

Polimorfizmy genów naprawy DNA *hOGG1* i *XRCC1* w raku endometrium

Polymorphisms in hOGG1 i XRCC1 DNA repair genes in endometrial cancer

Beata Smolarz¹, Hanna Romanowicz-Makowska¹, Anna Sobczuk², Tomasz Pertyński²

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

²Klinika Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

Przeгляд Menopauzalny 2008; 4: 198–201

Streszczenie

Wstęp: W prezentowanej pracy badano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmów Ser326Cys genu *hOGG1* i Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka endometrium.

Materiały i metody: Krew do badań została uzyskana od 150 kobiet, u których stwierdzono raka trzonu macicy i od grupy kontrolnej (n=129). Polimorfizmy zostały określone przy zastosowaniu techniki PCR-RFLP.

Wyniki: Rozkład genotypów polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i Arg399Gln genu *XRCC1* nie różnił się znacząco w grupie badanej i kontrolnej ($p>0,05$) od rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego-Weinberga. Nie było znaczących różnic ($p>0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości alleli pomiędzy grupami różnego stopnia zaawansowania raka endometrium.

Wnioski: Wyniki sugerują, że zarówno polimorfizm Arg399Gln genu *XRCC1*, jak i polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* mogą nie być związane z występowaniem raka endometrium.

Słowa kluczowe: rak endometrium, geny naprawy uszkodzeń DNA, polimorfizm genowy

Summary

Aim: In the present work the distribution of genotypes and frequency of alleles of the Ser326Cys *hOGG1* gene and Arg399Gln *XRCC1* gene polymorphism in subjects with endometrial cancer were investigated.

Materials and methods: Blood samples were obtained from 150 women with endometrial cancer and controls (n=129). The polymorphisms were determined by PCR-RFLP.

Results: The distribution of genotypes of the Arg399Gln polymorphism of *XRCC1* and Ser326Cys polymorphism of *hOGG1* 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.

Conclusions: The results suggest that the Arg399Gln polymorphism of the *XRCC1* gene as well as Ser326Cys polymorphism in *hOGG1* may not be linked with appearance and development of endometrial cancer.

Key words: endometrial cancer, DNA repair genes, gene polymorphism

Wstęp

W wielu krajach rejestruje się stały wzrost liczby chorych na raka błony śluzowej jamy macicy, w związku z czym choroba ta staje się poważnym problemem diagnostycznym i terapeutycznym. Rocznie odnotowuje się na świecie 150 tys. nowych zachorowań na raka endometrium (najwyższy wskaźnik zachorowalności we Flandrii, region Varese – 247/100 tys., 21 w USA, 2,7 w Japonii) [1].

W Polsce rejestruje się rocznie ok. 120 tys. nowych zachorowań na nowotwory złośliwe, a z powodu choroby nowotworowej umiera ponad 80 tys. pacjentów, w tym dzieci i osoby młode. Od kilkudziesięciu lat obserwuje się w Polsce stały wzrost zachorowalności na raka błony śluzowej macicy (1963 r. – 4,2/100 tys., 1978 r. – 8,3/100 tys., 1989 r. – 8,5/100 tys., 2004 r. – 13,37/100 tys.), trzecie miejsce po raku piersi – 40,65/100 tys. i płuca 13,88/100 tys.

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 20 71

Powstanie raka błony śluzowej jamy macicy jest uwarunkowane synergistycznym oddziaływaniem wielu czynników. Udział niektórych z nich w kancerogenezie został jednoznacznie potwierdzony i uznany przez środowisko medyczne, nad innymi wciąż trwają dyskusje i badania, dostarczające niekiedy rozbieżnych informacji. Określenie roli poszczególnych czynników w etiologii raka endometrium przysparza wiele trudności, przede wszystkim ze względu na ich jednoczesne występowanie u danej pacjentki. Do najczęściej wymienianych czynników ryzyka rozwoju raka trzonu macicy zalicza się czynniki środowiskowe, hiperestrogenizm, otyłość, cukrzycę, nadciśnienie, wiek oraz indywidualne predyspozycje.

Utrzymanie integralności genomowego DNA jest warunkiem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania komórki. Zaburzenia struktury genomu mogą przyczynić się do rozwoju wielu nowotworów złośliwych, w tym raka endometrium.

Polimorfizm genów naprawczych może wpływać na różnice w sprawności usuwania uszkodzeń materiału genetycznego, a tym samym kształtować podatność na rozwój choroby nowotworowej [2–5]. Dane literaturowe wskazują, że zaburzenia w naprawie DNA są związane z ryzykiem powstania raka endometrium, które może korelować z wariantami polimorficznymi genów naprawy [6].

Zidentyfikowano ponad 130 genów naprawy DNA, w których odkryto wiele polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) [7, 8]. Aby zdefiniować rolę, jaką mogą odgrywać te warianty w modulowaniu ryzyka wystąpienia raka, należy określić ich znaczenie funkcjonalne. Zmienność w genach naprawy DNA może zostać wykorzystana klinicznie, w tym do oceny ryzyka wystąpienia danego rodzaju raka, jego prewencji i terapii.

W pracy analizowano polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* i Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka endometrium.

Materiały i metody

Pacjentki

Badaniom poddano kobiety (n=150) w wieku 55–82 lat (średnia wieku \pm SD 68,8 \pm 6,68 roku), u których stwierdzono raka endometrium. Materiał do badań w postaci próbek krwi pobranej na cytrynian został uzyskany od każdej pacjentki. Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg kryteriów ustalonych przez FIGO (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*).

Grupę kontrolną stanowiły kobiety (n=129), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Izolowanie DNA

Krew pobierano na EDTA jako antykoagulant. DNA izolowano z krwi przy użyciu zestawu QIAamp (*Qiagen, Hilden, Niemcy*) zgodnie z zaleceniem producenta. W pro-

cedurze tej przeprowadzano lizę komórek krwi, a białka jądrowe usuwano poprzez trawienie proteinazą K. Użyte próbki DNA przechowywano w temp. -20°C .

Analiza polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*

Do badań polimorficznych wariantów wybranych genów naprawy DNA stosowano metodę PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*). Polega ona na powieleniu wybranego fragmentu genu zawierającego miejsce polimorficzne w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i poddaniu uzyskanego produktu inkubacji z odpowiednio dobraną endonukleazą restrykcyjną, rozpoznającą specyficzną sekwencję w jednym z wariantów polimorficznych badanego genu. Zawierający ją produkt PCR zostaje przecięty na fragmenty, natomiast drugi wariant pozostaje integralny.

Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* był określany poprzez reakcję PCR-RFLP ze starterami o następujących sekwencjach: 5'GGAAGGTGCTTGCGGAAT3', 5'ACTGT-CACTAGTCTCACCAG3'. Reakcja PCR przeprowadzona była w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25 μl) składała się z 5 ng genomowego DNA, 0,2 μmol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP i 1 j.m. polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR były następujące:

- 95°C – 5 min (denaturacja wstępna),
- 95°C – 30 s,
- 57°C – 30 s,
- 72°C – 1 min,
- 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \times 35 cykli,
- 72°C – 7 min (dokończenie syntezy).

Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *SatI* przez 2 godz. w temp. 37°C amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 7-procentowym żelu poliakrylamidowym i po barwieniu bromkiem etydyny obserwowane w świetle UV. Każda próbka przypisywana była do jednego z trzech genotypów: Ser/Ser, Ser/Cys lub Cys/Cys.

Analiza polimorfizmu Arg399Gln genu *XRCC1*

Polimorfizm Arg399Gln genu *XRCC1* był określany przez reakcję PCR-RFLP ze starterami o następujących sekwencjach: 5'CAAGTACAGCCAGGTCCTAG3' 5'CCTTCCCT-CATCTGGAGTAC3'. Reakcja PCR przeprowadzona była w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25 μl) składała się z 5 ng genomowego DNA, 0,2 μmol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP i 1 j.m. polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR były następujące:

- 95°C – 5 min,
- 95°C – 20 s,

Tab. I. Rozkłady genotypów oraz częstości występowania alleli polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na raka endometrium oraz w grupie kontrolnej

Genotyp allel	Kontrola (n=129)		Rak (n=150)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Ser/Ser	36	0,28	34	0,23
Ser/Cys	62	0,48	74	0,49
Cys/Cys	31	0,24	42	0,28
χ^2	0,304 ^a		0,110	
Ser	134	0,52	142	0,47
Cys	124	0,48	158	0,53

^a $p < 0,05$ w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga**Tab. II.** Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka endometrium oraz w grupie kontrolnej

Genotyp allel	Kontrola (n=129)		Rak (n=150)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Arg/Arg	32	0,24	36	0,24
Arg/Gln	62	0,48	68	0,45
Gln/Gln	35	0,27	46	0,31
χ^2	0,303 ^a		1,126	
Arg	126	0,49	140	0,47
Gln	132	0,51	160	0,53

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

- 58°C – 20 s,
- 72°C – 20 s,
- 2→3→4 × 35 cykli,
- 72°C – 3 min.

Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *BclI* przez 2 godz. w temp. 37°C amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 7-procentowym żelu poliakryloamidowym i po barwieniu bromkiem etyldyny obserwowane w świetle UV. Każda próbka przypisywana była do jednego z trzech genotypów – Arg/Arg, Arg/Gln lub Gln/Gln.

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 występowania alleli i genotypów dla poszczególnych grup oceniana była testem χ^2 ; $p < 0,05$ było określane jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

W tab. I przedstawiono rozkład genotypów polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* w grupie chorych na raka endometrium i w grupie kontrolnej. Oba rozkłady nie różniły się znacząco ($p > 0,05$) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Nie stwierdzono różnic w częstościach występowania alleli Ser i Cys pomiędzy pacjentami i kontrolą.

W tab. II zaprezentowano rozkład genotypów Arg399Gln genu *XRCC1* w grupie chorych na raka endometrium i w grupie kontrolnej. Oba rozkłady nie różniły się znacząco ($p > 0,05$) od rozkładu przewidywanego przez prawo Hardy'ego-Weinberga. Nie stwierdzono różnic w częstościach występowania alleli Arg i Gln pomiędzy pacjentami i kontrolą.

Nie było statystycznie istotnych różnic pomiędzy rozkładami genotypów w grupach o różnym stopniu zaawansowania nowotworu a rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$). Nie stwierdzono różnic w częstościach alleli Ser i Cys oraz Arg i Gln pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).

Dyskusja

Gen *hOGG1* (8-oxoguanine glycosylase) koduje glikozylazę 8-oksoguaniny, białka uczestniczącego w szlaku naprawy DNA BER. Znajduje się na chromosomie 3 (3p26.2), zajmuje 16,68 kbp. Gen *hOGG1* zawiera 8 eksonów, ostatni z nich występuje tylko w części transkryptów [9].

Gen *OGG1* ma kilka miejsc polimorficznych [10]. Tranzycja C1245G (ekson 7 genu) powoduje podstawienie w pozycji 326 łańcucha polipeptydowego hOGG1 seryny cysteiną. Według niektórych badań nie wpływa ono na aktywność katalityczną enzymu (nie zaobserwowano różnic pomiędzy wariantami), jednak wg innych wariant 326Ser wykazuje znacząco większą zdolność naprawy uszkodzeń DNA niż 326Cys [11, 12]. Polimorfizm ten ma znaczenie epidemiologiczne, ponieważ obecność dwóch alleli 326Cys zwiększa ryzyko rozwoju kilku typów nowotworów [4, 10].

Gen *XRCC1* (X-ray repair crosscomplementing group 1) koduje białko uczestniczące w szlaku naprawy DNA BER. Położony jest w chromosomie 19 (19q13.2), zajmuje ok. 31,9 kbp i zawiera 17 eksonów [13]. Ulega on ekspresji na wysokim poziomie i w różnych tkankach. Transkrypty podlegają alternatywnemu składaniu, przez co *XRCC1* może kodować nawet 16 białek. Dotychczas stwierdzono istnienie 37 miejsc polimorficznych w obrębie genu *XRCC1*, 14 z nich powoduje zmianę kodowanego aminokwasu, a 4 występują w populacji z częstością 3% lub większą [14]. Trzy z nich (Arg194Trp, Arg280His i Arg399Gln) przebadano pod względem epidemiologicznym [4]. Allel 194Trp występuje w grupach kontrolnych badań epidemiologicznych z częstością 0,06–0,35 [4]. Według wyników uzyskanych w większo-

ści z nich już w układzie heterozygotycznym zmniejsza on ryzyko rozwoju nowotworów wielu typów, m.in. piersi, płuc i pęcherza [5, 15, 16].

Polimorfizm w pozycji 399 (ekson 10) związany jest z podstawieniem Arg→Gln w domenie BRCT I, wiążącej polimerazę poli (ADP-rybozy). W populacjach osób bez nowotworów (grupy kontrolne badań epidemiologicznych) częstość występowania allelu 399Gln wynosi 0,14–0,39. Polimorfizm ten może mieć wpływ na ryzyko rozwoju choroby nowotworowej, powodując zarówno jego wzrost, jak i spadek, w zależności od typu i lokalizacji raka [4]. Stwierdzono korelację między obecnością allelu 399Gln a poziomem uszkodzeń DNA i mutacji, jednak wg badań efektywności naprawy pęknięć jednoniciowych oba warianty cechuje zbliżona sprawność, polimorfizm Arg399Gln może więc mieć niewielki wpływ na domenę BRCT I i funkcjonowanie XRCC1 [17].

W przedstawionym w niniejszej pracy badaniu nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmami Ser326Cys genu *hOGG1* i Arg399Gln genu *XRCC1* a rozwojem raka trzonu macicy. Wyniki sugerują, że polimorfizmy mogą nie być bezpośrednio związane z występowaniem i rozwojem raka endometrium, jednakże konieczne są badania większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

Piśmiennictwo

- Inoue M, Okayama A, Fujita M, et al. A case-control study on risk factors for uterine endometrial cancer in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 346-50.
- Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004; 445: 431-41.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-8.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-30.
- Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001; 10: 217-22.
- De Ruyck K, Wilding CS, Van Eijkeren M, et al. Microsatellite polymorphisms in DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 in patients with gynecological tumors: association with late clinical radiosensitivity and cancer incidence. *Radiat Res* 2005; 164: 237-44.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291: 1284-9.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1977-81.
- Ishida T, Hippo Y, Nakahori Y, et al. Structure and chromosome localization of human OGG1. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 85: 232-6.
- Kohn T, Shinmura K, Tosaka M, et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219-25.
- Dherin C, Radicella JP, Dizdaroglu M, Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alphaOGG1 protein and polymorphic alphaOGG1 (Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 4001-7.
- Janssen K, Schlink K, Götte W, et al. DNA repair activity of 8oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser³²⁶/Cys³²⁶. *Mutat Res* 2001; 486: 207-16.
- Trask B, Fertitta A, Christensen M, et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. *Genomics* 1993; 15: 133-45.
- Mohrenweiser H, Olsen A, Carrano A, Tynan K. Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. *Genomics* 1993; 15: 133-45.
- David-Beabes GL, London SJ. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* 2001; 34: 333-9.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 125-31.
- Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, et al. Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 185: 64-73.