

Polimorfizm A/G (–5) w regionie promotorowym genu metalotioneiny 2A a rak przewodowy piersi kobiet

The A/G (–5) polymorphism in the promoter region of the metallothionein 2A gene and breast ductal carcinoma

Ewa Forma¹, Magdalena Bryś¹, Hanna Romanowicz-Makowska², Wanda Małgorzata Krajewska¹

¹Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki; kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Wanda Małgorzata Krajewska

²Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

Przegląd Menopauzalny 2008; 4: 217–221

Streszczenie

Cel: Polimorfizmy regionów promotorowych genów metalotioneiny mogą zaburzać funkcjonowanie systemów detoksykacyjnych komórki odpowiedzialnych za usuwanie metali ciężkich i tym samym wpływać na proces transformacji nowotworowej. W pracy badano polimorfizm A/G (–5) regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A (MT-2A) w raku przewodowym piersi kobiet.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiła krew obwodowa 75 kobiet z rozpoznaniem przewodowym rakiem piersi oraz krew pobrana od 100 zdrowych kobiet. Polimorfizm określano przy użyciu automatycznego sekwenatora DNA ABI PRISM 377 i programu komputerowego GeneScan Analysis Software ver. 3.7 służącego do analizy ilościowej i jakościowej zamplifikowanych fragmentów oraz DNA Sequencing Analysis Software v. 3.4.1. analizującego produkty sekwencjonowania DNA.

Wyniki: Rozkład genotypów A/G (–5) w regionie promotorowym MT-2A nie różnił się statystycznie w grupie badanej i grupie kontrolnej ($p > 0,05$) od rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego-Weinberga. Nie wykazano także znamienych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w rozkładzie genotypów i częstości występowania alleli pomiędzy grupami o różnym stopniu zaawansowania przewodowego raka piersi.

Wnioski: Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż polimorfizm A/G (–5) w regionie promotorowym genu metalotioneiny 2A nie jest związany z procesem transformacji nowotworowej przewodowego raka piersi kobiet.

Słowa kluczowe: gen *MT-2A*, polimorfizm, przewodowy rak piersi kobiet

Summary

Aim: Polymorphisms in the promoter region of metallothionein genes resulting in variation of heavy metal detoxification may be associated with cancer risk. In the present work A/G (–5) polymorphism in the promoter region of the metallothionein 2A gene (MT-2A) in ductal carcinoma of the breast was investigated.

Material and methods: Genomic DNA isolated from 75 breast cancer patients and 100 volunteers was used to genotype MT-2A A/G (–5). Polymorphism was determined by automated DNA sequencer ABI PRISM 377. GeneScan Analysis Software ver. 3.7 and DNA Sequencing Analysis Software ver. 3.4.1 was used for interpretation of results.

Results: The distribution of the genotypes of the A/G (–5) polymorphism in the promoter region of MT-2A 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 different Bloom-Richardson grading.

Conclusions: The results suggest that the A/G (–5) polymorphism in the promoter region of the MT-2A gene may not be linked with neoplastic transformation of breast ductal carcinoma.

Key words: *MT-2A*, polymorphism, breast ductal carcinoma

Adres do korespondencji:

dr hab. med. **Magdalena Bryś**, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. +48 42 635 44 89, faks +48 42 635 44 84

Wstęp

Metalotioneiny (ang. *metallothionein* – MT) to grupa białek wewnątrzkomórkowych charakteryzujących się niską masą cząsteczkową (6–7 kDa), wysoką zawartością reszt cysteiny, które stanowią ok. 30% wszystkich aminokwasów, oraz brakiem aminokwasów aromatycznych [1–4]. Metalotioneiny mają zdolność do wiązania różnych metali, w tym cynku, kadmu, rtęci, miedzi i bizmutu [5]. Białka te odpowiadają za homeostazę jonów cynku i miedzi, detoksykację metali ciężkich (zwłaszcza Cd i Hg) oraz ochronę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i apoptozą [5–7]. Podział MT na rodziny, podrodziny, podgrupy i izoformy jest związany z podobieństwem sekwencji i pokrewieństwem filogenetycznym. Metalotioneiny w komórkach człowieka kodowane są przez rodzinę 10 genów [2, 5].

W przypadku nowotworów piersi ekspresja MT zachodzi zarówno w komórkach mioepitelialnych, jak i nabłonkowych. W procesie ułożliwiania się nowotworu piersi dochodzi do zaniku komórek mioepitelialnych, co może ułatwić progresję raka przewodowego [8, 9]. W przypadku nieobecności komórek mioepitelialnych w guzie może dochodzić do kompensowania braku wydzielanych przez nie czynników wzrostu i MT w wyniku wielu zmian zachodzących w komórkach epitelialnych. Zalicza się do nich nadekspresję receptora dla TGF- α (ang. *transforming growth factor α*) i receptora dla bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) oraz ektopowe wydzielanie bFGF i ekspresję genów metalotionein. Procesy te powodują przyspieszenie rozwoju nowotworu [9].

Metalotioneina MT-2A osiąga największe stężenie spośród wszystkich izoform MT ulegających ekspresji w nowotworach piersi [2, 10]. Poziom ekspresji MT-2 jest pozytywnie skorelowany z aktywnością proliferacyjną komórek. Wykazano, że nadekspresja MT-2A powoduje 2-krotny wzrost liczby podziałów komórkowych, podczas gdy w przypadku nadekspresji MT-1E i MT-3 nie obserwowano takiego efektu [2]. Potwierdzeniem związku MT-2A z proliferacją komórek jest korelacja między poziomem ekspresji tej izoformy metalotionein i ekspresją Ki-67, białka będącego markerem proliferacji. Zarówno stężenie MT-2A, jak i mRNA dla tej izoformy jest wyższe w nowotworach bardziej zaawansowanych niż w nowotworach w niższych stadiach. Silna korelacja między ekspresją MT-2A a aktywnością proliferacyjną nowotworów piersi wskazuje na potencjalne znaczenie tej izoformy w nowotworzeniu.

Dane literaturowe wskazują, że zamiana adeniny na guaninę w pozycji (–5) w obszarze promotorowym genu metalotioneiny 2A może w istotny sposób wpływać na oddziaływanie promotora z czynnikami transkrypcyjnymi i tym samym na ekspresję genu *MT-2A* [11].

Celem pracy była analiza rozkładu genotypów i częstości alleli A/G (–5) regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A w raku przewodowym piersi kobiet.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od 75 pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem przewodowym piersi (średnia wieku 53; przedział wiekowy 41–73 lata). Wszystkie nowotwory poddano ocenie histopatologicznej oraz klasyfikacji wg Blooma-Richardsona. Stwierdzono 18 przypadków raka w stopniu I, 48 w stopniu II i 9 w stopniu III.

Materiałem kontrolnym do analiz były wymazy nabłonków pobrane z jamy ustnej 100 zdrowych ochotniczek z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku choroby nowotworowej. Średnia wieku w grupie kontrolnej wynosiła 28 lat.

Izolowanie genomowego DNA

DNA izolowano z krwi obwodowej pobranej na EDTA (1,5 mg/ml) od chorych na raka przewodowego piersi oraz z wymazów zawierających nabłonki z jamy ustnej pobranych od kobiet zdrowych. Do ekstrakcji DNA zastosowano odpowiednio DNAzol (Life Technologies) oraz zestaw Sherlock AX (A & A Biotechnology).

Czystość otrzymanych preparatów DNA określano metodą spektrofotometryczną, analizując widma absorbancji próbek w zakresie długości fali 230–300 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A_{260}/A_{280} mieszcząca się w granicach 1,8–2,0.

Amplifikacja DNA i detekcja alleli

Reakcje PCR przeprowadzano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 7,5 μ l zawierającej 100 ng genomowego DNA, 0,06 μ l polimerazy AmpliTaq Gold™ DNA (Applied Biosystems); 0,75 μ l 1 \times GeneAmp® PCR buforu (Applied Biosystems); 0,75 μ l mieszaniny GeneAmp dNTP (Applied Biosystems), 0,75 μ l chlorku magnezu (Applied Biosystems), 0,8 μ l każdego ze starterów (stężenie 5 pM). Polimorfizm został określony przy zastosowaniu następujących starterów:

5'-AAGACCTTCTAGCACCACCG-3';
5' TGGGCATCCCCAGCCTCTTA 3'.

Jeden ze starterów użyty do reakcji amplifikacji wyznaczano znacznikiem fluoescencyjnym FAM. Analizy jakościowej fragmentów amplifikacji dokonano z zastosowaniem programu komputerowego GeneScan Analysis Software wer. 3.7 (Applied Biosystems). Jako kontrolę poprawności oznaczeń użyto CEPH control DNA 1347–02 (Applied Biosystems).

Reakcja sekwencjonowania

Sekwencjonowaniu poddano próbki z wybranymi allelami różniące się pomiędzy sobą wielkościami fragmentów. Każdy badany allel oddzielnie poddano ponownej amplifikacji. Do sekwencjonowania wykorzystano zestaw ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequen-

cing Kits (Applied Biosystems), zgodnie z instrukcją producenta.

Produkty sekwencjonowania oczyszczano przez wytrącanie 95-procentowym etanolem w obecności 3 M octanu sodu. Po 20 min inkubacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano przy 14 tys. rpm przez 20 min. Usuwno supernatanty, a produkty przemywano 70-procentowym etanolem. Po usunięciu etanolu i wysuszeniu produkty zawieszano w 12 μ l dejonizowanego formamidu i denaturowano przez 2 min w 95°C, a następnie schładzano w lodzie. Tak przygotowane produkty rozdzielano w automatycznym sekwenatorze DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) i analizowano przy zastosowaniu programu komputerowego DNA Sequencing Analysis Software v. 3.4.1. (Applied Biosystems).

Wyniki

Analizowano rozkład genotypów oraz częstość alleli A/G (-5) regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A w grupie pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem przewodowym piersi oraz kobiet zdrowych stanowiących grupę kontrolną (tab. I).

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów i częstości alleli między grupą badaną i kontrolną. Wartości ilorazu szans (OR) również wskazują na brak związku między badanym polimorfizmem A/G (-5) genu metalotioneiny 2A i występowaniem przewodowego raka piersi.

Ponadto przeprowadzono analizę rozkładu genotypów oraz częstości występowania alleli w grupach pacjentek o różnym stopniu zaawansowania nowotworu.

Tab. I. Rozkład genotypów oraz częstość występowania alleli A/G (-5) regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A wśród chorych na przewodowego raka piersi oraz w grupie kontrolnej. Analiza OR

Genotyp lub allel	Rak przewodowy (n=75)		Kontrola (n=100)		
	liczba	częstość	liczba	częstość	OR (95% PU)
G/G	35	0,47	40	0,40	1,31 (0,72–2,40)
G/A	30	0,40	43	0,43	0,88 (0,32–1,75)
A/A	10	0,13	17	0,17	0,75 (0,75–1,75)
χ^2	0,752 ^a		0,853 ^a		
G	100	0,67	123	0,62	1,25 (0,80–1,95)
A	50	0,33	77	0,38	0,80 (0,51–1,24)

^a $p > 0,05$ rozkłady zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Tab. II. Rozkład genotypów oraz częstość występowania alleli A/G regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A wśród pacjentek z przewodowym rakiem piersi w stopniu zaawansowania I i II wg skali Blooma-Richardsona. Analiza OR

Genotyp lub allel	Chore na przewodowego raka piersi				OR (95% PU)
	stopień I (n=18)		stopień II (n=48)		
	liczba	częstość	liczba	częstość	
G/G	10	0,56	23	0,48	1,36 (0,46–4,04)
G/A	6	0,33	19	0,40	0,76 (0,24–2,38)
A/A	2	0,11	6	0,12	0,86 (0,16–4,73)
χ^2	0,617 ^a		0,431 ^a		
G	26	0,72	65	0,68	1,24 (0,53–2,89)
A	10	0,28	31	0,32	0,81 (0,35–1,88)

^a $p > 0,05$ rozkłady zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Tab. III. Rozkład genotypów oraz częstość występowania alleli A/G regionu promotorowego genu metalotioneiny 2A wśród pacjentek z przewodowym rakiem piersi w stopniu zaawansowania I i III wg skali Blooma-Richardsona. Analiza OR

Genotyp lub allel	Chore na przewodowego raka piersi				OR (95% PU)
	stopień I (n= 18)		stopień III (n= 9)		
	liczba	częstość	liczba	częstość	
G/G	10	0,56	5	0,56	1,00 (0,20–5,00)
G/A	6	0,33	3	0,33	1,00 (0,18–5,46)
A/A	2	0,11	1	0,11	1,00 (0,08–12,76)
χ^2	0,512 ^a		0,261 ^a		
G	26	0,72	13	0,72	1,00 (0,28–3,54)
A	10	0,28	5	0,28	1,00 (0,28–3,54)

^a $p > 0,05$ rozkłady zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

Grupę chorych na nowotwory w stopniu I, II oraz III porównano między sobą (tab. II, III). Nie stwierdzono 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 występowania alleli A i G pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).

Dyskusja

Metalotioneiny stymulują proliferację komórek nowotworowych i hamują apoptozę poprzez aktywację czynnika NF- κ B, obniżenie aktywności białka p53 i ekspresję efektorowego białka apoptozy Bax [12, 13]. Niski stopień zaawansowania raka piersi wiąże się z niższą ekspresją MT. Ekspresja MT w komórkach inwazyjnego przewodowego raka piersi jest charakterystyczna dla bardziej agresywnej postaci tego nowotworu. Nadekspresja MT w wielu nowotworach, w tym w nowotworach piersi, wiąże się ze złymi rokowaniami dla pacjentów [14]. Białka te mogą również odgrywać rolę w oporności na terapię przeciwnowotworową [8, 15]. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów, na drodze którego MT uczestniczą w oporności na leki przeciwnowotworowe, jest hamowanie przez MT apoptozy [15].

Metalotioneina MT-2 jest główną izoformą, która wydaje się związana z proliferacją komórek przewodowego raka piersi [10, 15]. Poziom ekspresji MT-2 jest pozytywnie skorelowany z aktywnością proliferacyjną komórek. Wykazano, że nadekspresja MT-2A powoduje 2-krotny wzrost liczby podziałów komórkowych, podczas gdy w przypadku nadekspresji MT-1E i MT-3 nie obserwowano takiego efektu [2]. Potwierdzeniem wpływu MT-2A na proliferację komórek jest korelacja między poziomem ekspresji tej izoformy metalotionein a ekspresją Ki-67,

białka będącego markerem proliferacji. Zarówno stężenie MT-2A, jak i mRNA dla tej izoformy jest wyższe w nowotworach bardziej zaawansowanych niż w nowotworach o niższym stadium zaawansowania. Korelacja między ekspresją MT-2A a aktywnością proliferacyjną nowotworów piersi wskazuje na potencjalne znaczenie tej izoformy w nowotworzeniu.

Rdzeń promotora genu *MT-2* zawiera sekwencję TATA oraz regiony inicjatorowe, do których przyłącza się czynnik transkrypcyjny IID (ang. *transcription factor IID* – TFIID) będący częścią kompleksu preinicjacyjnego transkrypcji [5]. W regionie promotorowym znajdują się sekwencje odpowiedzi na glukokortykoidy (ang. *glucocorticoid responsive element* – GRE), odpowiedzi na stres oksydacyjny (ang. *antioxidant responsive element* – ARE) oraz sekwencja aktywowana przez czynnik transkrypcyjny STAT (ang. *signal transducers and activator of transcription*) [4, 5, 11]. W regionie promotorowym wszystkich genów MT znajduje się motyw bogaty w pary GC (GGG-GCGGG), z którym łączą się czynniki transkrypcyjne z rodziny Sp, w tym białko Sp1 (ang. *specificity protein 1*) [5]. W regulacji ekspresji genu *MT-2* przez metale ciężkie biorą udział sekwencje MRE (ang. *metal responsive element*), które są również konieczne do transkrypcji tych genów na poziomie podstawowym. Sekwencje MRE (CTNTGC(G/A)CNCGGCCC) obecne są w wielu kopiach w regionach promotorowych genów *MT* u ssaków. W regionie promotorowym genu *MT-2* stwierdzono występowanie 6 takich sekwencji. Z sekwencjami MRE oddziałuje zależny od cynku czynnik transkrypcyjny *MTF-1* (ang. *metal responsive transcription factor 1*) [5, 11]. Jest on uznawany za główny czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genu *MT-2A* [11, 16].

Analizowana w niniejszej pracy substytucja A→G mająca miejsce w pozycji (–5) w obszarze rdzenia promotora genu *MT-2A* jest jednocześnie miejscem zlokaliz-

zowanym w centrum sekwencji o najwyższej zgodności TGC(G/A)CNC, do której może przyłączać się czynnik transkrypcyjny MTF-1 [11]. Jak wykazały badania Kita i wsp. [11] polimorfizm A/G (-5) może mieć wpływ nie tylko na oddziaływanie MTF-1 z promotorem genu *MT-2A*, ale także obniżać aktywność transkrypcyjną tego genu i tym samym hamować syntezę *MT-2A* w odpowiedzi na stymulację obecnością metali ciężkich. Autorzy wykazali występowanie polimorfizmu A/G w pozycji (-5) promotora genu *MT-2A* u 18% spośród 119 przebadanych kobiet.

Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki wskazują, że polimorfizm A/G (-5) genu *MT-2A* najprawdopodobniej nie jest związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na przewodowego raka piersi kobiet ani też z progresją tej choroby. Przepuszczenia te wymagają jednak przeprowadzenia dalszych badań z udziałem większej populacji.

Pracę wykonano przy udziale środków z grantu Prezydenta Miasta Łodzi (2007).

Piśmiennictwo

- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 1999; 132: 85-98.
- Jin R, Huang J, Tan PH, Bay BH. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 74-9.
- Rigby KE, Stillman MJ. Structural studies of metal-free metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:1271-8.
- Sato M, Kondoh M; Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med* 2002; 196: 9-22.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 2003; 533: 211-26.
- Himeno S. Application of metallothionein null cells to investigation of cadmium transport. *J Inorg Biochem* 2002; 88: 207-12.
- Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 19:13-7.
- Galicchio LM, Flaws JA, Fowler BA, Ioffe OB. Metallothionein expression in invasive and in situ breast carcinomas. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 332-7.
- Jin R, Bay BH, Chow VT, et al. Significance of metallothionein expression in breast myoepithelial cells. *Cell Tissue Res* 2001; 303: 221-6.
- Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004; 45: 103-18.
- Kita K, Miura N, Yoshida M, et al. Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A→G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. *Hum Genet* 2006; 120: 553-60.
- Barnes NL, Ackland ML, Cornish EJ. Metallothionein isoform expression by breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 895-903.
- Gruber BM. Czynnik transkrypcyjny NF-κB – nowa perspektywa w leczeniu nowotworów. *Postępy Biochem* 2004; 50: 118-30.
- Douglas-Jones AG, Schmid KW, Bier B, Horgan K, Lyons K, Dallimore ND, Moneypenny IJ, Jasani B. Metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. *Hum. Pathol* 1995; 26: 217-22.
- Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533: 201-9.
- Westin G, Schaffner W. A zinc-responsive factor interacts with a metal regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J* 1988; 7: 3763-70.