

## Polimorfizm genu *ERCC4/XPF* u kobiet chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym

### *The ERCC4/XPF gene polymorphism in postmenopausal women with breast cancer*

Anna Sobczuk<sup>1</sup>, Beata Smolarz<sup>2</sup>, Hanna Romanowicz-Makowska<sup>2</sup>, Tomasz Pertyński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki;

kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

<sup>2</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki;

kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

Przeгляд Menopauzalny 2008; 2: 81–84

### Streszczenie

**Wstęp:** Gen *ERCC4/XPF* odgrywa ważną rolę w systemie naprawy DNA.

**Cel pracy:** W pracy analizowano polimorfizm Arg415Gln genu *ERCC4/XPF* u chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym.

**Materiały i metody:** Krew do badań uzyskano od 100 kobiet, u których stwierdzono raka piersi i od grupy kontrolnej (n=106). Polimorfizmy zostały określone przy zastosowaniu techniki PCR-RFLP.

**Wyniki:** Rozkład genotypów polimorfizmu Arg415Gln genu *ERCC4/XPF* nie różnił się znacząco w grupie badanej i kontrolnej ( $p>0,05$ ) od rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego i Weinberga. Nie było znaczących różnic ( $p>0,05$ ) w rozkładzie genotypów i częstości alleli pomiędzy grupami różnego stopnia zaawansowania raka piersi.

**Wniosek:** Wyniki sugerują, że polimorfizm Arg415Gln genu *ERCC4/XPF* może nie być związany z występowaniem raka piersi.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, geny naprawy uszkodzeń DNA, polimorfizm genowy, *ERCC4/XPF*

### Summary

**Background:** The *ERCC4/XPF* gene plays an important role in the DNA repair system.

**Objective:** Arg415Gln polymorphism in the *ERCC4/XPF* gene in postmenopausal women with breast cancer was analysed. Material and methods. Blood samples were obtained from 100 women with breast cancer and controls (n=106). The polymorphisms were determined by PCR-RFLP.

**Results:** The distribution of the genotypes of the Arg415Gln polymorphism of *ERCC4/XPF* in both controls and patients did not differ significantly ( $p>0.05$ ) from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution. There were no significant differences ( $p>0.05$ ) in genotype distributions or allele frequencies between subgroups assigned to histological stage.

**Conclusion:** The results suggest that Arg415Gln polymorphism in *ERCC4/XPF* may not be linked with appearance and development of breast cancer.

**Key words:** breast cancer, DNA repair genes, gene polymorphism, *ERCC4/XPF*

### Wstęp

Najczęstszymi nowotworami u kobiet są nowotwory złośliwe piersi. W Polsce notuje się prawie 10 tys. nowych przypadków zachorowań rocznie. Oznacza to, że każdego roku na raka piersi zachoruje 30 kobiet na 100 tys. Umieralność na raka piersi rośnie w tempie 1,6% rocznie, ponieważ wykrywany jest zbyt późno. Tylko

w 20% przypadków chorobę rozpoznaje się we wczesnym stadium zaawansowania, gdy szanse na wyleczenie są bardzo duże. Wśród wszystkich nieleczonych kobiet z rakiem gruczołu piersiowego 10 lat przeżywa 5%. Dla leczonej pacjentki szansa przeżycia następnych 5 lub 10 lat bez postępu lub wznowienia procesu chorobowego jest uzależniona od stopnia zaawansowania

Adres do korespondencji:

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

schorzenia przy rozpoczęciu leczenia. Średni wskaźnik 10-letnich przeżyć dla wszystkich stopni zaawansowania wynosi ok. 40%. Nie jest znana bezpośrednia przyczyna powstawania nowotworów złośliwych piersi, można tylko określić z pewnym prawdopodobieństwem, jaki wpływ na powstanie raka piersi mają określone czynniki. Wiadomo, że w etiologii raka piersi dużą rolę odgrywają czynniki środowiskowe [1, 2].

DNA komórek jest nieustannie uszkodzany przez mutageny endogenne i egzogenne. Większość uszkodzeń DNA podlega naprawie, natomiast uszkodzenia nienaprawione ulegają akumulacji i mogą doprowadzić do rozregulowania mechanizmów wzrostu komórki i powstania nowotworu [3–5].

Geny systemu naprawy uszkodzeń DNA odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integracji genomu. Bez nich komórki gromadziłyby błędy, które w krótkim czasie uniemożliwiłyby przeżycie komórki. Geny te są wysoce polimorficzne, a ich polimorfizmy, poprzez uszkodzenie funkcji białek kodowanych przez te geny, zmniejszają zdolność naprawy DNA i wpływają na wzrost ryzyka pojawienia się procesów nowotworowych [6–12]. Dane literaturowe wskazują, że zaburzenia w naprawie DNA są związane z ryzykiem powstania raka piersi, które może korelować z wariantami polimorficznymi genów naprawy [6, 8, 10, 11].

Znanych jest obecnie pięć głównych dróg naprawy w zależności od typu uszkodzenia DNA:

- naprawa bezpośrednia,
- naprawa poprzez wycinanie zasad azotowych (ang. *base excision repair* – BER),
- naprawa poprzez wycinanie nukleotydów (ang. *nucleotide excision repair* – NER),
- naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (ang. *mismatch excision repair* – MMR) oraz
- naprawa rekombinacyjna – homologiczna i niehomologiczna (ang. *homology repair* – HRR) [13–15].

Ponieważ ww. mechanizmy, a zwłaszcza BER, NER i HRR, odgrywają bardzo istotną rolę w naprawie różnych typów uszkodzeń DNA, kumulacja błędów genetycznych w obrębie genów tych trzech dróg naprawy może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia nowotworów. Skumulowane warianty polimorficzne genów *XRCC1*, *XRCC3* i *ERCC4/XPF*, charakteryzujące się podstawieniem błędnych aminokwasów, mogą być związane ze zwiększonym ryzykiem powstania raka piersi [16–18]. Są to zwłaszcza polimorfizmy R399Q genu *XRCC1* oraz Arg415Gln genu *ERCC4/XPF* [10, 11, 19–21]. Dotychczasowe wyniki są jednak niejasne i problem wymaga dalszych badań. Wśród licznych genów uczestniczących w naprawie podwójnych pęknięć DNA, tylko dwa zawierają zbadane polimorfizmy związane z ryzykiem powstania raka piersi. Są to *BRCA2* i *XRCC3* [22].

Ze względu na duże znaczenie problemu wczesnego wykrywania i leczenia chorób nowotworowych, istotne wydaje się zbadanie związków pomiędzy polimorfizmami a występowaniem i rozwojem nowotworów.

W przedstawionej pracy przeprowadzono analizę oceny związków pomiędzy polimorfizmem genu *ERCC4/XPF* biorącego udział w naprawie uszkodzeń DNA a ryzykiem pojawienia się raka piersi. Wcześniejsze badania autorów niniejszej pracy dotyczące genów naprawy DNA przez rekombinację (wyniki wcześniej opublikowane) [23, 24] wydawały się autorom tej publikacji niewystarczające do poznania skomplikowanego procesu powstawania raka piersi.

## Materiał i metody

### Chorzy

Krew żylna została uzyskana od 100 kobiet chorych na raka piersi, w wieku 39.–69. roku życia (średnia wieku 54 lata), u których stwierdzono obecność przerzutów (n=51) lub ich brak (n=49) do węzłów chłonnych pachowych. U żadnej z pacjentek nie stwierdzono przerzutów odległych. Średni rozmiar guzów wynosił 21 mm. Stopień zaawansowania nowotworów był oceniany wg skali Scarf-Bloom-Richardsona. Przebadano 23 nowotwory I stopnia, 60 II stopnia oraz 17 III stopnia.

Grupę kontrolną stanowiło 106 próbek krwi żyłnej pobranej od dobranych wiekowo kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

### Izolacja DNA

DNA był izolowany z krwi żyłnej z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), zgodnie z zaleceniami producenta.

### Analiza polimorfizmu genu *ERCC4/XPF* metodą PCR-RFLP

W celu analizy polimorfizmu Arg415Gln zastosowano startery o następujących sekwencjach:

- 5'-GCACAGGGAACTAGGAGGA-3',
- 5'-TCGACATCTCCTCCTCTTC-3'.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) była przeprowadzana w termocyclerze Perkin-Elmer/Gene Amp., PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25 µl) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2 µmol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH, Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP i 1 U polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR wyglądały następująco: trawienie w temperaturze 94°C przez 60 s, w temperaturze 54°C przez 30 s i w temperaturze 72°C przez 40 s, i obejmowały 35 cykli. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *XmnI*, amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 7-procentowym żelu poliakrylamidowym i po barwieniu bromkiem etydydny

obserwowane w świetle ultrafioletowym. Produkty Arg/Arg, Arg/Gln, i Gln/Gln odpowiadały odpowiednio pasmom długości 96/284 pz, 96/284/380 pz i 380 pz.

### Analiza statystyczna

Rejestrowana liczba każdego genotypu była porównywana z liczbą oczekiwaną na podstawie prawa Hardy'ego i Weinberga z użyciem testu  $\chi^2$ . Istotność różnic między częstościami występowania alleli i genotypów dla poszczególnych grup była oceniana testem  $\chi^2$ ;  $p < 0,05$  było określane jako wynik statystycznie znaczący.

### Wyniki

Polimorfizm genu *ERCC4/XPF* analizowano u 100 chorych na raka piersi oraz u 106 osób, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Populacja chorych na nowotwór oraz grupa kontrolna były jednorodnie pod względem płci (kobiety) oraz dobrane wiekowo.

W grupie chorych nie zaobserwowano związków pomiędzy polimorfizmem Arg415Gln genu *ERCC4/XPF* a występowaniem raka piersi. Częstości alleli Arg i Gln oraz w grupie badanej nie różniły się istotnie ( $p > 0,05$ ) od częstości alleli w grupie kontrolnej (tab. I). Wszystkie rozkłady były zgodne z rozkładem Hardy'ego i Weinberga ( $p > 0,05$ ).

Badaniom została poddana także grupa pacjentek o różnym stopniu zaawansowania raka piersi, w celu określenia znaczenia polimorfizmów dla rozwoju nowotworu. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w rozkładach genotypów i częstości alleli ( $p > 0,05$ ) pomiędzy badanymi grupami.

### Dyskusja

Prawidłowa naprawa DNA zapewnia utrzymanie integralności genomu i pełni kluczową funkcję w jego ochronie przed działaniem czynników kancerogennych. Wysoka częstość zmian DNA mogłaby mieć śmiertelne konsekwencje dla organizmu, gdyby nie była kontrolowana przez systemy naprawy DNA. Genami, które sterują naprawą DNA zmienionego w wyniku mutacji (geny kodujące enzymy kontrolujące wierność replikacji i naprawy DNA), są geny naprawcze (mutatorowe). Zaburzenia funkcjonowania naprawy poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad prowadzą do niestabilności genomowej, sprzyjającej indukcji i rozwojowi procesu kancerogenezy.

Zmiany syntezy białek naprawy DNA są zazwyczaj poprzedzane zmianami w transkrypcji ich genów i mRNA, dlatego też wkład w syntezę tych białek może mieć zmienność sekwencji genów. Geny naprawy DNA są polimorficzne i wobec ich znaczącej roli w progresji nowotworów istotne wydaje się poznanie roli polimorfizmów w rozwoju raka [25, 26].

**Tab. I.** Rozkład genotypów Arg/Arg, Arg/Gln i Gln/Gln oraz częstości alleli Arg i Gln polimorfizmu Arg415Gln u chorych na raka piersi i w grupie kontrolnej

	Rak piersi (n=100)		Grupa kontrolna (n=106)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Arg/Arg	31	0,31	21	0,2
Arg/Gln	40	0,4	48	0,45
Gln/Gln	29	0,29	37	0,35
$\chi^2$	3,987 <sup>a</sup>		0,591 <sup>a</sup>	
allel Arg	102	0,51 <sup>b</sup>	90	0,42
allel Gln	98	0,49 <sup>b</sup>	122	0,58

<sup>a</sup> $p > 0,05$  w porównaniu z rozkładem Hardy'ego i Weinberga; <sup>b</sup> $p > 0,05$  w porównaniu z grupą kontrolną

**Tab. II.** Rozkład genotypów Arg/Arg, Arg/Gln i Gln/Gln oraz częstości alleli Arg i Gln polimorfizmu Arg415Gln u chorych na raka piersi w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu

Bloom	I (n=14)		II (n=64)		III (n=22)	
	liczba	częstość	liczba	częstość	liczba	częstość
Arg/Arg	2	0,07	23	0,36	4	0,18
Arg/Gln	3	0,21	16	0,25	7	0,32
Gln/Gln	9	0,71	25	0,39	11	0,5
$\chi^2$	2,57 <sup>a</sup>		12,553		1,883	
allel Arg	7	0,25	62	0,48	15	0,34
allel Gln	21	0,75	66	0,52	29	0,66

<sup>a</sup> $p > 0,05$  w porównaniu z rozkładem Hardy'ego i Weinberga

Białko XRCC1 odgrywa znaczącą rolę w mechanizmie naprawy poprzez wycinanie zasad [16]. Przebadano trzy polimorfizmy genu *XRCC1* (R194W, R399Q R280H), z których tylko wystąpienie polimorfizmu R194W może być związane ze wzrostem ryzyka wystąpienia raka piersi w populacji kaukaskiej i Afroamerykanów [10, 21]. Obecność allela W redukuje ryzyko powstania nowotworu. Polimorfizm R399Q podlega nieustannym badaniom. Jednakże uzyskuje się rozbieżne wyniki dla różnych nowotworów. Związek polimorfizmu R399Q z obniżonym ryzykiem nowotworzenia stwierdza się w przypadku raka skóry [27], przetyku [28], pęcherza moczowego [29], korelację ze zwiększonym ryzykiem dla raka żołądka [30] czy piersi [10].

Produkty genów *ERCC4/XPF* i *ERCC1* związane z naprawą DNA poprzez wycinanie nukleotydów tworzą kompleks, który rozpoznaje uszkodzenia i nacina DNA od końca 5. Badania polimorfizmu *Arg415Gln* genu *ERCC4/XPF* przeprowadzono do tej pory na niewielkiej popu-

lacji chorych na raka piersi [23]. Zaobserwowano obecność genotypu Gln/Gln tylko u 3% badanych chorych, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej. Jednakże nie wyjaśniono, czy polimorfizm Arg415Gln może odgrywać istotną rolę w rozwoju raka piersi [23].

W prezentowanej pracy skoncentrowano się na analizie polimorfizmu genu *ERCC4/XPF* u chorych na raka piersi oraz u osób, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Populacja chorych na nowotwór oraz grupa kontrolna były jednorodnie pod względem płci oraz dobrane wiekowo. Nie wykazano związku pomiędzy polimorfizmem a występowaniem raka piersi. Nie stwierdzono znaczących różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy pacjentkami o różnym stopniu zaawansowania nowotworu. Sugeruje to brak związku pomiędzy polimorfizmem powyższego genu a rozwojem raka piersi.

Defekty białek zaangażowanych bezpośrednio w naprawę DNA mają wpływ na zwiększoną podatność na nowotwory. W wielu typach komórek nowotworowych stwierdza się tego typu defekty, z czym wiąże się zmniejszona zdolność do naprawy uszkodzeń DNA. Wyniki sugerują, że polimorfizm genu Arg415Gln *ERCC4/XPF* może nie być bezpośrednio związany z występowaniem i rozwojem raka piersi, jednakże konieczne są badania większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

## Piśmiennictwo

- McGuire W, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1756-61.
- Ravaioli A, Bagli L, Zucchini A, Monti F. Prognosis and prediction of response in breast cancer. The current role of the main biological markers. *Cell Prolif* 1998; 31: 113-26.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247-54.
- Aquilina G, Bignami M. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J Cell Physiol* 2001; 187: 145-54.
- Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
- Shi Q, Wang LE, Bondy M, et al. Reduced DNA repair of benzo [a] pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1695-700.
- Shen M, Hung RJ, Brennan P, et al. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2003; 12: 1234-40.
- Webb PM, Hopper JL, Newman B, et al. Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005; 14: 319-323.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002; 11: 1513-30.
- Duell EJ, Milikan RC, Pitman GS, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001; 10: 217-22.
- Smith TR, Levine EA, Perrier ND, et al. DNA-repair genetic polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2003; 12: 1200-4.
- Fu YP, Yu JC, Cheng TC, et al. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous endjoining genes. *Cancer Res* 2003; 63: 2440-6.
- Vispe S, Yung TM, Ritchot J, et al. A cellular defense pathway regulating transcription through poly (ADP-ribosyl) ation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9886-91.
- Roberts RJ, Cheng X. Base flipping. *Ann Rev Biochem* 1998; 67: 181-98.
- Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, et al. Requirement of mammalian DNA polymerase- $\beta$  in base excision repair. *Nature* 1996; 379: 183-6.
- Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res* 2000; 459: 1-18.
- Bishop DK, Ear U, Bhattacharyya A, et al. Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273: 21482-8.
- Bessho T, Sancar A, Thompson LH, Thelen MP. Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J Biol Chem* 1997; 272: 3833-7.
- Zhai X, Liu J, Hu Z, et al. Polymorphisms of ADPRT Val762Ala and XRCC1 Arg399Glu and risk of breast cancer in Chinese women: a case control analysis. *Oncol Rep* 2006; 15: 247-52.
- Metsola K, Kataja V, Sillanpää P, et al. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish case-control study. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R987-97.
- Chacko P, Rajan B, Joseph T, et al. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: 15-21.
- 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.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kulig A. The G/C polymorphism of RAD51 gene in breast cancer. *Pol Merkuriusz Lek* 2006; 21: 55-8.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Zadrozny M, Kulig A. Analysis of RAD51 polymorphism and BRCA1 mutations in Polish women with breast cancer. *Exp Oncol* 2006; 28: 156-9.
- Spencer CC. Human polymorphism around recombination hotspots. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 535-6.
- Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, et al. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4802-9.
- Nelson H, Kelsey K, Mott L, Karagas MR. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res* 2002; 62: 152-5.
- Lee JM, Lee YC, Yang SY, et al. Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 240-6.
- Stern MC, Umbach DM, et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphism, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001; 10: 125-31.
- Shen H, Xu Y, Qian Y, et al. Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2000; 88: 601-6.