kialakulna. Például a *Ha-ras* expresszió-emelkedése a kémiai karcinogén expozíciót is jelezhet, a *p53* pedig a DNS károsodást, illetve a hibák javítását. A policiklusos aromás szénhidrogénekkel való expozíció és a vérben mért addukt szintek illetve a vizeletben mért metabolitok mennyisége nem mindig ad pontos egyezést az epidemiológiai felmérések által gyűjtött adatokkal. Ezért is szükségesnek látszik új biomarkerek bevezetése, melyekkel pontosabb képet kaphatunk az expozícióról és a

korai biológiai hatásról. Ehhez a daganatképződésben érintett gének alkalmazása lehet az egyik járható út.

A megfelelő biológiai mintához nem mindig könnyű hozzáférni, mert az embereket főleg populációs szintű vizsgálatoknál, nem tehetjük ki nagy invazivitással járó eljárásoknak. Az állatkísérletekben jól vizsgálható célszerveket így más mintával kell helyettesíteni. Ilyen lehet például a perifériás vér.

## Kérdések

- Makroszkópos- és mikroszkópos daganat megjelenése előtt történnek-e potenciális, marker értékű génexpresszió-változások karcinogén expozíció hatására?
- Az esetlegesen korán meglévő elváltozások értékelhetők-e a premalignus és malignus stádiumban is?
- Milyen összefüggés van a korai és a késői elváltozások között (diagnosztika, prevenció szempontjából)?
- A célszervek mellett a perifériás vérből nyert fehérvérsejtek alkalmasak-e a karcinogén hatás jelzésére, hasonló értékeket mutatnak-e a célszervekben mért génexpresszió-változásokkal?
- A kémiai karcinogén indukálta génexpresszió-változást mennyiben lehet befolyásolni potenciális daganatmegelőző szerrel?
- Alkalmas lehet-e az általunk felállított *in vivo* tesztrendszer kemopreventívumok tesztelésére is?

A kérdések megválaszolására Ph.D. dolgozat kísérletes tematikája négy részre osztható:

1. A kémiai karcinogén expozíciót követő korai génexpresszió-változásokat - mint potenciális korai biomarkerek - vizsgálata különböző szervekben.
2. A kémiai karcinogén expozíciót követő hosszú távú génexpresszió-változások vizsgálata különböző szervekben.
3. Karcinogénnel indukált génexpresszió-változások egyidejű vizsgálata könnyen hozzáférhető biológiai mintában és a feltételezett célszervekben.
4. Karcinogénnel indukált génexpresszió-változások vizsgálata feltételezetten daganatellenes hatású szer hatására különböző szervekben.

## Anyag és módszer

A szöveti károsodás és a toxikus hatás megállapítására elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá CBA/Ca egerek máját DMBA (7,12-dimetil-benz( $\alpha$ )antracén) és 1-NP (1-nitropirén) kezelés után 48 órával.

A DMBA és az 1-NP mellett az avas olaj hatását vizsgáltuk. A különböző szervekben megfigyelt korai (24-48 órás) és későbbi (1, 3, 6 és 12 hónap) génextpresszió-változásokat egybevetettük a különböző időpontokban észlelt génextpresszió-változásokkal és az irodalomban talált, illetve saját kísérleti rendszerünkben megfigyelt karcinogén indukálta génextpresszió és daganatok előfordulásával. A követéses vizsgálatban egy évig figyeltük a karcinogén expozícióra adott génextpresszió-választ. Az eredmények elemzése után következtettünk arra, hogy mely gének expresszió-változása alkalmas leginkább behatároló biomarkernek. A dot blot technikát egyszerű kezelhetősége és jó kvantifikálhatósága miatt választottuk.

A korai, manifeszt daganatot megelőző génextpresszió vizsgálat humán diagnosztikában potenciális biomarkerként történő felhasználásának lehetőségét állatkísérletekben teszteltük. A kísérleteket kémiai karcinogénekre érzékeny CBA/Ca egerekkel és Long-Evans patkányokkal végeztük. Feltételezeten daganatellenes hatású szerek közül egy kalcion származékot, az E-2-(4'-metoxi-benzilidén)-1-benzosuberont (MBB) választottuk.

Felvetődött a megfelelő oldószer kiválasztásának szükségessége is. Az apoláros policiklusos aromás vegyületek jól oldódnak DMSO-ban és olajban. Orális és i.p. (intraperitoneálisan - hasüregbe oltva) bejuttatva is aktív a DMBA a mikronukleusz teszt szerint. Más-más időpontban található a legtöbb mikronukleusz ha kukorica olajban, vagy DMSO-ban oldjuk a DMBA-t. Kukorica olajban oldva 24 óra körül van a csúcs, míg DMSO-ban oldva 48 óra körül figyelhető meg, az eritropoezis drámai csökkenése mellett. A fenti eredményeket megfontolva a kukorica olaj használata mellett döntöttünk.

### Elektronmikroszkópos vizsgálat

Szöveti előkészítés a vér kimosásával kezdődött a szervekből foszfát pufferrel (0,1 M, pH 7,4), majd perfúziós fixálás következett (4% paraformaldehid + 1% glutáraldehid foszfát pufferben oldva). Az utófixálás (kivett szerv) 1 éjelen át tartott (4% paraformaldehid + 1% glutáraldehid, foszfát pufferben – immerziós fixálási módszerrel), ezt mosás foszfát pufferrel

(0,1 M, pH 7,4), fixálás  $\text{OsO}_4$ -al (2%  $\text{OsO}_4$  0,2 M foszfát pufferben oldva) 1 órán át 4 °C-on és ismét mosás foszfát pufferrel (0,1 M, pH 7,4) követte. A víztelenítés felszálló alkoholsorral (50-, 70-, 90-, 96%-os és abszolút alkohol) történt, közben kontrasztosítás volt blokkban 10-10 percre, a 70%-os alkohalnál uranyl acetáttal. Ezt mosás telített alkohollal (2x20 perc) és propilén-oxidban (2x5 perc) követte, majd kezelés műgyanta (Durcupan): propilén-oxid 1:1 arányú keverékével 30 percre és műgyantával (Durcupan) 1 éjelen át. Blokk készítés (zselatin kapszulába kerül a minta) és polimerizáció (48 órán át 56 °C-on) zárta az előkészítést.

Félvékony metszet készítése (festés toluidin oldattal) és ultravékony metszet készítése után következett az elektronmikroszkópos vizsgálat.

### RNS izolálás

A cervikális diszlokációval előlt állatokból származó szervek mosása fiziológiás sóoldattal, homogenizálás (100 mg szövet/1 ml TRIZOL (GIBCO) oldatban). Az izolálást 1 ml homogenizátumból kiindulva a gyártó (GIBCO) által leírt módon végeztük. A minta nukleinsav/fehérje arányát ellenőriztük fotometrálassal ( $A_{260}/A_{280} > 1,8$ ).

### Az RNS blotolása:

A blottert beáztatjuk DEPC-vízbe (DEPC: dietil-pirokarbonát), legalább 1 órára, majd fülke alatt megszáritottuk, a membránt (Hybond+, Amersham) beáztattuk 5XSSC-be (DEPC-es), 15 percre, majd a membránt ráhelyeztük a blotterre (Hoefler), bekapcsolt szívásnál szeretjük össze a készüléket. 50  $\mu\text{l}$  20x SSC-t (DEPC-es) átszívattunk minden lyukon, majd a mintákat és a pozitív-negatív kontrollokat tartalmazó oldatokat (50-50  $\mu\text{l}$ ), ezt követte 50  $\mu\text{l}$  20x SSC-t (DEPC-es) átszívása minden lyukon. Szívás alatt szétszedtük a készüléket, a membránt áztattuk DEPC-es 0,4 n NaOH-ban 2 percre és mosástuk DEPC-es 5x SSC-ben 1 percre. A nukleinsav fixálást UV fényel (10 percre) végeztük.

### Hibridizálás

A próba fluoreszcens jelölését ECL kittel (Amersham) végeztük a gyártó útmutatása szerint. A hibridizálás ugyancsak a fenti gyártó ajánlása szerint történt 42 °C-os inkubálással egy éjszakán át. Folpack foliába csomagolt membránt röntgen kazettába helyeztük, majd a filmet előhívtuk 0,5-2 óra múlva. A kapott eredményt Quantiscan szoftver segítségével értékeltük ki.

## Eredmények

A kísérletek eredményei szerint elsősorban a *ras* és a *p53* gének expressziójának emelkedése (mRNS szinten vizsgált) mutatja a karcinogén expozíciót. A *c-myc* mRNS-e gyorsan lebomlik, így feltehetőleg metodikai okokból nem adott értékelhető eredményt. A karcinogén anyag adását követő 24. és 48. órában (ekkor még viszonylag magas a karcinogén anyag koncentrációja a szervezetben) a *ras* és a *p53* gének expresszió-emelkedése jelezte a karcinogén expozíciót. A karcinogén anyagok közül a DMBA-val kezelt állatok esetében magasabb expressziós értékeket mértünk amint az 1-nitropirénnel kezeltéknél. Az 1-nitropirénnel végzett hosszú távú kísérletben nem kaptunk egyértelmű összefüggést a karcinogén koncentráció és a génexpresszió-változás között. Összességében megállapítható, hogy - karcinogén anyagtól függő mértékben - egyes gének expresszió-változása jelezheti a karcinogén expozíciót. A dolgozatban a *ras* és *p53* gének különböző szervekben mért expresszió-emelkedése korrelált - az expozíciót követő két napon belül - expozícióval.

A perifériás vérből származó fehérvérsejtekben mért génexpresszió-emelkedés - a különböző szervekben mért értékekhez hasonlóan - kimutatható volt és az 1-nitropirén esetében kevésbé, a DMBA esetében kifejezettebben utalt a *Ha-ras* és a *p53* expresszió-emelkedés a karcinogén expozícióra.

A karcinogén anyaggal (DMBA) indukált rövid távú génexpresszió-emelkedést csökkenteni tudtuk potenciális daganatellenes szer (E-2-(4'-metoxi-benzilidén)-1-benzoszuberon (MBB)) egyidejű adásával *ras* és a *p53* gének esetében. Ez utóbbi eredmény megerősíti azt, hogy e két gén expresszió-emelkedése a karcinogén hatást jelzi.

## Megbeszélés

A feltett kérdésekre a következő válaszokat kaptuk:

- A *c-myc*, *ras* és a *p53* gének közül a *ras* és a *p53* gének képesek voltak jelezni karcinogén anyagok (1-nitropirén, DMBA, és az avas olaj) expozíciójának korai hatását, expressziójuk emelkedésével 24 és 48 órával a kezelés után az állatok szerveiben.
- Az expozíciót követő későbbi időpontokban (1, 3, 6 és 12 hónappal a kezelés után) azonban az 1-nitropirén esetében nem tudtunk kimutatni a karcinogén expozícióra utaló expresszió-változást a vizsgált szervekben és génekben. A karcinogén anyag hatására bekövetkező génexpresszió-emelkedés tehát átmenetinek mondható kísérleti rendszerünkben (korai, behatároló biomarker).
- A perifériás vérből származó fehérvérsejtekben mért génexpresszió-emelkedés az esetek zömében jó összefüggést mutat a célszervekben mértekkel. Az 1-nitropirén esetében kevésbé, a DMBA esetében kifejezettebben utalt a *Ha-ras* és a *p53* expresszió-emelkedés a karcinogén expozícióra fehérvérsejtekben.
- A karcinogén anyaggal (DMBA) indukált rövid távú génexpresszió-emelkedést csökkenteni tudtuk potenciális daganatellenes szer (MBB) egyidejű adásával *ras* és a *p53* gének esetében. Ez utóbbi eredmény megerősíti azt, hogy e két gén expresszió-emelkedése a karcinogén hatást jelzi, mivel az MBB a reaktív karcinogén metabolitok kialakulásának gátlásával csökkenti az aktív karcinogén formák mennyiségét, így az azok indukálta génexpresszió következetesen alacsonyabb volt.

A dolgozat eredményei bizonyították a felhasznált állatmodell alkalmazhatóságát karcinogén expozíció és kemopreventív szer hatásának kimutatására és előrevetítik az mRNS-szintű génexpresszió-változás későbbi humán alkalmazhatóságának lehetőségét.



## **A tézisek alapját képező, folyóiratban megjelent közlemények**

Gyöngyi Zoltán: Az in vivo onko/szuppresszorgén expresszió és karcinogén expozíció lehetséges összefüggései. *Orvosképzés* 5-6: 213-228, 1999.

István Ember, Zsuzsa Pusztai, Zoltán Gyöngyi, István Kiss: 1-nitropyrene induces elevated expression of oncogenes and tumor suppressor genes 24 hours after treatment in CBA/Ca mice. *Anticancer Research* 20(3): 1563-6, 2000.

Pál Perjési, Zoltán Gyöngyi, Zsuzsa Bayer: Effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz-(a)anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo II: a 48-hour experiment. *Anticancer Research* 20(3): 1839-48, 2000.

István Ember, István Kiss, Zoltán Gyöngyi, Csaba Varga: Comparison of early onco/suppressor gene expressions in peripheral leukocytes and potential target organs of rats exposed to the carcinogenic 1-nitropyrene. *European Journal of Cancer Prevention* 9: 439-42, 2000.

Zoltán Gyöngyi, Edit Nádasi, Csaba Varga, István Kiss and István Ember: "Long-term" effects of 1-nitropyrene on oncogene and tumor suppressor gene expression. *Anticancer Research* 21(6): 3937-3940, 2001.

Zoltán Gyöngyi, István Ember, István Kiss, Csaba Varga: Changes in expression of onco- and suppressor genes in peripheral leukocytes - as potential biomarkers of chemical carcinogenesis in a surrogate tissue. *Anticancer Research* 21(5): 3377-80, 2001.

Pál Perjési, Zoltán Pintér, Zoltán Gyöngyi and István Ember: Effect of rancid oil on some onco/suppressor gene expression in vivo. A short-term study. *Anticancer Research* 22: 225-230, 2002.

**A jelölt impakt faktorral rendelkező folyóiratokban megjelent, a tézisekben nem szereplő közleményei**

István Ember, Zoltán Gyöngyi, István Kiss, Nowrasteh Ghodratollah and István Arany: The possible relationship between onco/suppressor gene expression and carcinogen exposure *in vivo*: Evaluation of a potential biomarker in preventive and predictive medicine. *Anticancer Research* 22(4): 2109-2116, 2002.

Zoltán Gyöngyi, László Grama, Edit Nádas, János Sándor, Árpád Németh, Csaba Varga, István Kiss and István Ember: Flow cytometric analysis of DMBA-induced early *in vivo* ras expression. *In vivo* 16: 307-310, 2002.

Árpád Németh, Zoltán Gyöngyi, Edit Nádas, Ágoston Ember, Lajos Olasz, Zoltán Nyárády, József Skapinyecz and István Ember: Effect of cisplatin treatment on early activation of oncogenes *in vivo*. *In vivo* 16: 323-326, 2002.