

Polimorfizm 5A/6A regionu promotorowego genu metaloproteazy 3 (MMP-3) u kobiet z rakiem jajnika w okresie menopauzalnym

The 5A/6A promoter polymorphism of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) gene in menopausal women with ovarian cancer

Krzysztof Szyłło¹, Beata Smolarz², Hanna Romanowicz-Makowska², Elżbieta Kozłowska², Mariusz Niewiadomski¹, Tomasz Rechberger³, Andrzej Kulig²

Metaloproteazy macierzowe obejmują rodzinę enzymów proteolitycznych, które degradują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, umożliwiając inwazję komórkom rakowym. Zwiększenie ekspresji genu metaloproteazy 3 (MMP-3 lub stromielizyna 1) stwierdza się w różnych nowotworach, a wysoki poziom kodowanego przez ten gen białka jest złym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów. Polimorfizm insercyjno 6A/delecyjny 5A (polimorfizm 5A/6A) w regionie promotorowym genu MMP-3 może odgrywać istotną rolę w regulacji jego ekspresji.

Materiały i metody: W pracy badano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmu 5A/6A u chorych na raka jajnika. Próbkę tkanek z guzów jajnika utrwalonych w parafinie uzyskano od 50 kobiet w okresie menopauzalnym. Polimorfizm 5A/6A został określony poprzez reakcję łańcuchową polimerazy (PCR).

Wyniki: Rozkład genotypów w grupie badanej i kontrolnej nie różnił się od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstości alleli pomiędzy grupami o różnym stopniu zaawansowania nowotworu.

Wniosek: Wyniki sugerują, że polimorfizm 5A/6A może nie być związany z występowaniem i rozwojem raka jajnika, jednakże konieczna jest analiza większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

Słowa kluczowe: gen MMP-3, polimorfizm genowy, rak jajnika, menopauza, PCR

(Przegląd Menopauzalny 2002, 3: 21–25)

¹ Klinika Ginekologii Operacyjnej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: dr n. med. Krzysztof Szyłło

² Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

³ II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie, kierownik Kliniki: prof. zw. dr hab. med. Jerzy Jakowicki



Proces progresji nowotworów charakteryzuje się złożonym, wieloetapowym przebiegiem [22]. Jednym z pierwszych mechanizmów aktywowanym podczas inwazji i metastazy nowotworu jest proteoliza, zachodząca przy udziale różnych typów enzymów proteolitycznych: proteaz cysteinowych (katepsyn B, H i L), proteaz aspartylowych (katepsyna D), proteaz serynowych (białka układu aktywacji plazminogenu i plazmina) oraz metaloproteaz (MMP) [13, 17, 18]. W wyniku skoordynowanego działania metaloproteaz macierzowych oraz ich inhibitorów dochodzi do degradacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz błony podstawnej, co umożliwia migrację komórek nowotworowych [3, 15]. MMP obejmują rodzinę 17 enzymów proteolitycznych: kolagenaz, żelatynaz oraz stromielizyn, które w prawidłowych warunkach fizjologicznych uczestniczą w procesach remodelingu tkanek. Niektóre spośród metaloproteaz posiadają zdolność degradacji kolagenu typu I, II oraz III [12].

W chorobach nowotworowych obserwuje się zmianę poziomu ekspresji następujących metaloproteaz: MMP-1, MMP-2, MMP-3 oraz MMP-9, której konsekwencją jest zmiana poziomu kodowanego białka. Podwyższony poziom tych białek jest skorelowany z krótszym okresem bez nawrotu choroby i krótszym czasem przeżycia u chorych na różne nowotwory [1, 2, 6, 7, 9, 12, 16].

Zmiany syntezy MMP-3 są zazwyczaj poprzedzane zmianami w transkrypcji genu i poziomie mRNA, dlatego też wkład w syntezę MMP-3 może mieć zmienność sekwencji genu [10, 14]. *Gen MMP-3* jest polimorficzny i wobec znaczącej roli metaloproteaz w progresji nowotworów ważne wydaje się poznanie roli polimorfizmów w rozwoju raka [25]. Polimorfizm 5A/6A zlokalizowany w regionie promotorowym genu *MMP-3* może mieć istotny wpływ na regulację jego ekspresji. Większość badań wskazuje, że polimorfizm 5A/6A może być związany z rozwojem niektórych chorób sercowo-naczyniowych [21, 25], lecz niewiele wiadomo o jego roli w chorobach nowotworowych. W obecnej pracy badano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmu 5A/6A u chorych na raka jajnika.

Materiał i metody

Pacjenci. Materiał do badań stanowiły próbki tkanek pobrane od 50 pacjentek w okresie menopauzalnym, u których badaniem histopatologicznym stwierdzono raka jajnika. Próbki tkanek z guzów jajnika były utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie. Stopień zaawansowania nowotworu oceniany był wg klasyfikacji FIGO (ang. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*). Grupę kontrolną stanowiły próbki krwi pobrane od 50 dojrzałych wiekowo kobiet, u których nie stwierdzono występowania raka jajnika.

Izolowanie DNA. DNA do badań izolowano z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu OIAmp Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy).

Oznaczanie polimorfizmu 5A/6A. Polimorfizm 5A/6A obszaru promotorowego genu *MMP-3* był określany poprzez reakcję PCR ze starterami allelospecyficznymi: 5'-GTA TGG GCT CGT AAAAAG-3' dla allelu 5A i 5'-GTA TGG GCT CGT AAAAAA-3' dla allelu 6A, każdy w oddzielnej reakcji PCR, razem ze starterami: 5'-TGC AGC GCT GGT CGT TAG TGT GACT-3' oraz 5'-GAA CTT ATT CCA GGT TAA GGG TGCTG-3' dla zweryfikowania amplifikacji DNA przy braku odpowiedniego allelu w genomowym DNA. Reakcja PCR została przeprowadzona w termocyklerze DNA Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 2400; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Warunki reakcji PCR były następujące: 30 s w 94°C, 30 s w 57°C, 40 s w 72°C, przez 35 cykli. Mieszanina reakcyjna (25 µl) obejmowała: 30 ng genomowego DNA, 0,2 µmol każdego startera (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Niemcy), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy) and 1 U polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 5-procentowym żelu poliakrylamidowym i po barwieniu bromkiem etydyny obserwowane w świetle UV. Każda próbka przypisywana była do jednego z genotypów: 5A/5A, 5A/6A lub 6A/6A [ryc. 1].

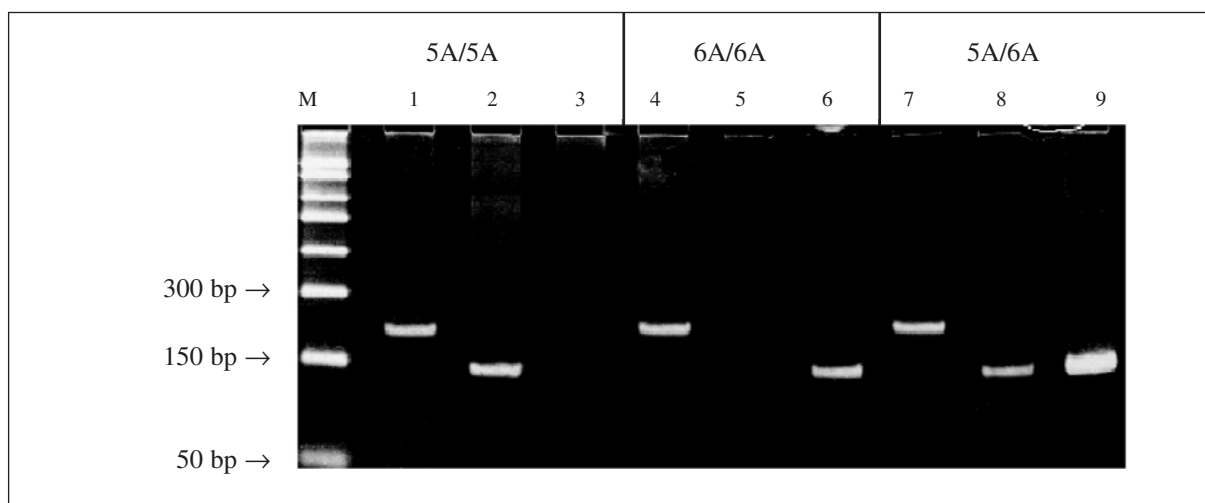
Analiza statystyczna. Rejestrowana liczba każdego z genotypów była porównywana z liczbą oczekiwaną na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga z użyciem testu χ^2 . Istotność różnic pomiędzy częstościami alleli i genotypów dla poszczególnych grup oceniana była testem χ^2 .

Wyniki

Po przeprowadzeniu reakcji PCR wszyscy pacjenci zostali podzieleni na 3 grupy ze względu na ich genotypy: homozygoty 5A/5A i 6A/6A oraz heterozygoty 5A/6A.

W pierwszym etapie badań skoncentrowano się na analizie polimorfizmu 5A/6A u chorych na raka jajnika oraz u osób, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Populacja chorych na nowotwór oraz grupa kontrolna były jednorodne pod względem płci (kobiety) oraz dobrane wiekowo. W grupie chorych nie zaobserwowano związków pomiędzy polimorfizmem 5A/6A a występowaniem raka jajnika. Częstości alleli 5A i 6A w grupie badanej nie różniły się istotnie ($p > 0,05$) od częstości alleli w grupie kontrolnej (tab. I.). Rozkład genotypów w obu przypadkach nie odbiegał od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga.





Ryc. 1. Typowy obraz wyniku allelospecyficznej reakcji PCR przeprowadzonej z fragmentami promotora genu *MMP-3* i analizowanej przez elektroforezę w 5-procentowym żelu poliakryloamidowym. Ścieżki 1, 4 i 7 przedstawiają produkt amplifikacji ze starterem specyficznym dla kontroli; ścieżki 2, 5 i 8 – dla allelu 5A i ścieżki 3, 6 i 9 – dla allelu 6A. M – marker mas cząsteczkowych (SIGMA - ALDRICH, Niemcy)

Badaniom została poddana także grupa pacjentek o różnym stopniu zaawansowania raka jajnika. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładach genotypów i częstości alleli ($p > 0,05$) pomiędzy badanymi grupami. Rozkład genotypów był zgodny z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy'ego-Weinberga (tab. II.).

Dyskusja

Białka z rodziny metaloproteaz macierzowych umożliwiają inwazję komórkom rakowym w wyniku degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Ich działanie jest ściśle związane z regulacją ekspresji kodujących je genów [2]. Wiadomo, że ekspresja genu

MMP-3 podlega zmianom podczas różnorodnych patologicznych procesów, jak inwazja i metastaza nowotworów [9]. Regulacja ekspresji genu *MMP-3* zachodzi w konsekwencji oddziaływania różnych endogennych i egzogennych czynników z odpowiednimi regionami promotora. Konsekwencją zmienionej ekspresji jest zazwyczaj zmiana poziomu białka *MMP-3*, obserwowana u chorych na nowotwory [1, 6, 7, 8, 16]. Przypuszcza się, że zmienność genu może wpływać na zmianę poziomu biosyntezy *MMP-3*.

Położenie polimorfizmu 5A/6A w regionie promotora genu *MMP-3* wskazuje na jego możliwą rolę w regulacji ekspresji genu na poziomie transkrypcji. Przypuszcza się, że polimorfizm 5A/6A może być związany z regulacją aktywności promotora *MMP-3* poprzez czynni-

Tab. I. Rozkład genotypów 5A/5A, 5A/6A oraz 6A/6A i częstości alleli 5A i 6A u chorych na raka jajnika i w grupie kontrolnej

	Pacjenci (n = 50)		Kontrola (n = 50)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
genotyp 5A/5A	14	0,28	13	0,26
genotyp 5A/6A	23	0,46	26	0,52
genotyp 6A/6A	13	0,26	11	0,22
χ^2	0,303 ^a		0,309 ^a	
allel 5A	51	0,51 ^b	52	0,52
allel 6A	49	0,49 ^b	48	0,48

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



Tab. II. Zależność rozkładu genotypów 5A/5A, 5A/6A i 6A/6A oraz częstości alleli 5A i 6A w zależności od stopnia zaawansowania raka jajnika

stopień ^b	I (n = 12)		II (n = 25)		III (n = 13)	
	liczba	częstość	liczba	częstość	liczba	częstość
5A/5A	2	0,17	6	0,24	3	0,23
5A/6A	6	0,50	11	0,44	7	0,54
6A/6A	4	0,33	8	0,32	3	0,23
χ^2	0,010 ^c		0,111 ^c		0,442 ^c	
allel 5A	10	0,42	23	0,46	13	0,50
allel 6A	14	0,58	27	0,54	13	0,50

^an = 50; ^bwg FIGO; ^cp >0,05 w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

ki Ets [11, 24]. Rodzina czynników transkrypcyjnych Ets obejmuje ponad 30 białek, które charakteryzują się obecnością konserwatywnego motywu – domeny ETS. Ets rozpoznają specyficzną sekwencję nukleotydową GGAA/T [20, 23]. Miejsce wiązania dla czynników transkrypcyjnych z rodziny Ets znajduje się w obrębie promotorów genów kodujących metaloproteazy.

Białka z rodziny Erg oraz Ets mogą regulować ekspresję genu *MMP-3* poprzez oddziaływanie z kompleksem białkowym Fos/Jun [11]. Czynniki transkrypcyjne Fos i Jun, produkty onkogenów *jun* oraz *fos*, uczestniczą w tworzeniu białka AP-1, które funkcjonuje jako homodimer Jun/Jun i heterodimer Jun/Fos. Ets stymulują czynnik transkrypcyjny AP-1, który wiąże się w obszarze promotora *MMP-3* [4].

Polimorfizm 5A/6A może być związany z aktywnością promotora genu *MMP-3* i wpływać na jego transkrypcję w wyniku stymulacji niektórych czynników transkrypcyjnych poprzez cytokiny (interleukiny, czynnik martwicy nowotworu α [TNF α]) uwalniane przez komórki nowotworowe [19].

Polimorfizm 5A/6A został przebadany w niektórych chorobach sercowo-naczyniowych [21, 25]. Zauważono, że częstość allelu 5A była znacząco wyższa w porównaniu z 6A. Powyższe wyniki zasugerowały

możliwość zastosowania polimorfizmu 5A/6A jako markera w tych chorobach [21, 25].

W chwili obecnej niewiele wiadomo o znaczeniu polimorfizmu 5A/6A w nowotworach złośliwych. Ze względu na duże znaczenie problemu wczesnego wykrywania i leczenia tych chorób istotne wydaje się zbadanie związków pomiędzy polimorfizmami a występowaniem i rozwojem nowotworów.

W obecnych badaniach, które objęły 50 kobiet w wieku menopauzalnym chorych na raka jajnika nie wykazano związku pomiędzy polimorfizmem 5A/6A a jego występowaniem. Nie było znaczących różnic w częstości alleli 5A i 6A pomiędzy kobietami z rakiem jajnika a grupą kontrolną. Rozkład genotypów u pacjentów i w kontroli nie różnił się od rozkładu Hardy'ego-Weinberga. Poza tym nie znaleziono różnic pomiędzy rozkładem genotypów w grupach o różnym stopniu zaawansowania nowotworu, co wskazuje na brak związku pomiędzy polimorfizmem a rozwojem raka.

Wyniki sugerują, że polimorfizm 5A/6A genu *MMP-3* może nie być bezpośrednio związany z występowaniem i rozwojem raka jajnika, jednakże konieczne są badania większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

Summary

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise family proteolytic enzymes that degrade of extracellular matrix components and therefore play an important role in tumour cell invasion and cancer metastasis. Overexpression of matrix metalloproteinase 3 (MMP-3 or stromelysin 1) gene has been demonstrated in various types of cancers and high level of MMP-3 protein in tumour is a poor prognostic factor for patients. The insertion (6A)/deletion (5A) polymorphism (5A/6A polymorphism) located at the promoter of the MMP-3 gene may have functional significance in the regulation of its expression.

Materials and methods: In the present work the distribution of genotypes and frequencies of alleles of the 5A/6A polymorphism in subjects with ovarian cancer were investigated. Paraffin embedded tumour tissues were obtained from 50 menopausal women with ovarian



cancer. The 5A/6A polymorphism were determined by PCR amplification using the allele specific primers.

Results: The distribution of the genotypes of the 5A/6A polymorphism in both control and patients did not differ significantly ($p > 0.05$) from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution. Additionally, there were no significant differences ($p > 0.05$) in genotype distributions and allele frequencies between subgroups assigned to histological stage.

Conclusion: The results suggest that the 5A/6A polymorphism of MMP-3 gene may not be linked with appearance and development of ovarian cancer but further research, conducted on larger population, are needed to clarify this point.

Key words: MMP-3 gene, gene polymorphism, ovarian cancer, menopause, PCR

Piśmiennictwo:

1. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis 2000; 18: 171-8.
2. Baruch RR, Melinscak H, Lo J. Altered matrix metalloproteinase expression associated with oncogene-mediated cellular transformation and metastasis formation. Cell Biol Int 2001; 25: 411-20.
3. Behrens J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. Breast Cancer Res. Treat 1993; 24: 175-184.
4. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? Matrix Biol 1997; 15: 519-526.
5. Berek JS, Fu YS, Hacker NF. Ovarian cancer. In: Berek J. S., Adashi EY, Hillard PA, eds. Novak's Gynecology. Baltimore: Williams & Wilkins 1996, 1155-1230.
6. Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL. MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. Oral Dis 2000; 6: 376-82.
7. Bodey B, Bodey BJr, Siegel SE. Immunocytochemical detection of matrix metalloproteinase expression in prostate cancer. In-Vivo 2001; 15: 65-70.
8. Bodey B, Bodey BJr, Siegel SE. Immunocytochemical detection of the expression of members of the matrix metalloproteinase family in adenocarcinomas of the pancreas. In-Vivo 2001; 15: 71-76.
9. Bodey B, Bodey BJr, Siegel SE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. In-Vivo 2001; 15: 57-64.
10. Borden P, Heller R. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. Crit Rev Eukaryotic Gene Expr 1997; 7: 159-178.
11. Buttice G, Duterque-Coquillaud M, Basuyaux JP. Erg and Ets family member, differentially regulates human collagenase-1 (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. Oncogene 1996; 13: 2297-2306.
12. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1260-1270.
13. Dano K, Romer J, Nielsen BS. Cancer invasion and tissue remodeling — cooperation of protease systems and cell types. APMIS 1999; 107: 120-127.
14. Delany AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblast. J Cell Biochem 1990; 50: 400-410.
15. Henriët P, Blavier L, DeClerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) and proliferation. APMIS 1999; 107: 111-119.
16. Kolomecki K, Stepień H, Bartos M. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumors. Endocr Regul 2001; 35: 9-16.
17. Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. Eur J Cancer 1998; 34: 214-221.
18. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. Physiol Rev 1993; 73: 161-195.
19. Muller D, Li DQ, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin and gelatinase B in human conjunctival and conjunctivochalasis fibroblasts by interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha. Invest. Ophthalmol. Vis Sci 2000; 41: 2922-2929.
20. Sapi E, Flick M, Rodov S. Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells. Cancer Res 1998; 58: 1027-1033.
21. Satsangi J, Chapman RW, Haldar N. A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis. Gastroenterology 2001; 121: 124-30.
22. Van Noorden JF, Meade-Tollin LC, Bosman FT. Metastasis. Am Sci 1998; 86: 130-141.
23. Wasyluk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. Eur J Biochem 1993; 211: 7-18.
24. White LA, Maute C, Brinckerhoff CE. Ets sites in the promoters of the matrix metalloproteinases collagenase (MMP-1), stromelysin (MMP-3) are auxiliary elements that regulate basal and phorbol-induced transcription. Connect Tissue Res 1997; 36: 321-335.
25. Yoon S, Tromp G, Vongpunsawad RA. Genetic analysis of MMP-3, MMP-9 and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms. Biochem Biophys Res Commun 1999; 265: 563-568.

Adres do korespondencji:

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

