

## Polimorfizmy Gly322Asp genu *hMSH2* i Arg399Gln genu *XRCC1* systemu naprawy DNA w raku piersi

### *Polymorphisms Gly322Asp hMSH2 and Arg399Gln XRCC1 of the DNA repair system in breast cancer*

Beata Smolarz<sup>1</sup>, Hanna Romanowicz-Makowska<sup>1</sup>, Marcin Makowski<sup>2</sup>, Tomasz Pertyński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki; kierownik Pracowni i Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

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

Przeгляд Menopauzalny 2008; 5: 260-263

#### Streszczenie

**Cel pracy:** W prezentowanej pracy badano rozkład genotypów i częstości alleli polimorfizmów Gly322Asp genu *hMSH2* i Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka piersi.

**Materiał i metody:** Materiał do badań w postaci krwi został uzyskany od 150 kobiet, u których stwierdzono raka piersi, i od grupy kontrolnej (n=129). Polimorfizmy zostały określone przy zastosowaniu techniki łączącej reakcję łańcuchową polimerazy z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP).

**Wyniki:** Rozkład genotypów polimorfizmu Gly322Asp genu *hMSH2* 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 odnotowano znaczących różnic ( $p > 0,05$ ) w rozkładzie genotypów i częstości alleli pomiędzy grupami z różnym stopniem zaawansowania raka piersi.

**Wnioski:** Wyniki sugerują, że polimorfizm Arg399Gln genu *XRCC1*, podobnie jak polimorfizm Gly322Asp genu *hMSH2*, mogą nie być związane z występowaniem raka piersi.

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

#### Summary

**Aim of the study:** In the present work the distribution of genotypes and frequency of alleles of Gly322Asp *hMSH2* gene and Arg399Gln *XRCC1* gene polymorphism in subjects with breast cancer were investigated.

**Material and methods:** Blood was obtained from 150 women with breast cancer and controls (n=129). The polymorphisms were determined by PCR-RFLP.

**Results:** The distribution of the genotypes of the Arg399Gln polymorphism of *XRCC1* and Gly322Asp polymorphism of *hMSH2* 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 and allele frequencies between subgroups assigned to histological stage.

**Conclusions:** The results suggest that the Arg399Gln polymorphism of the *XRCC1* gene as well as the Gly322Asp polymorphism in *hMSH2* may not be linked with appearance and development of breast cancer.

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

#### Wstęp

Nowotwory złośliwe sutka są najczęściej występującymi nowotworami u kobiet. W Polsce notuje się prawie 10 000 nowych przypadków zachorowań rocznie. Oznacza to, że każdego roku na raka piersi zachoruje 30 kobiet na 100 000 [1]. Umieralność na raka piersi rośnie w tempie 1,6% rocznie, ponieważ jest on wykrywany zbyt późno. Tylko w 20% przypadków chorobę

rozpoznaje się we wczesnym stadium zaawansowania, gdy szanse na wyleczenie są bardzo duże. Wśród wszystkich nieleczonych chorych na raka 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 schorzenia przy rozpoczęciu leczenia. Średni wskaźnik 10-letnich przeżyć dla wszystkich stopni zaawansowania wynosi ok. 40% [1].

Adres do korespondencji:

dr Beata Smolarz, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. +48 42 271 20 71, e-mail: smolbea@wp.pl

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 piersi.

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 piersi, które może korelować z wariantami polimorficznymi genów naprawy [6].

Zidentyfikowano ponad 130 genów naprawy DNA, w których odkryto szereg polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) [7, 8]. Ażeby 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 Gly322Asp genu *hMSH2* i Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka piersi.

## Materiał i metody

### Pacjentki

Badaniom poddano kobiety w wieku 55–82 lat (średnia wieku  $\pm$ SD 68,8 $\pm$ 6,68 roku), u których stwierdzono raka piersi. Materiał do badań stanowiła krew uzyskana od 150 pacjentek. Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg kryteriów Scarff-Bloom-Richardson.

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

### Izolowanie DNA

DNA izolowano z krwi przy użyciu zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z zaleceniem producenta.

### Analiza polimorfizmu Gly322Asp genu *hMSH2*

Do badań polimorficznych wariantów wybranych genów naprawy DNA stosowano metodę PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*).

Polimorfizm Gly322Asp genu *hMSH2* był określany poprzez reakcję PCR-RFLP ze starterami o następujących sekwencjach: 5'GTTTTCTACTAATGAGCTTGC3', 5'AGTGG-TATAATCATGTGGGT3'. Reakcja PCR przeprowadzona była w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25  $\mu$ l) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2  $\mu$ mol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP i 1 j.m. polimerazy Taq (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Warunki reakcji PCR były następujące:

- 95°C – 5 min,
- 95°C – 30 s,
- 63°C – 30 s,
- 72°C – 30 s,
- 2 → 3 → 4 × 30 cykli,
- 72°C – 5 min.

Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Hinfl* przez 16 godz. w 37°C amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 7-procentowym żelu poliakryloamidowym i po barwieniu bromkiem etydyny obserwowane w świetle UV. Każda próbka przypisywana była do jednego z trzech genotypów: Gly/Gly, Gly/Asp, Asp/Asp.

### Analiza polimorfizmu Arg399Gln genu *XRCC1*

Polimorfizm Arg399Gln genu *XRCC1* był określany poprzez reakcję PCR-RFLP ze starterami o następujących sekwencjach: 5'CAAGTACAGCCAGGTCCTAG3' 5'CCTCC-CTCATCTGGAGTAC3'. Reakcja PCR przeprowadzona była w termocyklerze Perkin-Elmer/Gene Amp, PCR System 2400 thermal cycler. Mieszanina reakcyjna (25  $\mu$ l) obejmowała 5 ng genomowego DNA, 0,2  $\mu$ mol każdego ze starterów (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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,
- 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 37°C amplifikowane fragmenty DNA rozdzielane były w 7-procentowym żelu poliakryloamidowym i po barwieniu bromkiem etydyny 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  $\chi^2$ . Istotność różnic pomiędzy częstościami alleli i genotypów dla poszczególnych grup oceniana była testem  $\chi^2$ ;  $p < 0,05$  było określane jako wynik statystycznie znaczący.

### Wyniki

W tab. I przedstawiono rozkład genotypów polimorfizmu Gly322Asp genu *hMSH2* w grupie chorych na raka piersi 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 alleli Gly i Asp pomiędzy pacjentami i kontrolą.

**Tab. I.** Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu Gly322Asp genu *hMSH2* u chorych na raka piersi oraz w grupie kontrolnej

Genotyp allel	Grupa kontrolna (n=129)		Rak (n=150)	
	liczba	częstość	liczba	częstość
Gly/Gly	36	0,28	34	0,23
Gly/Asp	62	0,48	74	0,49
Asp/Asp	31	0,24	42	0,28
$\chi^2$	0,304*		0,110	
Gly	134	0,52	142	0,47
Asp	124	0,48	158	0,53

\* $p < 0,05$  w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

W tab. II zaprezentowano rozkład genotypów Arg399Gln genu *XRCC1* w grupie chorych na raka piersi 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 chorymi i grupą kontrolną.

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 odnotowano różnic w częstościach występowania alleli Gly i Asp oraz Arg i Gln pomiędzy badanymi grupami ( $p > 0,05$ ).

## Dyskusja

Gen *hMSH2* znajduje się na chromosomie 2 w obszarze p22-p21 i zawiera 3145 bp i 13 eksonów. Udział *hMSH2* w patogenezie raka jest silnie udokumentowany, ponieważ gen ten wraz z hMLH1 ulega zaburzeniom w rodzinnym, niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC) [9]. Ta rodzinna przypadłość predysponuje nie tylko do raka jelita grubego, ale również do raka endometrium, żołądka, jajników i dróg żółciowych [10]. Oprócz tego mutacje w *hMSH2* są wykrywane w sporadycznych rakach jelita grubego, endometrium [11], żołądka [12], głowy i szyi [13] i prostaty [14].

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 kpb i zawiera 17 eksonów [15]. Ulega on ekspresji na wysokim poziomie 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*, z których 14 powoduje zmianę kodowanego aminokwasu, a 4 występują w populacji z częstością 3% lub większą [15]. Trzy z nich (Arg194Trp, Arg280His i Arg399Gln) przebadano pod względem epi-

**Tab. II.** Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu Arg399Gln genu *XRCC1* u chorych na raka piersi oraz w grupie kontrolnej

Genotyp allel	Grupa kontrolna (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
$\chi^2$	0,303*		1,126	
Arg	126	0,49	140	0,47
Gln	132	0,51	160	0,53

\* $p < 0,05$  w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga

demiologicznym [4]. Allel 194Trp występuje w grupach kontrolnych badań epidemiologicznych z częstością 0,06–0,35 [8]. Według wyników uzyskanych w większości z nich już w układzie heterozygotycznym zmniejsza on ryzyko rozwoju nowotworów wielu typów, m.in. piersi, płuc i pęcherza [3, 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 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 [17]. 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* [18].

W przedstawionej pracy nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmami Gly322Asp genu *hMSH2* i Arg399Gln genu *XRCC1* a rozwojem raka piersi. Wyniki sugerują, że polimorfizmy mogą nie być bezpośrednio związane z występowaniem i rozwojem raka piersi, jednakże konieczne są badania większej populacji dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

## Piśmiennictwo

1. Didkowska JU. Epidemiologia nowotworów złośliwych piersi w Polsce. Nowotwory 2007; 57: 15-6.
2. 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.
3. Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. Virchows Arch 2004; 445: 431-41.
4. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11: 1513-30.

5. 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.
6. 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.
7. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291: 1284-9.
8. Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1977-81.
9. Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med* 2003; 3: 589-96.
10. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology* 1998; 55: 103-8.
11. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, et al. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 1671-8.
12. Renault B, Calistri D, Buonsanti G, et al. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996; 98: 601-7.
13. Field JK, Kiaris H, Howard P, et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1995; 71: 1065-9.
14. Watanabe M, Imai H, Kato H, et al. Microsatellite instability in latent prostate cancers. *Int J Cancer* 1996; 69: 394-7.
15. 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.
16. David-Beabes GL, London SJ. Genetic polymorphism of *XRCC1* and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* 2001; 34: 333-9.
17. 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.
18. 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.