

Genetyczna analiza polimorfizmów genów naprawy DNA przez rekombinację niehomologiczną *Ku70* i *Ligazy IV* u kobiet z rakiem piersi w wieku pomenopauzalnym

*Genetic analysis of the polymorphisms in nonhomologous DNA end joining gene *Ku70* and *Ligase IV* in postmenopausal breast cancer women*

Hanna Romanowicz-Makowska¹, Beata Smolarz¹, Ireneusz Połać², Jakub Baszczyński³, Bogusław Westfal³, Rafał Maciejczyk³, Marek Zadrożny³

¹Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Pracowni: prof. dr hab. n. med. Andrzej Kulig

²Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Tomasz Pertyński

³Klinika Chirurgii Onkologicznej i Chorób Piersi, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Marek Zadrożny

Przeгляд Menopauzalny 2010; 5: 296–299

Streszczenie

Wstęp: Rak piersi jest główną przyczyną śmierci kobiet na świecie. Podwójne pęknięcia DNA powodują niestabilność genomu, co prowadzi do nowotworów; są naprawiane przez dwa szlaki – rekombinację homologiczną i niehomologiczną. Nie wiadomo, jaką rolę odgrywają one w raku piersi.

Materiał i metody: W pracy badano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmu A46922G genu *Ku70* oraz polimorfizmu A6008G (Ile591Val) genu *Ligazy IV* u kobiet z rakiem piersi. Analiza polimorfizmów została przeprowadzona z zastosowaniem metody PCR-RFLP u 135 chorych na raka piersi.

Wyniki: Rozkład genotypów polimorfizmu A46922G genu *Ku70* u pacjentów różnił się znacząco ($p < 0,05$) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Stwierdzono znaczące różnice w częstości alleli między grupą z rakiem piersi a grupą kontrolną ($p < 0,05$). Jednakże rozkład genotypów polimorfizmu A6008G genu *Ligazy IV* nie różnił się znacząco między pacjentami a grupą kontrolną ($p > 0,05$) i nie odbiegał od prawa Hardy'ego-Weinberga.

Wnioski: Wyniki sugerują, że polimorfizm A46922G genu *Ku70* może być związany z rakiem piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym z regionu łódzkiego.

Słowa kluczowe: *Ku70*, *Ligaza IV*, NHEJ, rak piersi, polimorfizm genetyczny.

Summary

Aim: Breast cancer is one of the major killers worldwide. Aberrant double-stranded break (DSB) repair leads to genomic instability, which is a hallmark of malignant cells. Double-stranded breaks are repaired by two pathways: homologous recombination (HR) and nonhomologous DNA end joining (NHEJ). It is not known whether these repair pathways are affected in sporadic breast tumours.

Material and methods: In the present work the distribution of genotypes and frequency of alleles of the *Ku70* gene, A46922G polymorphism and *Ligase IV*, A6008G (Ile591Val) polymorphism in breast cancer women were investigated. The genetic polymorphisms analysis was performed using a PCR-RFLP method in 135 sporadic breast cancer cases.

Results: The distribution of the genotypes of the A46922G polymorphism of the *Ku70* gene in patients differed significantly ($p < 0.05$) from those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium. There were significant differences in the frequencies of alleles between the breast cancer subjects and controls ($p < 0.05$). However,

Adres do korespondencji:

Hanna Romanowicz, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. +48 42 271 12 80, faks +48 42 271 14 21

the distribution of the genotypes of the A6008G polymorphism of *Ligase IV* in both control and patients did not differ significantly ($p > 0.05$) from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution.

Conclusion: The results support the hypothesis that the A46922G polymorphism of the *Ku70* gene may be associated with the incidence of breast cancer in postmenopausal women from the Łódź region of Poland.

Key words: *Ku70*, *Ligase IV*, NHEJ, breast cancer, gene polymorphism.

Wstęp

Rak piersi dotyka co dziesiątą kobietę w krajach uprzemysłowionych i jest główną przyczyną śmierci żeńskiej części populacji. Zmiany w obrębie genomu, takie jak translokacje, delecje i duplikacje, są częste w komórkach rakowych, szczególnie w komórkach raka piersi [1–6]. Zmiany w genomie spowodowane są zaburzeniami w naprawie DNA przede wszystkim pęknięć dwuniciowych (*double-strand breaks* – DSB).

Podwójne pęknięcia DNA są dla komórki śmiertelne w największym stopniu ze wszystkich uszkodzeń DNA. Jeżeli nie nastąpi ich naprawa, dochodzi do utraty fragmentów chromosomów. Kumulowane DSB powodują destabilizację genomu, zmiany w transkrypcji genów, a co za tym idzie – rozwój nowotworów [7, 8]. Pęknięcia dwuniciowe są naprawiane przez dwa mechanizmy – rekombinację homologiczną (*homologous recombination* – HR) i niehomologiczną (*nonhomologous end joining* – NHEJ) [9, 10].

Szlak naprawy przez rekombinację homologiczną umożliwia usunięcie uszkodzenia, jednocześnie zapewniając dużą wierność odtwarzania pierwotnej sekwencji zmodyfikowanego DNA. Jako matryca w naprawie uszkodzonego chromosomu wykorzystywana jest cząsteczka DNA cechująca się homologią sekwencyjną. Zwykle stanowi ją nieszkodzony homolog tego chromosomu. Szlak naprawy DNA przez NHEJ umożliwia połączenie pękniętych nici, nie wymagając istnienia homologii między nimi, system ten cechuje się więc małą wiernością odtwarzania sekwencji wyjściowej. Pomimo to może on stanowić główny szlak naprawy DSB w komórkach ssaków.

Pierwszy etap NHEJ związany jest z przyłączeniem do uszkodzonego DNA heterodimeru składającego się z białek *Ku70* (kodowanego przez *XRCC6*) i *Ku80* (kodowanego przez *XRCC5*). Białka *Ku*, DNA-PK oraz *XRCC4* przyczyniają się do zbliżenia do siebie końców pękniętych cząsteczek [11]. Związany z końcami nici DNA kompleks *XRCC4-Ligaza IV* dokonuje ligacji pękniętych cząsteczek, co stanowi ostatni etap NHEJ [10].

Ponieważ polimorfizm pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphism* – SNP) jest bardzo częsty w ludzkim genomie [12], w pracy wybrano SNP w genach szlaku naprawy NHEJ, takich jak *Ku70* i *Ligaza IV* do określenia ich wpływu na rozwój raka piersi.

Cel pracy

Celem badań było określenie związku między polimorfizmem A46922G genu *Ku70* oraz polimorfizmem

A6008G (Ile591Val) genu *Ligazy IV* a ryzykiem raka piersi u kobiet po menopauzie.

Materiały i metody

Pacjentki

Pobrano krew od 135 kobiet w wieku pomenopauzalnym chorych na raka piersi, u których stwierdzono brak ($n = 55$) lub obecność przerzutów ($n = 80$) do okolicznych węzłów chłonnych. Pacjentki były w wieku 43–82 lat (średnia wieku 58 lat). Średni rozmiar guza wynosił 20 mm (17–32 mm). Wszystkie nowotwory zostały sklasyfikowane wg skali Scarfa-Blooma-Richardsona. Było 31 (23,0%) nowotworów stopnia I, 81 (60,7%) stopnia II i 23 (16,3%) stopnia III. W badaniu kontrolnym zastosowano krew osób, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej ($n = 60$).

Genotypowanie

DNA do badań izolowano z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu DNA Mini Kit (Qiagen). Genotypowanie w grupie badanej i kontrolnej wybranych polimorfizmów zostało przeprowadzone z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP.

Mieszanina reakcyjna (25 μ l) obejmowała: 60 ng DNA (2 μ l), 0,2 μ M startery (0,5 μ l każdego), 50 μ M dNTP (deoksynukleotodotrifosforany) (2,5 μ l), 2,5 μ l buforu 10 \times Taq, 1 U polimerazy Taq (Qiagen, Germany) (2,5 μ l). Reakcję prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono, stosując program komputerowy STATISTICA w wersji 5.0 (StatSoft, Inc.). Wynik uznawano za istotny statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$. Analiza statystyczna rozkładu genotypów oraz alleli w grupie badanej i kontrolnej przeprowadzona została po wcześniejszym potwierdzeniu, że otrzymane układy pozostają w stanie równowagi wg reguły Hardy’ego-Weinberga.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono rozkład genotypów polimorfizmu genu *Ku70* w grupie chorych na raka piersi

i kontrolnej. Stwierdzono statystycznie znaczące różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi grupami. Częstości alleli G i A wynosiły 0,65/0,35 w grupie badanej, a 0,54/0,46 w grupie kontrolnej. U pacjentów częstości genotypów G/G, G/A i A/A różniły się znacząco ($p < 0,05$) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga.

Rozkład genotypów A/A, A/G i G/G polimorfizmu genu *Ligazy IV*, podobnie jak częstości alleli A i G, przedstawiono w tabeli II. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$) między badanymi grupami.

Zależność rozkładu genotypów i częstości alleli od stopnia zaawansowania nowotworu wg skali Scarfa-

-Bloom-Richardsona przedstawiono w tabelach III i IV. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między badanymi grupami ($p > 0,05$). Wszystkie rozkłady były zgodne z prawem Hardy'ego-Weinberga.

Dyskusja

DNA jest bardzo precyzyjną cząsteczką, która koduje informacje o składzie i funkcjonowaniu komórek. Uszkodzenia DNA mogą zatem prowadzić do zahamowania cyklu komórkowego, śmierci komórki lub mutacji.

Tab. I. Rozkład genotypów A/A, G/A i G/G oraz częstości alleli A i G genu *Ku70* u chorych na raka piersi ($n = 135$) i w grupie kontrolnej ($n = 60$)

	Pacjentki z rakiem piersi		Kobiety z grupy kontrolnej	
	liczba	częstość	liczba	częstość
G/G	70	0,52	15	0,25
G/A	35	0,26	35	0,58
A/A	30	0,22	10	0,17
χ^2	25,15 ^a		1,83 ^b	
G	175	0,65	65	0,54
A	95	0,35	55	0,46

^a $p < 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^b $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Tab. II. Rozkład genotypów A/A, A/G i G/G i częstości alleli A i G polimorfizmu genu *Ligazy IV* u chorych na raka piersi ($n = 135$) i w grupie kontrolnej ($n = 60$)

	Pacjentki z rakiem piersi		Kobiety z grupy kontrolnej	
	liczba	częstość	liczba	częstość
A/A	40	0,30	18	0,17
A/G	75	0,56	58	0,55
G/G	20	0,15	30	0,28
χ^2	2,50 ^a		1,261 ^b	
A	155	0,57	94	0,44
G	115	0,43	118	0,56

^a $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^b $p > 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną

Tab. III. Rozkład genotypów i częstości alleli genu *Ku70* u chorych z różnym stopniem zaawansowania raka piersi ($n = 135$)

	Stopień ^a					
	I		II		III	
	liczba	częstość	liczba	częstość	liczba	częstość
G/G	20	0,65	56	0,69	12	0,52
G/A	10	0,32	22	0,27	8	0,35
A/A	1	0,03	3	0,04	3	0,13
G	50	0,81	134	0,83	32	0,70
A	12	0,19	28	0,17	14	0,30
χ^2	0,03 ^b		0,20 ^b		0,73 ^b	

^awg skali Scarfa-Bloom-Richardsona; ^b $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Tab. IV. Rozkład genotypów i częstości alleli genu *Ligazy IV* u chorych o różnym stopniu zaawansowania raka piersi ($n = 135$)

	Stopień ^a					
	I		II		III	
	liczba	częstość	liczba	częstość	liczba	częstość
A/A	19	0,61	41	0,51	21	0,87
A/G	9	0,29	32	0,39	2	0,09
G/G	3	0,10	8	0,1	1	0,04
A	47	0,76	114	0,71	32	0,91
G	15	0,24	48	0,30	14	0,81
χ^2	1,34 ^b		0,22 ^b		4,7 ^b	

^awg skali Scarfa-Bloom-Richardsona; ^b $p > 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

W systemie naprawy NHEJ białka Ku70 i Ku80 wiążą się do podwójnych pęknięć DNA. Do tego procesu potrzebna jest aktywacja białkowej kinazy DNA (DNA-PK). Kinaza ta wymaga obecności XRCC4 oraz Ligazy IV (LIG4), aby mogło dojść do naprawy uszkodzenia.

Zmiany w genach uczestniczących w naprawie podwójnych pęknięć DNA mogą wpływać na zwiększoną szansę rozwoju raka piersi. Celem prezentowanych badań było określenie, czy warianty polimorficzne w wybranych genach NHEJ, takich jak *Ku70* i *LIG4*, mogą przyczyniać się do rozwoju raka piersi

Kuschel i wsp. sugerują, że warianty w genach *XRCC4* i *LIG4* wpływają na ryzyko raka piersi wraz z wariantami w genie *XRCC3*. Warianty polimorficzne genu *XRCC2* podwyższają natomiast *LIG4* i zmniejszają ryzyko tego nowotworu [13].

Polimorfizm 1310C→G w genie *Ku70* oraz polimorfizm 2099-2408G>A w genie *Ku80* są czynnikami ryzyka raka piersi oraz chromosomalnej wrażliwości na radioterapię. Homozygotyczny wariant genotypu 1781G→T (*Ku70*) wydaje się pełnić funkcję ochronną przed rozwojem raka piersi [14].

Dane z piśmiennictwa wskazują, że polimorfizmy SNPs w *Ku70* i *XRCC4* mogą być związane z ryzykiem raka piersi [15].

Fu i wsp. określili 30 SNP w 5 genach NHEJ (*Ku70*, *Ku80*, *DNA-PKcs*, *Ligaza IV* i *XRCC4*) we wczesnym raku piersi. Dwa SNP – w *Ku70* i *XRCC4* – korelowały z ryzykiem raka piersi [16].

U kobiet w wieku przedmenopauzalnym cztery warianty pozostają w związku z rakiem piersi – dwa w genie *XPF* i dwa w genie *XRCC3* [17].

W prezentowanej pracy nie znaleziono związku między występowaniem raka piersi a polimorfizmem genu *LIG4* u polskich kobiet. Jednakże stwierdzono statystycznie istotne różnice w rozkładzie częstości alleli A i G genu *Ku70* między pacjentami a kontrolą grupą osób zdrowych ($p < 0,05$). Rozkład genotypów G/G, G/A i A/A u pacjentów różnił się od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga, z nadekspresją homozygoty G/G. Jest możliwe, że obecność allelu G pozostaje w związku z innymi niezidentyfikowanymi jeszcze mutacjami zlokalizowanymi poza kodującym regionem genu *Ku70*, co może być istotne dla stężenia białka Ku70 w osoczu.

Badania sugerują, że polimorfizm genu *Ku70* może być związany z ryzykiem raka piersi u polskich kobiet, jednak aby potwierdzić to przypuszczenie, konieczne jest przeprowadzenie badań na większej populacji.

Piśmiennictwo

- Davidson JM, Gorringer KL, Chin SF, et al. Molecular cytogenetic analysis of breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000; 83: 1309-17.
- Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, et al. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000; 60: 4519-25.
- Kytola S, Rummukainen J, Nordgren A, et al. Chromosomal alterations in 15 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 308-17.
- Loveday RL, Greenman J, Simcox DL, et al. Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer* 2000; 86: 494-500.
- Romanowicz H, Smolarz B, Fiks T, et al. Znaczenie mechanizmu naprawy DNA błędnie sparowanych zasad azotowych (MMR) w raku piersi. *Przegl Menopauz* 2010; 2: 95-100.
- Sobczuk A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Pertyński T. Rola polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w obrębie genów mechanizmów naprawy DNA przez rekombinację RAD51, XRCC2, XRCC3 i XRCC4 w patogenezie raka piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym. *Przegl Menopauz* 2009; 4: 228-32.
- Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, et al. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 2006; 441: 1011-4.
- Vijg J, Dolle ME. Large genome rearrangements as a primary cause of aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 907-15.
- Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23: 687-96.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* 2003; 532: 103-15.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 712-20.
- Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, et al. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7624-9.
- Kirk BW, Feinsod M, Favis R, et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3295-311.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1399-407.
- Willems P, Claes K, Baeyens A, et al. Polymorphisms in nonhomologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 137-48.
- Fu YP, Yu JC, Cheng TC, et al. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 2003; 63: 2440-6.
- Han J, Haiman C, Niu T, et al. Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 613-22.